



HAL
open science

Analyse fonctionnelle d'effecteurs fongiques impliqués dans le développement de la symbiose ectomycorhizienne *Laccaria bicolor*-*Populus trichocarpa*

Yohann Daguerre

► **To cite this version:**

Yohann Daguerre. Analyse fonctionnelle d'effecteurs fongiques impliqués dans le développement de la symbiose ectomycorhizienne *Laccaria bicolor*-*Populus trichocarpa*. Sylviculture, foresterie. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT : 2013LORR0167 . tel-02811259v2

HAL Id: tel-02811259

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02811259v2>

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>



U.F.R Sciences et Techniques Biologiques
Ecole Doctorale Ressources, Procédés, Produits et Environnement (RP2E)
D.F.D. Biologie Végétale et Forestière

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

En Biologie Végétale et Forestière

Par **Yohann Daguerre**

**Analyse fonctionnelle d'effecteurs fongiques impliqués dans le
développement de la symbiose ectomycorhizienne *Laccaria
bicolor-Populus trichocarpa***

Soutenance publique le 14 novembre 2013

Membres du Jury :

Rapporteurs :

Pr. Christophe Roux, Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse

Dr. Thierry Rouxel, Directeur de Recherche, INRA, Versailles

Examineurs :

Pr. Nicolas Rouhier, Professeur, Université de Lorraine, Nancy

Dr. Thomas Kroj, Chargé de Recherche INRA, CIRAD, Montpellier

Dr. Francis Martin, Directeur de Recherche, INRA, Nancy (Directeur de thèse)

Dr. Claire Veneault-Fourrey, Maître de conférences, Université de Lorraine, Nancy

UMR 1136 INRA/Université de Lorraine, Interactions Arbres/Microorganismes

Centre INRA de Nancy – 54280 Champenoux

A mon père Jacques Daguerre,

(07/12/1947-05/03/2002)

« Ô temps ! Suspend ton vol, et vous, heures propices !

Suspendez votre cours :

Laissez-nous savourer les rapides délices

Des plus beaux de nos jours ! »

Le Lac, Les méditations poétiques, Alphonse de Lamartine, 1820.

Remerciements

Tout d'abord, Je tiens à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté de juger mon travail et, pour ceux qui viennent de l'extérieur, de s'être déplacé jusqu'à Nancy.

Je remercie également :

Francis Martin, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet et pour m'avoir soutenu dans mes démarches pour préparer l'après-thèse.

Annick Brun, ma co-directrice de thèse, pour m'avoir co-encadré malgré les circonstances, pour m'avoir fait confiance pour développer le système double et simple hybride en levure au laboratoire, pour m'avoir conseillé sur la bonne marche à suivre et pour les discussions que nous avons partagées.

Claire Veneault-Fourrey, ma seconde co-directrice de thèse. Bien que tu ais œuvré dans l'ombre, tu as toujours été là pour moi, pour me conseiller, m'orienter et corriger les manuscrits de mes papiers et de ma thèse. Un grand merci à toi Claire pour m'avoir consacré tout ce temps.

Les membres de l'UMR1136, de l'adjoint technique au directeur d'unité, en passant par les étudiants (stagiaires et doctorants) et les post-doctorants, pour les conseils et l'aide précieuse qu'ils m'ont apporté tout au long de ma thèse.

Jonathan Plett pour ton dynamisme et ta bonne humeur contagieuse. Je suis vraiment ravi d'avoir pu collaborer avec toi durant ma thèse.

Alejandro Pardo et Minna Kemppainen de l'Université de Quilmes en Argentine pour nous avoir procuré les lignées RNAi de *missp8*, *missp17* et *missp22* ainsi que Barbara Montanini et Elisabetta Levati de l'Université de Parme en Italie pour leurs conseils avisés et leur participation à l'élaboration du papier sur les facteurs de transcription de *Laccaria bicolor*.

Le laboratoire de génétique microbienne pour m'avoir recruté pour un ATER de 6 mois et m'avoir permis de faire mes premiers pas dans l'enseignement tout en me permettant de poursuivre mes travaux de thèse à l'INRA.

Aude et Carine pour les bons moments passés ensemble, pour vos encouragements et votre soutien. Vous avez toujours répondu présentes dans les moments les plus importants et

ce jusqu'à la dernière minute. C'est en grande partie à vous que je dois l'achèvement de ma thèse ! Mille merci !!! Je remercie également vos familles pour les bons moments partagés.

Béa, pour ta bonne humeur permanente et communicative, pour nos discussions souvent très enrichissantes et pour ton « coaching ». J'ai adoré nos promenades en forêt, parfois exploratoires et nos matinées piscine. A ce propos Béa, piscine ou pas piscine ?

Camille et Raphaëlle, mes jumelles préférées, vos conseils et vos encouragements m'ont toujours été d'un grand réconfort. Grâce à vous, ma fin de thèse a été ponctuée de merveilleux voyages. Vivement le prochain !

Eva et Grégory. La distance et ma thèse aidant nous ne nous sommes vu que très rarement en quatre ans mais ça a toujours été pour moi un plaisir. J'espère que nous aurons bientôt l'occasion de découvrir votre nouvelle cuisine équipée !

Fanny et ses parents. Fanny, tu as toujours su dédramatiser les situations et animer nos soirées. Grâce à toi et tes parents, nous avons découvert un joli petit coin de paradis dans les Alpes, le Vernet. Je garde un très bon souvenir de notre sortie rafting.

Frédéric, Cécile, Sarah et Yanis, pour les bons moments passés ensemble et le réveillon du nouvel an 2013. Une chose est sûre, pour l'avoir vu, l'île de beauté porte bien son nom !

Manu, sa sœur Béa, et ses parents. Bien que je n'aie pas été très présent ces quatre dernières années, les quelques moments passés ensemble font partie des meilleurs moments de ma thèse. Les discussions que nous avons eues, m'ont toujours été d'un grand réconfort.

Patrice, pour ta gentillesse et pour t'être toujours montré disponible lorsque j'avais besoin d'aide pour mes expériences en serres.

Sandrine, Eric et le petit Léo pour les bons moments, les réveillons et les soirées de contrée passés ensemble. Bien que le petit homme nous ait tous viré la dernière fois que nous nous sommes vu, c'est avec joie que je vous retrouverez pour de nouvelles aventures !

Les membres de ma famille de France et d'Espagne, pour avoir su gérer mes inquiétudes, écouter mes monologues et palier à ma mauvaise humeur en toutes circonstances. J'ai bien peur d'avoir mis votre patience à rude épreuve !

Enfin je remercie vivement toutes les personnes que j'aurais pu oublier et qui se reconnaîtront dans mon travail.

Liste des abréviations

AD : domaine d'activation (Activation Domain)
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AG : Acide Gibbérellique
AIP : Acide 2-aminoIndane-2-Phosphonique
AJ : Acide Jasmonique
AJ-Ile: acide jasmonique-isoleucine
AM : mycorhize à arbuscules (Arbuscular Mycorrhiza)
Amp : Ampicilline
ARF-GEF: Adenosine diphosphate Ribosylation Factor-Guanine nucleotide Exchange Factor
AS : Acide Salicylique
ATPase : Adénosine TriPhosphatase
BiFC : complémentation de fluorescence bimoléculaire (Bimolecular Fluorescence Complementation)
CAZymes : enzymes actives sur les carbohydrates (Carbohydrate-Active enZymes)
CE : Carbohydrate Esterase
Ch-IP : Chromatine Immuno Précipitation
Chl : Chloramphénicol
cm : centimètre
CO₂ : dioxyde de carbone
COI : COronatine Intensive
Co-IP : Co-Immuno Précipitation
COR : CORonatine
CP : Cystein Protease
CRN : Crinkler
CTR : Constitutive Triple Response
db : double brin
DBD : domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain)
DO : Densité Optique
DWRRD : Aspartate-Tryptophane-Arginine-Arginine-Aspartate
EBF : EIN3 Binding F-box
ECM : ectomycorhize (ECtoMycorrhiza)
EDS : Enhanced Disease Susceptibility
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
EIL : Ethylene Intensive Like
EIN : Ethylene INtensive
ERF : facteur de réponse à l'éthylène (Ethylene Response Factor)
ERM : mycorhize ericoïde (ERicoid Mycorrhiza)
EROs: espèces réactives de l'oxygène
ERS : Ethylene response sensor

EST : marqueur de séquence exprimée (Expressed Sequence Tag)
ET : Ethylène
ETR : Ethylene response
FB : carpophore (Fruiting Body)
FLM : mycélium libre (Free Living Mycelium)
FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfert
GAI : Gibberellic Acid Intensive
Gent: Gentamycine
GFP : protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein)
GH : Glycoside Hydrolase
GIP : protéine inhibitrice des glucanases (Glucanase Inhibitor Protein)
GRX : GlutaRédoXine
GTPase : Guanine TriPhosphatase
h : heure
HR : réponse hypersensitive (Hypersensitive Response)
H₂O : monoxyde de dihydrogène (eau)
IBA : Indole-3-butyric acid
IPGC : International Poplar Genome Consortium
IPL: Isochorismate Pyruvate Lyase
IPTG : IsoPropyl β-D-1-ThioGalactopyranoside
Jas: associé à l'acide jasmonique (Jasmonic acid-associated)
JAM: Jasmonate Associated Myc2-like
JAZ: JAsmonate Zim domain
JGI : Joint Genome Institute
Kan: Kanamycine
kDA : kilo Dalton
L: litre
LB: Luria Bertani
LOX: LipOXygénase
MAMP: patron moléculaire associé aux microorganismes (Microbe Associated Molecular Pattern)
Mb: mégabase
MeAJ: jasmonate de méthyle
MES : 2 - (N-morpholino) éthanesulfonique
MFS : Major Facilitator Superfamily
MiSSP : petite protéine sécrétée induite dans la mycorhize (Mycorrhiza Small Secreted Protein)
mL : millilitre
mM : millimole par litre
mm³ : millimètre cube
MPK : mitogen-activated protein (MAP) kinase
MTI : immunité déclenchée par les MAMPs (MAMP Triggered Immunity)

NCBI : National Center for Biotechnology Information
NIM : Non Immunity
NINJA: Novel INteractor of JAZ
NLS: signal de localisation nucléaire (Nuclear Localisation Signal)
ng : nanogramme
nm : nanomètre
nM : nanomole par litre
NPR: Nonexpressor of Pathogenesis-Related Genes
ORA : Octadecanoid-Responsive Arabidopsis
ORNL : Oak Ridge National Laboratory
PAD : PhytoAlexin-Deficient
PAL : Phénylalanine Ammonium Lyase
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDF : défensine de plante (Plant DeFensin)
PEG : Poly Ethylène Glycol
pH : potentiel Hydrogène
PI3P : PhosphatidyInositol-3-Phosphate
PL : Polysaccharide Lyase
PLCP: Papain-Like Cysteine Protease
pmol: picomole
POX : PerOXydase
PR : relatif à la pathogénèse (Pathogenesis Related)
PRR : Pattern Recognition Receptor
RGA : répresseur de l'acide gibbérellique (Repressor of Gibberellic Acid)
RGD : arginine-glycine-aspartate
RGL : RGA-Like
Rif: Rifampicine
RNAi : interférence Acide RiboNucléique (RiboNucleic Acid interference)
rpm : rotations par minutes
RxLR : Arginine-x-Leucine-Arginine
SABP : protéine fixant l'acide salicylique (Salicylic Acid Binding Protein)
SAR : réponse systémique acquise
SCF: Skip-Cullin-F-box
SNI: supresseur inductible de NPR1 (Suppressor of NPR1 Inducible)
SRAP : polypeptides acides relatifs à la symbiose (Symbiosis Related Acidic Polypeptides)
ss-DNA : ADN simple brin (single strand DNA)
SSP : petite protéine sécrétée (Small Secreted Protein)
SST3 : système de sécrétion de type 3 (Secretion System Type III)
SUMO : Small Ubiquitin-like Modifier
TAL : Transcription Activator-Like

TALE: Transcriptional Activator Like Effector
TASP: Template Assembled Synthetic Protein
TE: Tris-EDTA
TF: facteur de transcription (Transcription Factor)
TGA: TGACG motif-binding factor
TIBA: acide tri-iodo benzoïque (Tri-Iodo Benzoic Acid)
UFC: Unité Formant Colonie
USP : protéine universelle du stress (Universal Stress Protein)
UV: Ultra-Violet
YEB : Yeast Extract-Beef extract
YFP : protéine fluorescente jaune (Yellow Fluorescent Protein)
YPS : Yeast-Peptone-Sucrose
Y2H : double hybride en levure (Yeast 2 Hybrid)
 α : alpha
 β : bêta
 μg : microgramme
 μL : microlitre
 μm : micromètre
 μM : micromole par litre
3AT : 3-Amino-Triazole

Sommaire

Chapitre I : Synthèse bibliographique	15
I.1. Les symbioses mycorhiziennes	17
I.2. La symbiose ectomycorhizienne (ECM)	19
I.2.1. ECM: Développement de l'organe symbiotique	21
I.2.1.1. La phase de pré-contact.....	21
I.2.1.2. La phase de colonisation	25
I.2.1.2.1. Les hydrophobines	27
I.2.1.2.2. Les SRAPs.....	29
I.2.1.2.3. Les CAZymes.....	31
I.2.1.2.4. Les flux ioniques	33
I.2.1.3. La phase tardive ou phase de biotrophie	33
I.3. Le modèle d'étude <i>Laccaria bicolor</i> / <i>Populus trichocarpa</i>	41
I.3.1. Le peuplier	41
I.3.1.1. Le peuplier, un modèle d'étude.....	41
I.3.1.2. Le génome de <i>Populus trichocarpa</i>	43
I.3.2. Le champignon ectomycorhizien <i>Laccaria bicolor</i>	43
I.3.2.1. <i>Laccaria bicolor</i> , un modèle d'étude	45
I.3.2.2. Le génome de <i>Laccaria bicolor</i>	45
I.4. Le système immunitaire chez les plantes	47
I.4.1. L'immunité déclenchée par les Patrons Moléculaires Associés aux Microorganismes (MAMPs) (MTI)	47
I.4.2. La régulation hormonale des défenses immunitaires.....	49
I.4.2.1. La voie de signalisation induite par l'acide jasmonique	51
I.4.2.2. La voie de signalisation induite par l'éthylène	57
I.4.2.3. La voie de signalisation induite par l'acide salicylique	59
I.4.2.4. Les connections entre les voies de signalisation AS et AJ dépendantes.....	61
I.4.2.5. Les connections entre les voies de signalisation AJ- et ET-dépendantes	63
I.4.2.6. Les connections entre les voies de signalisation ET- et AS-dépendantes.....	65
I.5. Les effecteurs	67
I.5.1. Définition d'un effecteur	67
I.5.2. La localisation d'un effecteur	67
I.5.3. Les cibles d'un effecteur.....	71
I.5.4. La taille d'un effecteur.....	71
I.5.5. La présence de motifs conservés chez les effecteurs.....	71

I.5.6. La richesse en cysteine des effecteurs	75
I.5.9. Les rôles d'un effecteur	77
I.5.9.1. La neutralisation des enzymes de défense de la plante	77
I.5.9.2. La perturbation du système de sécrétion de la plante	81
I.5.9.3. La dégradation des protéines de la plante	83
I.5.9.4. La perturbation des voies de signalisation	85
I.5.9.5. La modification du transcriptome de la plante hôte et le détournement de son métabolisme	89
I.5.10. L'émergence d'effecteurs symbiotiques	91
I.5.10.1. Les effecteurs des bactéries <i>Rhizobium</i>	93
I.5.10.2. Les effecteurs de champignons mycorhiziens	95
I.6. Objectifs de la thèse	99
Chapitre II : Identification des cibles végétales de l'effecteur symbiotique MiSSP7	105
Chapitre III : Caractérisation fonctionnelle d'effecteur symbiotique putatif du champignon ectomycorhizien <i>Laccaria bicolor</i>	151
Chapitre IV : Analyse globale des facteurs de transcription du champignon ectomycorhizien <i>Laccaria bicolor</i>	203
Chapitre V : Discussion générale	345
V.1. Le rôle de MiSSP7 dans le développement de la symbiose.	347
V.1.1. MiSSP7 cible deux protéines JAZ, PtJAZ5 et PtJAZ6.	347
V.1.2. PtJAZ6 interagit avec Pt14-3-3 et PtMYC.....	349
V.1.3. <i>L. bicolor</i> utilise MiSSP7 pour bloquer la voie de signalisation JA-dépendante et favoriser la colonisation des racines par le champignon.....	353
V.2. D'autres MiSSPs = d'autres effecteurs symbiotique ?	361
V.2.1. MiSSP7, MiSSP8 et MiSSP17 sont sécrétées par les voies classiques de sécrétion et sont essentielles à l'établissement de la symbiose	363
V.2.2. Rôle(s) putatif(s) de MiSSP8	363
V.2.3. Rôle(s) putatif(s) de MiSSP17	365
V.2.4. Evolution des effecteurs de symbiose	369
V.3. Le simple hybride a permis la découverte d'une nouvelle classe de protéines sécrétées chez <i>L. bicolor</i> possédant une fonction d'activateur transcriptionnel	371
Conclusions et perspectives	375
Fiches techniques	383
Annexes:	433
References bibliographiques	443

Chapitre I : Synthèse bibliographique

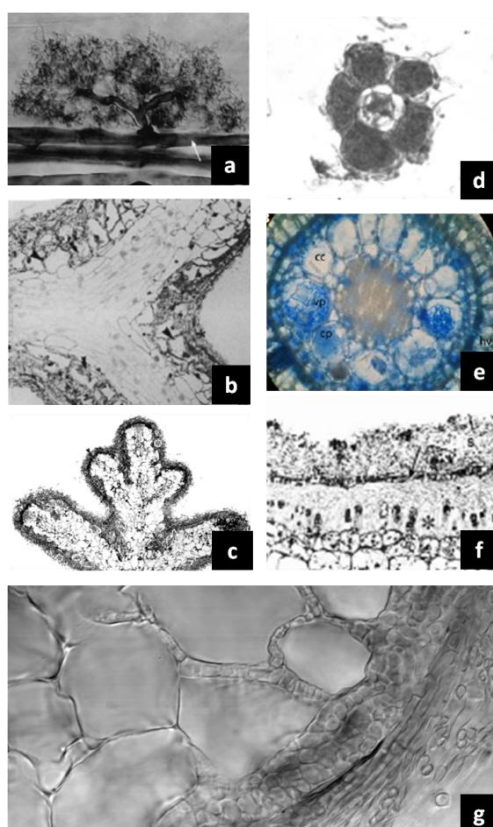


Figure I.1 : Caractéristiques structurales des 7 catégories de mycorhizes.

a) Mycorhize à Arbuscule : Observation au microscope confocal d'arbuscule mature de type Arum généré par *Glomus mosseae* dans une cellule corticale d'*Allium porrum*. L'arbuscule s'est développée à partir d'un hyphe intercellulaire bien développé (Flèche) (Brundrett *et al.*, 1984).

b) Ectendomycorhize : Observation au microscope électronique à balayage d'une mycorhize de *Pinus banksiana-Wilcoxina mikolae var mikolae* (Scales and Peterson, 1991a).

c) Mycorhize arbutoïde : Observation au microscope électronique à balayage d'une mycorhize d'*Arbutus menziesii-Pisolithus tinctorius* (Massicotte *et al.*, 1993).

d) Mycorhize éricoïde : Observation au microscope optique de la coupe transversale d'une mycorhize de *Calluna vulgaris* (Smith and Read, 2008).

e) Mycorhize à orchidée : Observation des pelotons au microscope optique, après coloration au bleu de lactophénol d'une coupe transversale de mycorhize orchidée; cc : cellule corticale ; vp : peloton jeune ; cp : peloton lyse ; hv : passage de l'hyphe).

f) Mycorhize monotropoïde : Observation au microscope optique de la coupe transversale d'une mycorhize de *Sarcodes*. La pénétration du réseau de Hartig est exclusivement épidermique (Robertson et Robertson, 1982).

g) Ectomycorhize : Observation au microscope électronique à balayage d'une mycorhize de *Populus trichocarpa-Laccaria bicolor*.

I.1. Les symbioses mycorhiziennes

Les mycorhizes ont été décrites pour la première fois par Frank en 1885 (Frank, 1885) et de Bary en 1887 (de Bary, 1887). Ce sont des associations mutualistes complexes entre les champignons du sol et les racines des plantes. Les associations mycorhiziennes sont les plus communes et les plus répandues des symbioses décrites à ce jour. Dans les écosystèmes naturels, la croissance des plantes mycorhizées ainsi que leur diversité sont très souvent dépendantes de la présence et de l'activité des mycorhizes. En Europe, plus de 76 % des plantes sont mycorhizées (Harley & Harley, 1987). Toutes les gymnospermes sont mycorhizées et parmi les angiospermes, 83 % des dicotylédones et 79 % des monocotylédones sont mycorhizées (Wilcox, 1991).

Les mycorhizes sont traditionnellement classées en catégories selon le partenaire fongique et les caractéristiques anatomiques macro- et microscopiques de l'organe symbiotique formé par les deux symbiontes (Peterson *et al.*, 2004; Smith & Read, 2008 ; Tableau 1). S'agissant d'interactions mutualistes, la membrane plasmique végétale n'est jamais traversée par les hyphes fongiques. Néanmoins, cellules végétales et fongiques co-existent étroitement au sein de l'organe symbiotique. Selon le type de mycorhize, les hyphes peuvent traverser la paroi végétale et coloniser activement la cellule végétale. À l'heure actuelle sept catégories sont reconnues: les endomycorhizes à arbuscules (AM), les ectomycorhizes (ECM), les ectendomycorhizes, les mycorhizes éricoïdes (ERM), les mycorhizes arbutoïdes, les mycorhizes monotropoïdes et les mycorhizes à orchidées (Smith et Read, 2008) (Figure I.1). Les mycorhizes sont à l'origine d'un échange mutualiste de nutriments favorisant la croissance et la santé des deux partenaires. Ainsi, le champignon transfère généralement à la plante des nutriments du sol (azote, phosphate, sels minéraux, eau,..) présents en faibles quantités ou difficilement mobilisables tandis qu'il reçoit de la plante des sucres issus de la photosynthèse (Harley & Smith, 1983, Harley, 1989). Toutefois, des exceptions existent. Dans le cas des mycorhizes monotropoïdes, (Leake, 1994 ; Bidartondo & Bruns, 2001; Young *et al.*, 2002), c'est la plante qui dépend du champignon pour l'acquisition de carbone. La présence du champignon symbiotique monotropoïde est également essentielle à la germination des graines de ses hôtes myco-hétérotrophes (Bruns & Read, 2000). De même, dans le cas des mycorhizes à orchidées, la germination des graines et les premiers stades du développement de la plante dépendent de l'apport en carbone réalisé par le partenaire fongique (Peterson *et al.*, 1998).

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux types de symbioses mycorhiziennes (D'après Smith and Read, 2008).

Zygo, Zygomycètes ; Basidio, Basidiomycètes; Asco, Ascomycètes.

Bryo, Bryophytes; Pterido, Pteridophytes; Gymno, Gymnospermes; Angio, Angiospermes.

	Types de mycorhize						
	AM	Ecto- mycorhize	Ectendo- mycorhize	Mycorhize arbutoïde	Mycorhize mono- trophoïde	Mycorhize ericoïde	Mycorhize à orchidée
Hyphes septés	-	+	+	+	+	+	+
Hyphes aseptés	+	-	-	-	-	-	-
Colonisation intracellulaire	+	-	+	+	+	+	+
Manteau	-	+	±	±	+	-	-
Réseau de Hartig	-	+	+	+	+	-	-
Vésicules / Arbuscules	±	-	-	-	-	-	-
Pelotons	-	-	-	-	-	+	+
Taxon fongique	Zygo Bryo	Basidio / Asco (Zigo)	Basidio / Asco	Basidio	Basidio	Asco	Basidio
Taxon végétal	Pterido Gymno Angio	Gymno Angio	Gymno Angio	Ericales	Monotropacées	Ericales / Bryo	Orchidées

D'un point de vue évolutif, l'analyse de fossiles situe l'origine des mycorhizes sur une large période de temps (Kidston et Lang, 1921 ; Gerhig *et al.*, 1996 ; Redecker *et al.*, 2000 ; Brundrett, 2002 ; Read et Perez-Moreno, 2003). L'émergence des champignons mycorhiziens serait étroitement liée à la colonisation de la surface terrestre par les plantes, il y a 475 millions d'années (Baylis, 1972 ; Pirozynski et Mallock, 1975). Ils auraient servi d'outil de survie et d'adaptation aux plantes (Selosse et Le Tacon, 1998). Ainsi, les AMs, la plus ancienne forme de mycorhize connue, seraient apparues il y a 450 à 350 millions d'années (Simon *et al.*, 1993). En revanche, les ECMs et les ERM, plus récentes, seraient apparues entre 180 et 130 millions d'années (Hibbett *et al.*, 2000 ; Alexander, 2006 ; Moyersoen, 2006 ; Cullings, 1996). Cela situe l'émergence des ECMs proche de celle des Gymnospermes coniférophytes, (180-140 millions d'année ; Bell *et al.*, 2005) et celle des ERM proche de celle des Angiospermes éricales (Specht, 1979; Dettmann, 1992). Les mycorhizes à orchidées sont apparues beaucoup plus récemment, puisqu'on situe l'origine des orchidées entre 76 et 84 millions d'années (Ramirez *et al.*, 2007). Ainsi, les AMs apparaissent comme le type de mycorhize ancestral et concernent la majorité des espèces végétales terrestres. A l'inverse des mycorhizes à orchidées qui semblent n'être apparues qu'une seule fois au cours de l'évolution, les ECMs et les ERM sont probablement apparues à plusieurs reprises indépendamment chez différents clades de champignons (Fitter et Moyersoen, 1996; Hibbett *et al.*, 2000 ; Brundrett, 2002; Wang et Qiu, 2006 ; James *et al.*, 2006). Hibbett et Matheny (2009) proposent, en effet, que les champignons ectomycorhiziens seraient issus de champignons saprotrophes ayant perdu leur capacité à dégrader les tissus végétaux et ayant développé des mécanismes leur permettant de contourner le système immunitaire de la plante pour accéder aux sucres issus de la photosynthèse (Martin *et al.*, 2008 ; Martin et Selosse, 2008).

I.2. La symbiose ectomycorhizienne (ECM)

Les ECMs sont formées par un grand nombre d'espèces fongiques dont la majorité appartient aux basidiomycètes et certaines aux ascomycètes. Environ 5 000 à 6 000 espèces de champignons seraient capables de former des ECMs ou des ectendomycorhizes (Molina *et al.*, 1992). La plupart des plantes partenaires appartiennent aux familles des Pinacées, Salicacées, Fagacées, Bétulacées et Myrtacées. Elles concernent également des arbustes, comme le *Dryas* (Rosacée) et l'*Helianthemum* (Cistacée), et un faible nombre d'espèces herbacées (*Polygonum viviparum* et *Kobresia myosuroides*) (Wilcox, 1991).

Bien qu'un nombre relativement faible (autour de 3%) de plantes à graines soit capable de former des ECMs, (Meyer, 1973), il s'agit d'essences forestières à forte valeur ajoutée et occupant une proportion importante de la surface terrestre. En effet, de nombreuses espèces d'arbres, constituant majoritairement les forêts boréales, subtropicales et tempérées des hémisphères nord et sud forment des ECMs (Smith et Read, 2008).

I.2.1. ECM: Développement de l'organe symbiotique

Le développement de la symbiose ectomycorhizienne se divise en trois principaux stades de développement. Toutefois, il n'existe pas de limites claires et des chevauchements sont possibles selon les deux partenaires étudiés. Il s'agit des phases de pré-contact, de colonisation et de mycorhize fonctionnelle (Martin et Tagu, 1995).

I.2.1.1. La phase de pré-contact

La phase de pré-contact constitue l'étape précoce au cours de laquelle plantes et champignons communiquent sans contact physique au moyen de molécules diffusibles. Ces facteurs font partie des premiers signaux de communication échangés par une plante et ses partenaires fongiques symbiotiques. Leurs rôles dans l'établissement de la phase précoce a été démontré en laboratoire à l'aide d'une barrière perméable aux molécules signal mais imperméable aux hyphes et aux racines, placée entre les deux partenaires (Horan et Chilvers, 1990 ; Burgess *et al.*, 1996 ; Felten *et al.*, 2009). Les champignons compatibles sont capables de reconnaître les racines de leur plante hôte, de croître autour et d'induire la formation de racines latérales tandis que les champignons incompatibles n'en sont pas capables (Horan et Chilvers, 1990).

Les exsudats racinaires libérés par les plantes contiennent des composés reconnus par le champignon qui vont l'attirer ou modifier son comportement. Ils peuvent par exemple, augmenter la ramification des hyphes à partir de propagule du sol (Lagrange *et al.*, 2001 ; Horan et Chilvers, 1990), activer la germination des spores ou induire la synthèse de transcrits et de protéines (Plett et Martin 2012). Chez les ECMs de *Pisolithus tinctorius* / *Eucalyptus*, le flavonol rutine et la cytokinine zéatine libérés par la plante hôte stimule, même à très faibles concentrations (de l'ordre du picomolaire), la ramification des hyphes (Gogala, 1991 ; Lagrange *et al.*, 2001 ; Martin *et al.*, 2001).

Cela augmente considérablement la probabilité de contact avec la racine. Qu'un flavonol fasse partie des facteurs de ramification est intéressant car les bactéries *Rhizobium* sont également attirées par des flavonoïdes sécrétés par leurs plantes hôtes (Aguilar *et al.*, 1988). Cela suggère que des similarités sont possibles entre les différents types de symbioses en ce qui concerne l'attraction du symbiote microbien par sa plante hôte.

Par ailleurs, les molécules signal secrétées par le champignon peuvent stimuler le développement des racines latérales de la plante ou influencer le développement de l'ectomycorhize (Burgess *et al.*, 1995 ; Felten *et al.*, 2009). Par exemple, de nombreux champignons ectomycorhiziens sécrètent de l'auxine au cours du développement symbiotique (Ho, 1987 ; Karabaghli-Degron *et al.*, 1998 ; Rincon *et al.*, 2001 ; Rincon *et al.*, 2003 ; Reddy *et al.*, 2006 ; Splivallo *et al.*, 2009). L'inoculation de *P. pinaster* avec une souche d'*Hebeloma cylindrosporum*, hyper productrice d'auxine, entraîne une augmentation du taux de mycorhization et des anomalies morphologiques du réseau de Hartig (Gay *et al.*, 1994; Gea *et al.*, 1994). De plus, un antagoniste de l'auxine dérivé du tryptophane, l'hypaphorine, est produit en grande quantité par *Pisolithus tinctorius* au cours de la formation de l'ectomycorhize (Béguiristain et Lapeyrie, 1995, 1997). L'hypaphorine influencerait l'auxine endogène des racines et régulerait l'établissement de la symbiose (Ditengou *et al.*, 2000 ; Ditengou et Lapeyrie, 2000 ; Jambois *et al.*, 2005). En effet, il a été montré que l'hypaphorine est capable d'interférer avec l'agencement du réseau du cytosquelette d'actine et de microtubules (Ditengou *et al.*, 2003) ainsi qu'avec les flux de calcium (Dauphin *et al.*, 2007). Toutes ces données suggèrent que l'auxine fongique est bien l'une des molécules impliquées dans la formation des ectomycorhizes. Toutefois, tous les champignons ectomycorhiziens ne sont pas capables de produire de l'hypaphorine ou de l'auxine en quantité suffisante pour expliquer la réponse de la plante. Un mécanisme général basé sur ce composé n'est donc pas envisageable. Néanmoins, les champignons qui ne synthétisent pas d'auxine, produisent peut être d'autres composés avec une activité similaire. Différentes études ont montré que certains champignons ectomycorhiziens sont notamment capables de produire de l'éthylène (Graham et Linderman, 1980; Rupp *et al.*, 1989; Splivallo *et al.*, 2009) tandis que d'autres sont capables de produire de l'acide jasmonique (Miersch *et al.*, 1999). Ces deux molécules sont des phytohormones volatiles et peuvent intervenir dans le dialogue moléculaire qui a lieu au cours de la phase de pré-contact. Elles sont également connues pour avoir un effet stimulant sur le développement racinaire (Ivanchenko *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2009). Ainsi, elles pourraient jouer un rôle important dans la stimulation de la formation des racines latérales par le champignon.

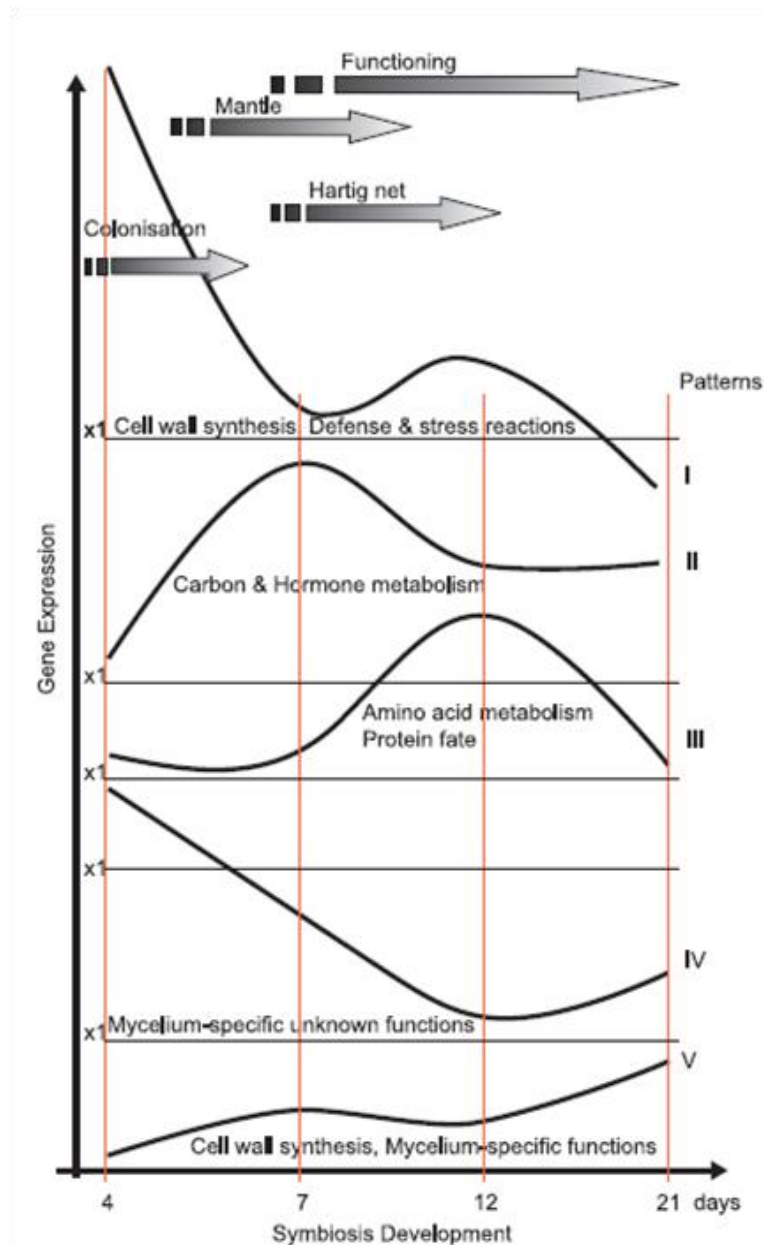


Figure I.2 : Expression coordonnée de gènes au cours du développement symbiotique d'une ECM. Schéma représentant les cinq principaux profils d'expression des gènes de plante et de champignon au cours du développement symbiotique d'une ECM de *Pisolithus tinctorius-Eucalyptus globulus*. L'expression moyenne des gènes de chaque cluster est représentée. La phase de pré-colonisation n'a pas été analysée. La phase de colonisation a lieu approximativement entre 4 et 12 jours et la phase tardive commence après 12 jours (Duplessis *et al.*, 2005).

En effet, Splivallo et ses collaborateurs (2009) ont montré que l'éthylène libéré par *Tuber borchii* et *Tuber melanosporum* stimule le développement des racines latérales chez une plante hôte *Cistus incanus* et non hôte *Arabidopsis thaliana*. De plus Regvar et ses collaborateurs (1997) ont montré que l'application exogène de méthyl-jasmonate accélère le premier contact des hyphes de *L. laccata* avec les racines de l'épicéa. Il est intéressant de noter que la quantité d'éthylène libérée augmente chez des racines colonisées par *L. bicolor* (producteur d'éthylène) et *P. tinctorius* (non producteur d'éthylène). Cela suggère que la plante hôte produit également de l'éthylène au cours de la colonisation (Rupp *et al.*, 1989). Il pourrait en être de même pour l'auxine et l'acide jasmonique

I.2.1.2. La phase de colonisation

La phase de colonisation est l'étape intermédiaire durant laquelle les hyphes adhèrent à la surface des cellules racinaires pour former le manteau et le réseau de Hartig.

Dès les premiers contacts du champignon et de la plante, des réactions de défense se mettent en place chez l'hôte (Campbell & Ellis, 1992; Sauter & Hager, 1989; Schwacke & Hager, 1992; Salzer & Hager, 1993b; Salzer *et al.*, 1996, 1997; Mensen *et al.*, 1998; Hebe *et al.*, 1999). Néanmoins, des analyses transcriptomiques ont révélé que cette induction est transitoire et que les réponses de défense sont réprimées à des stades plus tardifs de mycorhization (Figure I.2) (Duplessis *et al.*, 2005 ; Le Quéré *et al.*, 2005 ; Sebastiana *et al.*, 2009). Ces réactions de défense et de réponse aux stress impliquent vraisemblablement une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène, les EROs. La production d'EROs durant la colonisation des racines de peuplier (*Populus x canescens*) par différentes souches du champignon ectomycorhizien *Paxillus involutus* dépend vraisemblablement de la compatibilité des partenaires impliqués (Gafur *et al.*, 2004). Baptista *et al.*, (2007) ont montré que trois pics de production d'EROs sont observés au cours de la formation d'ectomycorhizes entre *Castanea sativa* et *Pisolithus tinctorius*, le premier se produisant seulement deux heures après la mise en co-culture de la plante et du champignon. Ce point est décrit comme un premier signe de détection de matériel fongique à la surface des cellules racinaires. La répression des réactions de défense à des stades plus tardifs du développement symbiotique suggère qu'à l'instar des champignons phytopathogènes biotrophes, un champignon ectomycorhizien serait capable de contrôler la réponse immunitaire de son hôte.

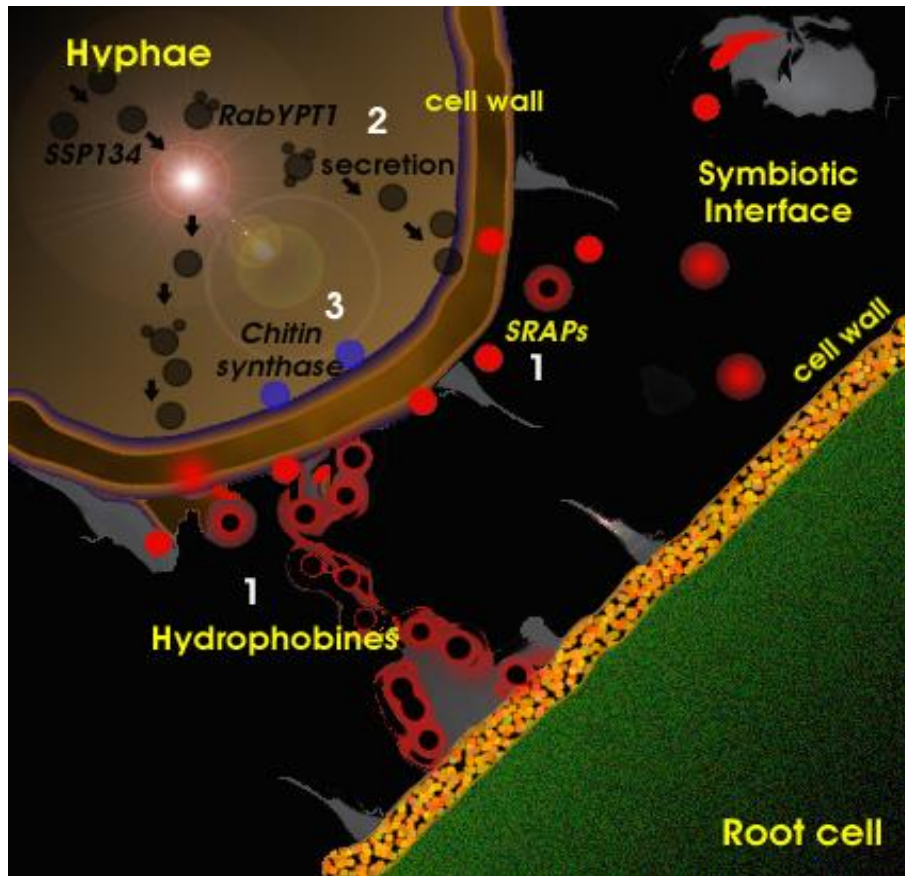


Figure I.3 : Représentation schématique de l'interface symbiotique au cours du processus d'adhésion des hyphes à la surface des cellules racinaires.

Le processus d'adhésion est essentiel à la colonisation et implique la reconnaissance de deux partenaires compatibles. En effet, lorsque différentes souches de *Pisolithus tinctorius* isolées sous pin (*Pinus taeda*) sont mises en contact avec des racines d'Eucalyptus, aucune mycorhize ne se forme. De plus, un épaissement de la paroi des cellules qui ressemble à celui qu'on observe dans le cas d'une interaction avec un agent phytopathogène incompatible est observé chez la plante (Lei *et al.*, 1990). Une fois la reconnaissance effectuée, les hyphes peuvent provoquer des cassures dans la couche externe des parois des cellules corticales et peuvent s'y attacher grâce à une interface polysaccharidique formée par les deux partenaires. L'inhibition de la formation de cette interface par le TIBA empêche l'adhésion des hyphes aux cellules racinaires et le développement symbiotique (Rincon *et al.*, 2001), ce qui montre que le processus d'adhésion est essentiel à la colonisation. En effet, il a récemment été démontré qu'en plus d'un effet inhibiteur sur le transport de l'auxine, le TIBA inhibe le trafic vésiculaire et la dynamique du cytosquelette d'actine chez de nombreux eucaryotes, ce qui perturbe le système de sécrétion.

Les hydrophobines et les « Symbiosis Related Acidic Polypeptides » (SRAP) identifiés en premier lieu chez *P. tinctorius* sont de bons candidats pour médier l'adhésion des cellules fongiques à la surface des cellules racinaires (Burgess *et al.*, 1995; Tagu *et al.*, 1996; Tagu & Martin, 1996) (Figure I.3).

I.2.1.2.1. Les hydrophobines (Figure I.4)

Les interactions hydrophobes sont importantes pour tous les champignons filamenteux qu'ils soient symbiotiques, phytopathogènes ou saprotrophes. Elles permettent la perception électrostatique des autres cellules ou tissus dans les liquides, les solides et l'air (Doyle et Rosenberg, 1990). Les hydrophobines sont généralement nécessaires à la croissance normale du champignon. Ces protéines de petite taille (≈ 100 acides aminés) possèdent un peptide signal et présentent un motif conservé de huit cystéines. Elles ont des propriétés chimiques extrêmement intéressantes car elles peuvent rendre n'importe quelle surface inerte comme le papier ou le verre, hydrophobe (Lugones *et al.*, 1996 ; Wosten *et al.*, 1993) tandis qu'elles vont rendre des solides ou des mixtures hydrophobes comme les gouttes d'huile, hydrophiles (Wosten *et al.*, 1994, 1995 ; Lugones *et al.*, 1996). Les hydrophobines sont classées en 2 classes (Classes I et II) selon leur hydrophobie et leur stabilité (Wessels, 1994). Seules les hydrophobines de la classe I sont retrouvées chez les basidiomycètes (Wosten et Wessels, 1997).

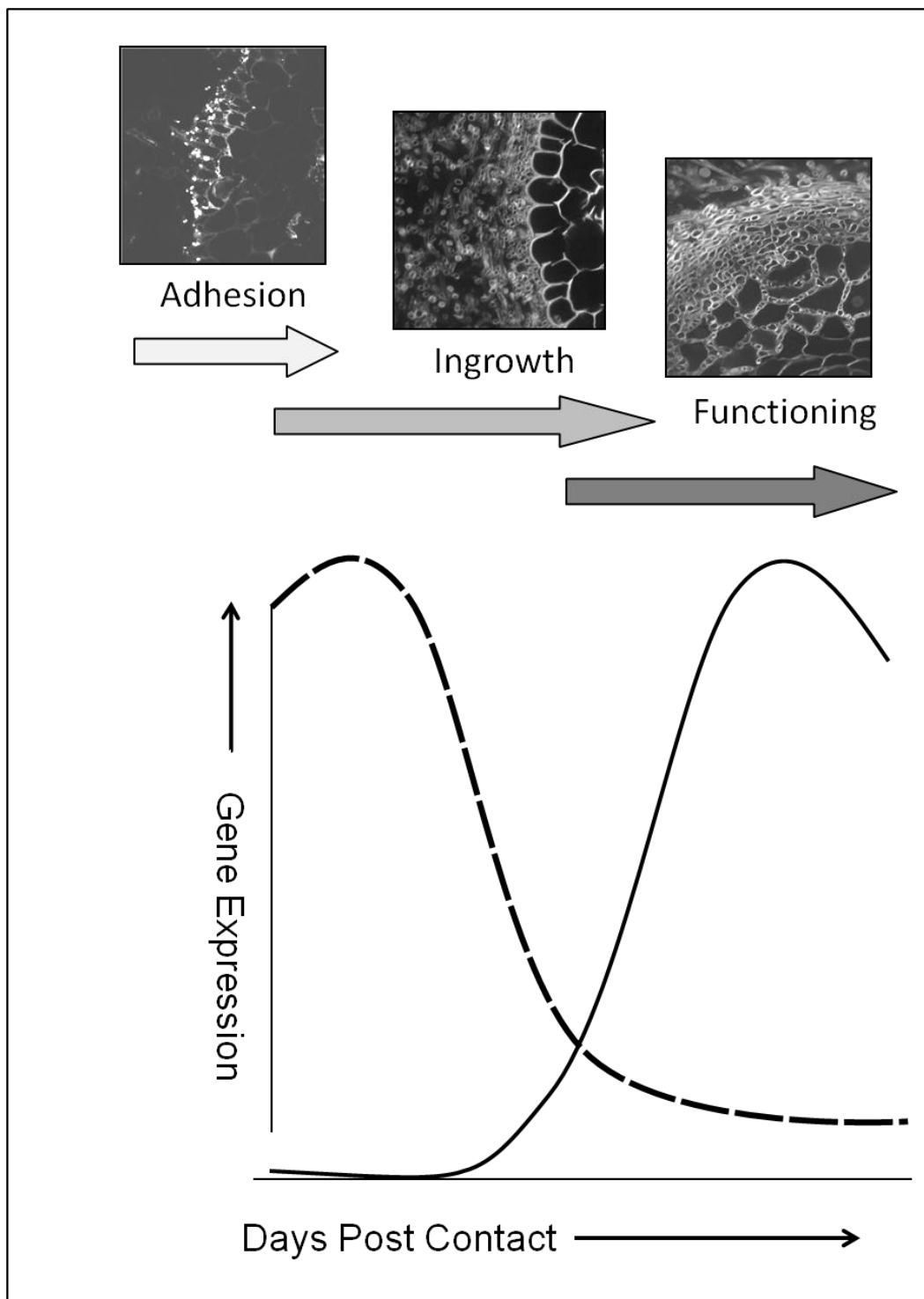


Figure I.4 : Représentation schématique des niveaux d'expression des Hydrophobines et des SRAPs au cours du développement de l'ectomycorhize.

Chez les champignons phytopathogènes, les hydrophobines sont nécessaires à l'ancrage de la cellule fongique à la surface de sa plante hôte (Talbot *et al.*, 1993, 1996). Un rôle similaire a été proposé pour les hydrophobines sécrétées par les champignons mycorhiziens. Ces protéines, qui s'auto-assemblent aux interfaces hydrophiles / hydrophobes des hyphes (Wosten *et al.*, 1993, 1994, 1995) pourraient jouer un rôle clé dans la communication entre les hyphes des tissus symbiotiques (Talbot *et al.*, 1993 ; Martin *et al.*, 1995 ; Tagu *et al.*, 1996). Par exemple, HydPt-1 et HydPt-2 sont fortement surexprimées au cours de l'interaction mycorhizienne entre *Pisolithus tinctorius* et *Eucalyptus globulus*. De plus, elles ont été localisées au niveau de la paroi extracellulaire des hyphes, en contact avec la paroi des cellules racinaires (Tagu *et al.*, 1996). *Laccaria bicolor* S238N possède 12 gènes codant des hydrophobines putatives. Leur expression est régulée selon le stade de développement (mycélium, ectomycorhize) mais aussi selon la plante hôte colonisée (Plett *et al.*, 2012). Les données suggèrent qu'il existe une corrélation entre l'expression des gènes codant les hydrophobines et le degré de compatibilité avec la plante hôte (le niveau d'expression des hydrophobines est d'autant plus important que les réactions de défense mises en place par la plante sont fortes).

I.2.1.2.2. Les SRAPs (Figure I.4)

Chez *Pisolithus tinctorius*, les gènes codant les SRAPs sont spécifiquement exprimés dans les étapes précoces du processus de colonisation des racines d'*Eucalyptus* et réprimés dans l'ectomycorhize mature (Hilbert et Martin, 1988 ; Hilbert *et al.*, 1991 ; Martin et Tagu, 1995 ; Duplessis *et al.*, 2005). L'expression des gènes codant les SRAPs augmente dès que la transcription des gènes codant les hydrophobines commence à décroître (Martin *et al.*, 1999). Il existe un grand nombre de familles de protéines SRAP chez les champignons (Hilbert *et al.*, 1991 ; Burgess *et al.*, 1995). Chez *P. tinctorius*, les SRAPs de 32kDa possèdent un motif RGD connu pour interagir avec les récepteurs d'intégrines et permettre l'attachement des fibronectines aux cellules (Pierchbacher et Ruoslahti, 1984 ; Ruoslahti, 1996). Une protéine de *Lentinula edodes* contenant un motif RGD est capable d'induire la floculation chez la levure (Kondoh *et al.*, 1995) et l'agrégation de hyphes chez *Schizophyllum commune* (Yasuda *et al.*, 1997).

La famille PtSRAP32 se compose d'au moins 6 isoformes (Laurent, 1995 ; Laurent *et al.*, 1999) qui sont sécrétées à l'interface plante/hyphe au cours de la colonisation de la racine (De Carvalho, 1994). L'expression de l'un des membres, PtSRAP32-1, est particulièrement importante après 3 jours de contact entre *P. tinctorius* et *Eucalyptus*, au moment où les hyphes s'agrègent autour des racines pour former le manteau (Figures 8b et 10), ce qui en fait un bon candidat pour être une adhésine.

I.2.1.2.3. Les CAZymes

Le processus de colonisation s'accompagne d'un arrêt de croissance des racines latérales et de la disparition des poils absorbants (Peterson, 1992 ; Horan *et al.*, 1988 ; Dexheimer et Pargney, 1991 ; Ditengou *et al.*, 2000 ; Felten *et al.*, 2009 ; Sukumar *et al.*, 2013). La formation du réseau de Hartig est généralement initiée par les hyphes du manteau interne qui pénètrent entre les cellules épidermiques (Figures 8b et 8c) (Smith et Read, 2008). Toutefois, il existe des exceptions pour lesquelles le réseau de Hartig se forme avant le manteau (Nylund et Unestam, 1982). Le processus de pénétration des hyphes s'accompagne d'une rupture de la lamelle moyenne entre les cellules du cortex, ce qui indique que des activités enzymatiques sont probablement impliquées dans le processus de colonisation (Massicotte *et al.*, 1986, 1987). L'ensemble des génomes de champignons ectomycorhiziens séquencés à ce jour montre généralement une forte diminution du nombre d'enzymes hydrolytiques (CAZymes) impliquées dans la dégradation des polysaccharides de la paroi végétale (Martin *et al.*, 2008, 2010 ; Veneault-Fourrey et Martin, 2011 ; Veneault-Fourrey *et al.*, 2013 ; Zhao *et al.*, 2013). Les génomes de *Tuber melanosporum* et *L. bicolor* ont perdu les gènes codant pectine et pectate lyases (PL-1, PL-3, PL-4, PL-9 et PL-11) mais contiennent les gènes codant une polygalacturonase GH28 et une pectine méthyltransférase CE8. Ceci suggère une progression enzymatique possible de ces champignons dans la lamelle moyenne riche en pectine. De plus, le génome de *T. melanosporum* contient des gènes codant des hémicellulases des classes GH10 et GH43 qui sont absentes chez *L. bicolor* (Martin *et al.*, 2008, 2010 ; Veneault-Fourrey et Martin, 2011 ; Veneault-Fourrey *et al.*, 2013). Toutefois, *L. bicolor* possède des gènes codant des expansines permettant le relâchement des liens non covalents entre l'hémicellulose et la cellulose qui sont absentes chez *T. melanosporum*. 8 gènes sur 12 sont surexprimés lors d'une interaction symbiotique (Martin *et al.*, 2008, 2010 ; Veneault-Fourrey et Martin, 2011 ; Veneault-Fourrey *et al.*, 2013).

I.2.1.2.4. Les flux ioniques

En l'absence d'interaction, à la surface des cellules racinaires, des flux de protons et d'ions calcium sont observés. Ils présentent une périodicité d'oscillation spécifique. L'efflux de protons est caractéristique de l'apex, des zones meristématiques et d'élongation des racines et régule le pH cytoplasmique de la racine. Ramos *et al.* (2009) ont rapporté que ces flux ainsi que la périodicité de l'oscillation sont spécifiquement plus importants dans la zone d'élongation des ectomycorhizes d'*Eucalyptus/Pisolithus* en comparaison avec des racines non mycorhizées. L'augmentation de l'efflux de protons grâce aux H⁺-ATPases de la membrane plasmique pourrait jouer un rôle important dans le développement du réseau de Hartig et l'espacement des cellules. En effet, le relâchement des parois cellulaires est mécaniquement obtenu par acidification de l'apoplaste (Rayle et Cleland, 1992). Les flux de protons sont également étroitement liés aux flux d'ions calcium. Au cours de la colonisation par *P. tinctorius*, les flux d'ions calcium diminuent, leur périodicité est interrompue et les flux d'ions calcium sont inversés dans la zone d'élongation passant d'efflux à influx. Le calcium étant un important messenger secondaire, il pourrait être impliqué dans les processus de signalisation qui ont lieu au cours de la colonisation, comme c'est le cas pour les endomycorhizes et les symbioses à nodosités (Oldroyd *et al.*, 2009). De plus, le calcium joue un rôle important dans la stabilisation de la structure des parois cellulaires végétales en établissant des liaisons étroites entre les pectines qui constituent la lamelle moyenne (Ridley *et al.*, 2001 ; Cosgrove, 2005). Lorsque la concentration en calcium est élevée, les chaînes de pectine sont réticulées et fortement agrégées les unes aux autres. La rigidité de la paroi est extrêmement forte (Hepler, 2005). Lorsque la concentration en calcium est faible, le réseau de pectine est plus lâche. La paroi est moins rigide, plus malléable (Hepler, 2005). Ainsi, l'augmentation des influx de calcium dans la zone d'élongation des ECM pourrait également contribuer à la progression des hyphes et la formation du réseau de Hartig entre les cellules racinaires végétales.

I.2.1.3. La phase tardive ou phase de biotrophie

Selon l'espèce du champignon et de la plante hôte, le réseau de Hartig se développe sur une certaine profondeur, des cellules épidermiques vers les cellules corticales. La profondeur du réseau de Hartig diffère chez les angiospermes et les gymnospermes.

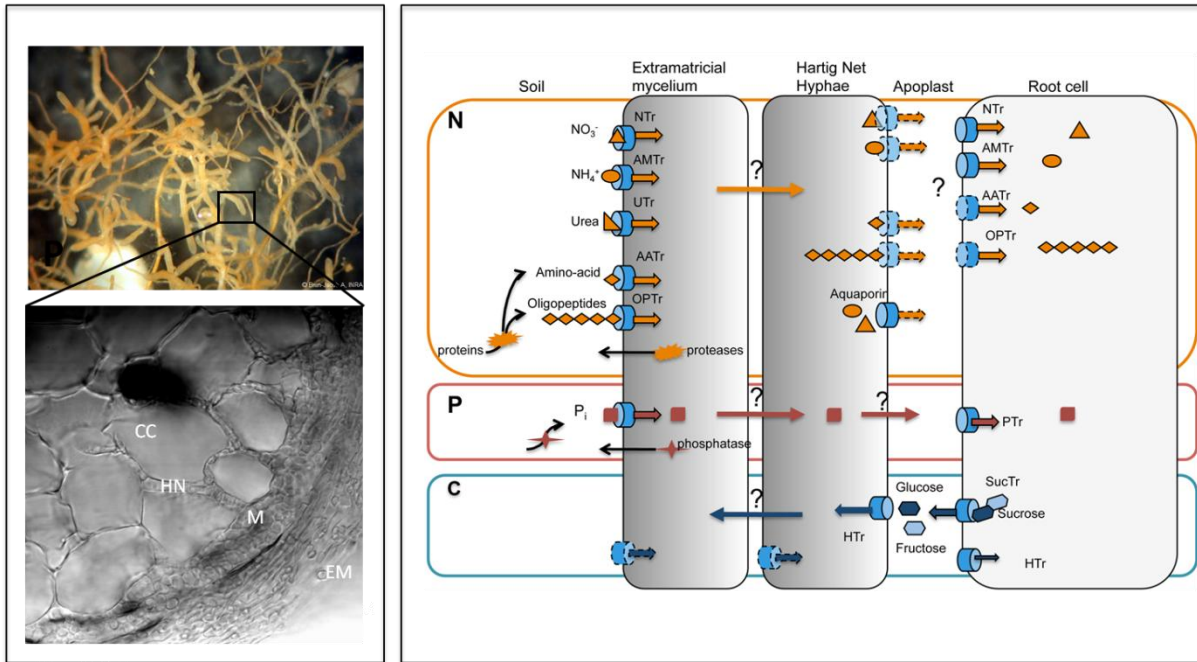


Figure 1.5 : A) Photographies de système racinaire de peuplier en contact avec *Laccaria bicolor*. B) Représentation schématique du transfert d'éléments nutritifs bi-directionnel se produisant à l'interface sol-hyphes et à l'interface symbiotique (Réseau de Hartig et cellules racinaires). Les mécanismes qui régulent l'échange de nutriments entre les cellules fongiques extramatrixelles et celles du réseau de Hartig sont encore inconnus. De plus, il existe une controverse sur la forme des composés azotés qui sont transférés à l'interface symbiotique et les mécanismes d'efflux sont encore mal connus. NTr: transporteur de nitrate; AMTr: transporteur d'ammonium; UTr: transporteur d'urée; AATr: transporteur d'acides aminés; OPTr: transporteur d'oligopeptides; PTr: transporteur de phosphate; SucTr: transporteur de sucrose; HTr: Transporteur d'Hexoses / Monosaccharides. Les flèches en pointillés indiquent qu'aucun transporteur n'a été caractérisé à ce jour (Veneault-Fourrey, Plett and Martin, 2012).

Chez la plupart des angiospermes, la pénétration se limite à la couche de cellule épidermique, formant un réseau de Hartig «épidermique» (Godbout et Fortin, 1983). On distingue deux types : i) le type «para-épidermique», majoritaire, dans lequel les cellules sont partiellement encerclées par le champignon et ii) le type péri-épidermique dans lequel les hyphes encerclent la totalité des cellules (Godbout et Fortin, 1983). Chez les gymnospermes, le réseau de Hartig pénètre généralement au-delà de l'épiderme, dans le cortex, se prolongeant parfois jusqu'à l'endoderme. Une fois la colonisation terminée, le champignon ne pénètre pas au-delà de cette limite.

La symbiose ectomycorhizienne est une interaction mutualiste basée sur l'échange équitable de nutriments (Figure I.5). Les arbres inoculés avec des champignons ectomycorhiziens présentent généralement une meilleure croissance et accumulent plus d'éléments nutritifs (Burgess *et al.*, 1993, Martins *et al.*, 1996). En effet, les champignons ectomycorhiziens fournissent jusqu'à 70% des besoins en azote et en phosphore de la plante et reçoivent en contre partie des sucres issus de la photosynthèse (entre 2 et 30% des photosynthétats), faisant des racines ectomycorrhizées, un puits de carbone (Smith et Read, 2008). C'est ce que l'on appelle la phase de biotrophie.

Dans les sols des écosystèmes forestiers tempérés et boréals, le pool d'azote organique (principalement des acides aminés et des protéines) représente jusqu'à 95% du stock d'azote tandis que la concentration en phosphate libre varie de 1 à 10 μM (Brady, 1969 ; Plassard *et al.*, 2010). Par conséquent, dans le contexte d'une interaction mutualiste, le partenaire fongique doit être un collecteur efficace d'azote et de phosphate dans le sol *via* le mycélium extramatriciel.

La capacité de plusieurs champignons ectomycorhiziens à croître sur des milieux contenant des protéines comme seule source d'azote a été testé et est corrélée avec la sécrétion de protéases (Botton et Chalot, 1991; Müller *et al.*, 2007). Les champignons ectomycorhiziens sont capables d'acquérir l'azote provenant de pollens ou de source animale (des nématodes et des collemboles morts) (Perez-Moreno et Read, 2001; Klironomos et Hart, 2001; Tibbett et Sanders, 2002; Lilly *et al.*, 2008). La capacité des champignons ectomycorhiziens à utiliser ces substrats comme sources d'éléments nutritifs a été confirmée par l'analyse des génomes de *L. bicolor* et *T. melanosporum*. Ces derniers codent des protéases sécrétées telles que des métalloprotéases, des aspartylprotéases, et des sérine protéases qui peuvent être impliquées dans la décomposition de végétaux ou d'animaux morts (Martin *et al.*, 2008).

Une fois libérés, les acides aminés et les oligopeptides peuvent être internalisés par des transporteurs d'acides aminés, des transporteurs d'oligopeptides, un transporteur d'urée et / ou un transporteur de dipeptides (Lucic *et al.*, 2008 ; Damon *et al.*, 2011 ; Pour revue, voir Müller *et al.*, 2007 ; Nygren *et al.*, 2007) (Figure I.5). En outre, le génome de *L. bicolor* présente un nombre important de transporteurs d'ammonium (Figure I.5), dont deux sont surexprimés dans l'ectomycorhize, suggérant une capacité d'absorption de l'ammonium plus importante dans les cellules fongiques de l'organe symbiotique (Lucic *et al.*, 2008).

Les champignons ectomycorhiziens sont également capables de mobiliser le phosphate minéral et organique du sol de différentes manières (Pour revue, voir Plassard *et al.*, 2011). La libération d'anions organiques de faible poids moléculaire, tel que l'acide oxalique, améliore de façon importante la biodisponibilité en phosphate (Lapeyrie *et al.*, 1991, Plassard et Fransson, 2009), tandis que les phosphatases acides sécrétées par le champignon permettent la libération de phosphate à partir de sources organiques (Figure I.5). En ce qui concerne l'absorption de phosphate dans les cellules fongiques, Tatry et ses collaborateurs (2009), ont montré que *H. cylindrosporum* possède au moins deux transporteurs de phosphate HcPT1 et HcPT2, respectivement de forte et de faible affinité (Figure I.5). En plus des transporteurs de phosphate fongiques, une analyse récente suggère que les peupliers mobilisent deux de leurs 12 transporteurs de phosphate pour améliorer l'acquisition de phosphate dans l'ectomycorhize (Loth-Pereda, 2011).

L'échange de nutriments entre le champignon et sa plante hôte se déroule dans le réseau de Hartig (c'est à dire dans l'apoplaste des cellules corticales racinaires et des hyphes fongiques intercellulaires) (Figure I.5). Afin de faciliter le transfert de l'azote et du phosphate, les cellules fongiques du réseau de Hartig doivent contenir des systèmes d'export de nutriments. L'analyse transcriptomique d'ectomycorhizes de *T. melanosporum* et *L. bicolor* a permis l'identification de plusieurs familles de transporteurs différentes, surexprimées au cours de la symbiose. Il s'agit notamment de transporteurs MFS (Major Facilitator Superfamily ; en particulier des transporteurs de sucre et de polyamine), d'aquaporines et de perméases à acides aminés (Martin *et al.*, 2008; 2010 ; Hacquard *et al.*, 2013) (Figure I.5). Des études antérieures ont également permis d'identifier des gènes impliqués dans la synthèse des protéines ainsi que le transport et le métabolisme des nutriments, surexprimés au cours des symbioses ectomycorhiziennes de *Pisolithus-Eucalyptus* et *Paxillus-Betula* (Duplessis *et al.*, 2005; Le Quéré *et al.*, 2005).

Ces similitudes entre différentes interactions ectomycorhiziennes indiquent qu'un ensemble commun de gènes liés aux échanges nutritifs sont nécessaires au fonctionnement de la symbiose. Toutefois, les principaux acteurs du transport de nutriments au niveau de l'interface de biotrophie sont encore mal connus, et la régulation des échanges à l'intérieur et entre les deux partenaires mal comprise. De plus, les formes de l'azote échangées entre les deux partenaires suscitent encore le débat (Pour revue, voir Casieri *et al.*, 2013).

Dans la symbiose ectomycorhizienne, les hexoses issus de l'hydrolyse du saccharose sont la principale source de carbone transféré aux cellules fongiques par les cellules racinaires (Smith et Read, 2008; Nehls *et al.*, 2010; Figure I.5). La plupart des champignons ectomycorhiziens ne possèdent ni gène, ni activité invertase (Parrent *et al.*, 2009), ce qui suggère que les champignons ectomycorhiziens dépendent de l'activité invertase de la plante hôte pour la production de monosaccharides à partir du saccharose (Figure I.5). Plusieurs importateurs d'hexoses caractérisés chez les champignons ectomycorhiziens ont révélé une préférence pour le glucose au lieu du fructose (Fajardo Lopez *et al.*, 2008; Salzer et Hager, 1993; Wiese *et al.*, 2001, Polidori *et al.*, 2007). Chez le peuplier, plusieurs transporteurs de monosaccharides existent également. Certains pourraient rivaliser avec les transporteurs de monosaccharides fongiques pour l'import [Nehls, communication personnelle]. Le contrôle de l'exportation et de l'hydrolyse du saccharose, ainsi que la compétition pour l'absorption des hexoses pourraient faire partie d'un mécanisme de régulation contrôlant le flux des sucres vers les cellules fongiques, afin d'éviter le parasitisme. En effet, des études récentes ont montré que les plantes pouvaient favoriser les champignons mycorhiziens à arbuscules qui leur transfèrent plus de phosphate en leur donnant plus de carbone. Réciproquement, le transfert en phosphate du champignons vers la plante dépend de l'apport en carbone par la plante (Kiers *et al.*, 2011). De manière similaire, il a été montré que l'absorption et le transport d'azote sont plus importants lorsque le carbone, livré par la plante à l'interface symbiotique, est sous la forme de saccharose (Fellbaum *et al.*, 2012).

La phase de biotrophie est maintenue pendant une période qui dépend des espèces impliquées (Smith et Read, 2008 ; Veneault-Fourrey et Martin, 2011 ; Plett et Martin, 2011 ; Casieri *et al.*, 2013). Par la suite, les ectomycorhizes vieillissent et entament une phase de sénescence (Dexheimer *et al.*, 1986). Lors de leur sénescence, certaines mycorhizes peuvent perdre leur manteau fongique ce qui conduit à une diminution des échanges champignon/plante hôte (Al-Abras *et al.*, 1988).

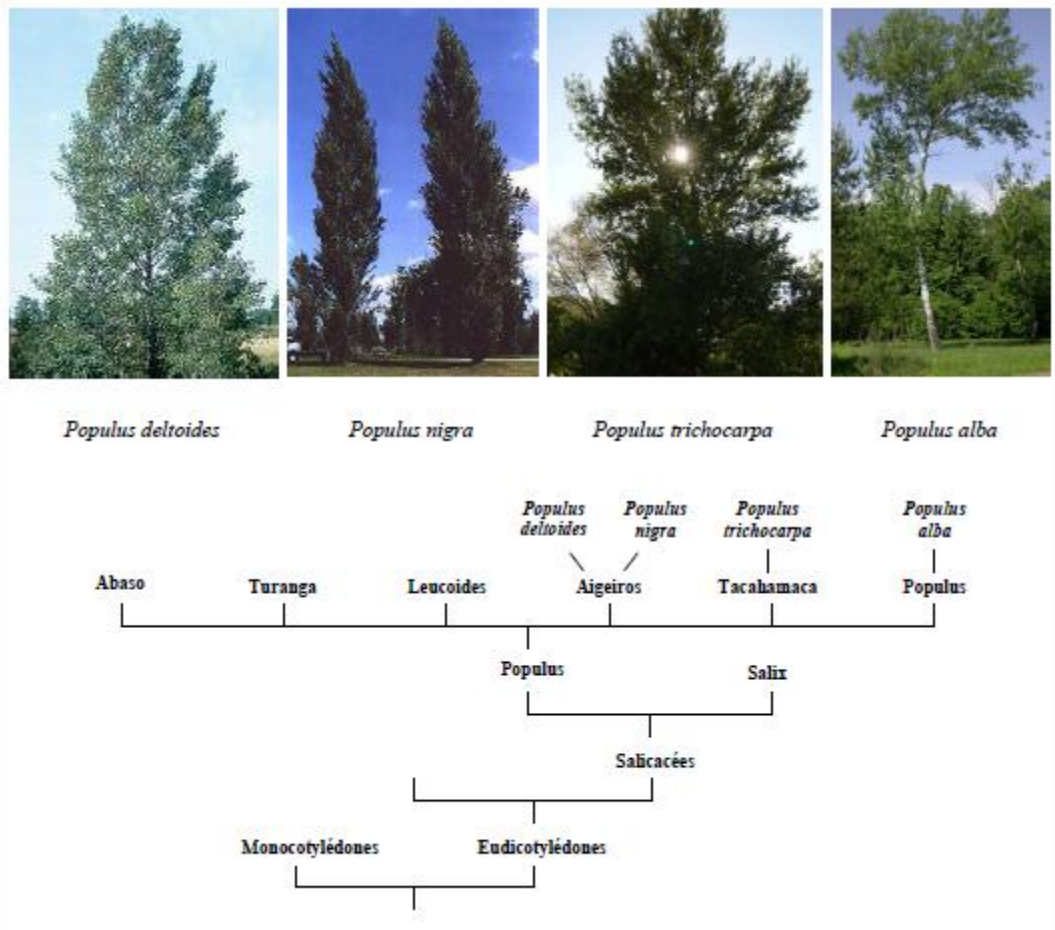


Figure I.6 : Les différentes espèces de Peuplier.

Le peuplier appartient avec le genre *Salix* à la famille des Salicacées. Les différentes espèces de peuplier se répartissent en 6 sections selon leurs caractéristiques phénotypiques et biologiques. Les 4 espèces de peuplier d'intérêt économique sont indiquées en italique au sein des populations auxquelles elles appartiennent (Eckenwalder, 1996).

I.3. Le modèle d'étude *Laccaria bicolor/ Populus trichocarpa*

I.3.1. Le peuplier

Le peuplier appartient avec le genre *Salix* à la famille des *Salicacées*. Les différentes espèces de peupliers se répartissent en six sections selon leurs caractéristiques phénotypiques et biologiques (Eckenwalder 1996). Les sections *Aigeiros*, *Tacamahaca* et *Populus* sont les plus importantes. (Figure I.6). Les espèces de peupliers *Populus deltoides*, *Populus nigra*, *Populus trichocarpa* et *Populus alba* ainsi que leurs hybrides sont les plus communément utilisées en populicultures dans le monde entier.

I.3.1.1. Le peuplier, un modèle d'étude

Aux Etats-Unis et en Europe de vastes programmes de recherche sont mis en place afin d'utiliser le peuplier pour la production de biocarburant de nouvelle génération (Rubin *et al.*, 2009, ORNL projects et Energy Poplar; <http://www.energypoplar.eu>). L'intérêt du peuplier en phytoremédiation est également étudié (Robinson *et al.*, 2000 ; Laureysens *et al.*, 2004 ; Mertens *et al.*, 2004 ; Sebastiani *et al.*, 2004 ; Chang *et al.*, 2005 ; Migeon *et al.*, 2012). En effet, son importante biomasse compense le fait qu'il accumule moins que les espèces hyper accumulatrices telles que le saule. Le peuplier est capable d'accumuler des quantités non négligeables de zinc et de cadmium. Enfin, les mécanismes moléculaires contrôlant les interactions peuplier/micro-organismes (pathogènes et symbiotiques) sont décortiqués à l'échelle globale du fait de l'acquisition de données génomiques (Hacquard *et al.*, 2010, 2011, 2012 ; Duplessis *et al.*, 2011 ; Martin *et al.*, 2008 ; Plett *et al.*, 2011, 2012 ; Larsen *et al.*, 2011).

Outre son intérêt économique (croissance rapide) et écologique (séquestration du CO₂, biocarburants, phytoremédiation, ...), le peuplier est facilement manipulable par génie génétique (Noiël *et al.*, 2002 ; Hawkins *et al.*, 2003) et de nombreuses cartes génétiques sont disponibles pour différents cultivars (Taylor *et al.*, 2002, 2007; Jansson *et al.*, 2009). Ainsi le peuplier s'est rapidement imposé comme un excellent modèle d'étude de plantes perennes dans les laboratoires de recherches scientifiques (Bradshaw *et al.*, 2000 ; Taylor, 2002 ; Brunner *et al.*, 2004).

I.3.1.2. Le génome de *Populus trichocarpa*

En 2001, le Joint Genome Institute (JGI, Département de l'énergie américain; <http://www.jgi.doe.gov/>), avec le concours de l'International Poplar Genome Consortium (IPGC, <http://www.ornl.gov/sci/ipgc/>) a entrepris le séquençage du génome du peuplier, *P. trichocarpa*. Le peuplier est le premier arbre dont le génome a été entièrement séquencé et mis à la disposition de la communauté scientifique (Tuskan *et al.*, 2006). Le peuplier possède un génome diploïde de petite taille 485 ± 10 Mb, qui se répartit sur 19 chromosomes (Tuskan *et al.*, 2006). Son génome a ainsi une taille semblable à celle du génome du riz, mais 4 fois plus importante que celle du génome d'*Arabidopsis thaliana* et 40 fois plus petite que celle du génome du pin. Il code 45 000 gènes prédits.

De plus, le genre *Populus* regroupe une collection de plus de 37 650 d'Expressed Sequence Tag (ESTs) disponibles sur les bases de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), correspondant à plus de 10 000 unigènes (Nanjo *et al.*, 2004; Tuskan *et al.*, 2006).

La mise à disposition de ce génome à la communauté scientifique a ouvert de nouvelles perspectives afin d'identifier les déterminants génétiques qui contrôlent le développement des arbres ainsi que les mécanismes mis en place en réponse aux stress environnementaux, qu'ils soient biotiques ou abiotiques. (Jansson *et al.*, 2009; Duplessis *et al.*, 2009).

I.3.2. Le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor*

Laccaria bicolor appelé communément Laccaria laqué, Clitocybe laqué ou Agaric laqué est un homobasidiomycète hyménomycète de l'ordre des Agaricales et un membre de la famille des Hydnangiaceae. Ce champignon est commun à toutes les stations humides sous couvert feuillu ou résineux, en été comme en automne. Il est très répandu aussi bien dans les forêts tempérées que boréales où il forme des ECMs avec plusieurs espèces d'arbres comme le bouleau, le pin et le peuplier (Figure I.7).

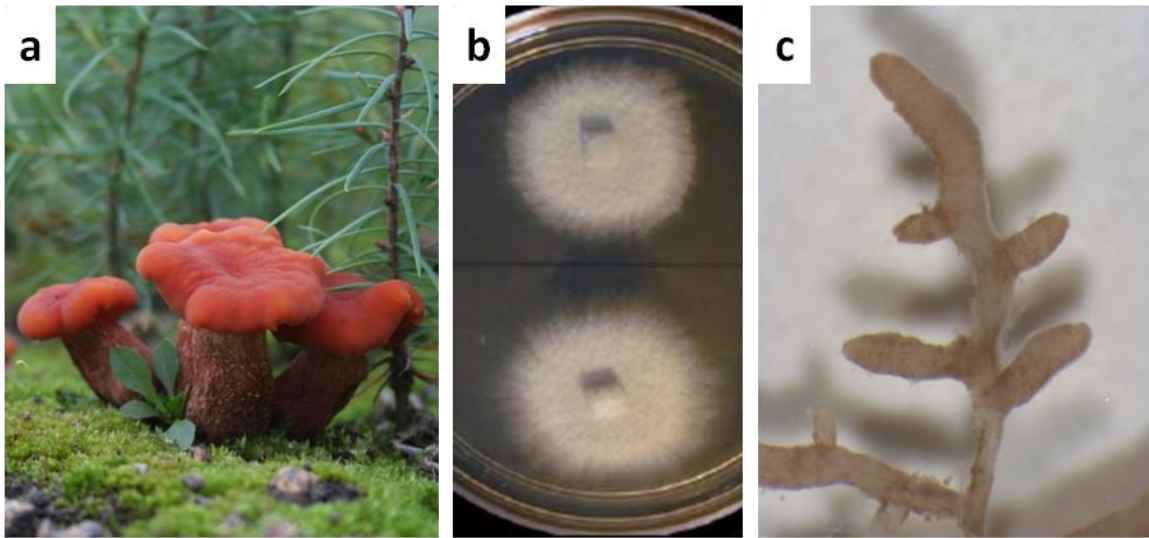


Figure I.7 : Les trois principaux stades de développement du champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor*.

- a) Carpophores: Le qualificatif bicolor fait référence à la coloration violette de la base du pied ainsi qu'à la couleur saumon du reste de la fructification.
- b) Mycélium végétatif: Il s'agit d'une culture *in vitro* sur milieu P5 de la souche dicaryotique S238N.
- c) Ectomycorhizes: Il s'agit d'ectomycorhizes obtenues en serre avec le peuplier *Populus trichocarpa*.

I.3.2.1. *Laccaria bicolor*, un modèle d'étude

La souche S238N de *L. bicolor* (Maire) Orton a été isolée par J. Trappe (Oregon State University, Corvallis, OR., USA) et R. Molina (USDA Forest Service, Corvallis, OR., France) à partir d'une fructification recueillie sous le pin Douglas *Tsuga mertensiana* (Bong.) Carr. à Crater Lake, Or., Etats-Unis en 1976 (Di Battista *et al.*, 1996). Elle a été par la suite transférée au laboratoire de microbiologie de l'INRA de Nancy, en France. Cette souche dicaryotique a depuis été introduite comme inoculum dans les pépinières et les plantations françaises. En effet, dans certains sites, la productions de bois des plants inoculés par *L. bicolor* S238N peut être doublée par rapport aux plants spontanément mycorhizés, deux ans après transplantation (Villeneuve *et al.*, 1991 ; Le Tacon *et al.*, 1997). En 1988, un ensemble de monocaryons a été obtenu à partir de la germination *in vitro* de spores isolées d'un basidiocarpe S238N issu de la mycorhization de *Laccaria* avec *Pseudotsuga menziesii* (Selosse *et al.*, 1996). C'est l'une de ces souches monocaryotique, S238N-H82, qui a été choisi pour le séquençage du génome de *L. bicolor*.

I.3.2.2. Le génome de *Laccaria bicolor*

Le génome de *L. bicolor* a été séquencé par le JGI et le Consortium du Génome de *Laccaria*. Le génome a été publié en 2006 par le JGI (<http://genome.jgi-psf.org/Lacbi2/Lacbi2.home.html>) et l'analyse à l'échelle génomique en 2008 par le Consortium du Génome de *L. bicolor* (Martin *et al.*, 2008). Le génome de *L. bicolor* est organisé en 12 chromosomes et mesure 64,9 Mb. Sa taille importante n'est pas due à de multiples duplications, mais à l'extension de plusieurs familles multigéniques. Le génome de *L. bicolor* code 23 132 protéines prédites. Il est étonnamment riche en transposons (21% du génome) et séquences répétées. C'est le premier génome de champignon symbiotique à avoir été séquencé. Il a permis l'analyse des traits métaboliques présents chez un champignon spécialisé dans l'exploitation des ressources nutritives du sol. Il a aussi permis d'étudier les caractéristiques de la niche symbiotique générée lors de l'interaction avec les racines de la plante hôte. La comparaison avec les génomes de champignons saprophytes et pathogènes a fourni de précieuses informations quant aux étapes évolutives menant aux différents modes de vie des champignons. De plus, l'analyse transcriptomique du développement mycorhizien à l'échelle génomique, côté plante et côté champignon, est maintenant techniquement possible et a apporté de nombreux résultats, notamment dans l'analyse du dialogue moléculaire qui s'opère entre les deux partenaires.

I.4. Le système immunitaire chez les plantes

I.4.1. L'immunité déclenchée par les Patrons Moléculaires Associés aux Microorganismes (MAMPs) (MTI)

En plus de barrières physiques et biochimiques préformées ou inductibles, les plantes ont des systèmes de surveillance et de détection qui ont évolué pour reconnaître des molécules de surface et/ou cytoplasmiques des microorganismes bénéfiques et pathogènes. Ces molécules sont plus connues sous le nom de « Patrons Moléculaires Associés aux Microorganismes (MAMPs) » (Shiu et Bleecker 2003). Les MAMPs sont généralement hautement conservés. Ils sont perçus par des récepteurs de l'hôte appelés récepteurs de reconnaissance des MAMPs (PRR) à un stade précoce de l'infection. C'est ce que l'on appelle l'immunité induite par les MAMPs (MAMP Triggered Immunity, MTI). Il s'agit d'une défense basale et cultivar non spécifique qui est efficace contre un large spectre de microorganismes. C'est la première barrière de défense établie par la plante (Boller et Felix, 2009 ; Jones et Dangl, 2006). Parmi les MAMPs exposés en surface capables de déclencher une MTI, on retrouve les flagellines bactériennes (Felix *et al.*, 1999), les lipopolysaccharides bactériens (Erbs et Newman 2003, Meyer *et al.*, 2001), les lipooligosaccharides des bactéries gram-négatives, la chitine des parois cellulaires fongiques (Bartnicki-Garcia 1968, Ren et West, 1992), l'invertase de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Basse *et al.*, 1992), ou encore le 1,3-1,6-hepta- β -glucoside de la paroi cellulaire de *Phytophthora sojae* (Sharp *et al.*, 1984a, Sharp *et al.*, 1984b). Parmi les MAMPs cytoplasmiques, on peut citer les protéines de réponse au froid et le facteur d'élongation Tu (Felix et Boller 2003, Kunze, *et al.*, 2004). La perception des MAMPs conduit à de nombreux changements moléculaires et physiologiques chez la plante (Nurnberger *et al.*, 2004). Parmi ceux-ci, la production massive d'espèces réactives de l'oxygène au site d'infection se traduit généralement par une mort cellulaire localisée, supposée limiter la propagation de l'agent pathogène. La synthèse d'un large panel de composés antimicrobiens tels que des phytoalexines et des protéines PR (pour *pathogenesis related*) est également induite afin de combattre l'infection.

Bien que la MTI ait été largement étudiée dans les feuilles au cours des dernières années, très peu de travaux ont été réalisés sur les racines, où résident la majorité des microbes bénéfiques pour les plantes. Ce n'est que récemment, que Millet et ses collaborateurs (2010) ont démontré que les racines d'*A. thaliana* répondent à différentes MAMPs de manière tissu-spécifique et que la signalisation immunitaire déclenchée par les MAMPs dans les racines est très similaire à celle observée dans des feuilles. Pour établir une interaction pathogène ou mutualiste avec la plante, les microbes doivent donc faire face aux réponses immunitaires de l'hôte, déclenchées localement dans les racines ou les feuilles suite à la perception MAMP. Une stratégie efficace que pourrait adopter un microorganisme afin d'éviter la mise en place d'une MTI, serait de modifier les MAMPs reconnus par les PRR. Toutes modifications des MAMPs n'est cependant pas possible, car elles sont souvent essentielles à la survie du pathogène (Göhre et Robatzek 2008). C'est pourquoi les microorganismes pathogènes et bénéfiques ont développé des stratégies pour réduire la stimulation et réprimer activement la MTI en sécrétant notamment des effecteurs (Göhre et Robatzek 2008 ; Zamioudis et Pieterse, 2012).

I.4.2. La régulation hormonale des défenses immunitaires

Plusieurs phytohormones interviennent dans la signalisation intercellulaire lors de l'interaction d'une plante et d'un agent pathogène. Il s'agit principalement de l'acide salicylique (AS), de l'éthylène (ET) et de l'acide jasmonique (AJ). Le rôle de l'AS, l'AJ et l'ET dans la mise en place des réactions de défense ainsi que les voies de signalisation qu'elles contrôlent sont de mieux en mieux comprises. Toutefois, il ne s'agit pas de voies de signalisation strictement cloisonnées et de nombreuses connections existent, formant un réseau de régulation complexe dans lequel la part de chaque phytohormone n'est pas toujours bien compris. Ces hormones ne ciblent pas toutes le même type d'agent pathogène. Ainsi les agents pathogènes (hémi)biotrophes sont sensibles aux réactions de défense régulées par l'AS tandis que les agents pathogènes nécrotrophes et les insectes sont sensibles aux réactions de défense mises en place par l'ET et l'AJ (Glazebrook, 2005 ; Thomma *et al.*, 2001). Dans un premier temps, ces trois voies seront présentées séparément de façon à cerner leurs principales caractéristiques, puis ensemble afin de donner une vision générale de l'étendue des connections qui existent. Une attention particulière sera accordée à la voie de signalisation induite par l'AJ du fait des résultats obtenus.

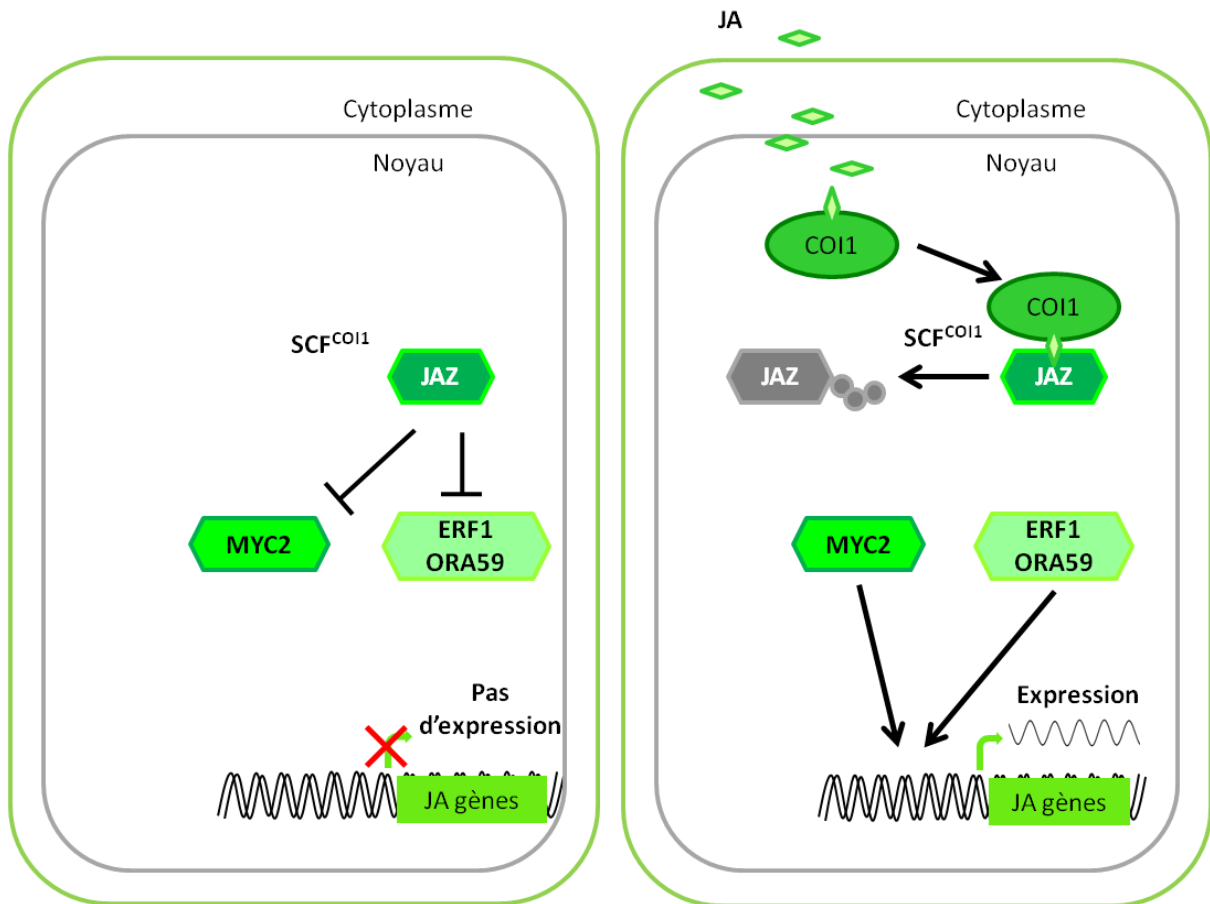


Figure I.8 : Représentation schématique de la cascade de régulation conduisant à l'expression des gènes de défense AJ dépendante.

I.4.2.1. La voie de signalisation induite par l'acide jasmonique (Figure I.8)

Les acides jasmoniques (AJ) sont des molécules dérivés de l'acide α -linoléinique contenu dans la membrane des plastes (Schaller et Stintzi, 2009). La voie de signalisation induite par l'AJ est initiée en réponse à des signaux environnementaux et développementaux (Mandaokar *et al.*, 2006; Dombrecht *et al.*, 2007). Chez *A. thaliana*, l'AJ est impliqué dans la régulation de nombreux processus physiologiques, tels que la fertilité (McConn et Browse, 1996; Stintzi et Browse, 2000), la croissance des racines (Staswick *et al.*, 1992.), la maturation des fruits (Perez *et al.*, 1997), le développement des trichomes (Qi *et al.*, 2011) et la sénescence (Xiao *et al.*, 2004). L'AJ est également impliqué dans les réponses à des stress abiotiques telles que la réponse à l'ozone, aux rayonnements UV (Conconi *et al.*, 1996), au sel, à la sécheresse (Zhu, 2002) et aux blessures mécaniques (Farmer *et al.*, 1992; Reymond *et al.*, 2000) ou biotiques, telles que les réactions de défense de la plante à la plupart des insectes herbivores (Howe *et al.*, 1996; McConn *et al.*, 1997) et aux micro-organismes nécrotrophes (Feys *et al.*, 1994 ; Glazebrook, 2005; Wasternack, 2007). Parmi tous les AJs trouvés dans la nature, l'AJ conjugué à l'isoleucine (AJ-Ile) est la forme active de l'hormone (Fonseca *et al.*, 2009b), tandis que la forme méthylée est la forme volatile probablement impliquée dans le transport.

L'AJ-Ile est perçue *via* un complexe de co-récepteurs formé par la protéine à domaine F-box, la CORONATINE-INSENSITIVE 1 (COI1) et des protéines de la famille JAZ qui comprend 12 membres chez *A. thaliana* (Chini *et al.*, 2007, 2009b; Thines *et al.*, 2007; Sheard *et al.*, 2010 ; Tableau I.2). Chez *A. thaliana*, le complexe de corécepteurs COI1-JAZ6 présente une affinité au moins 100 fois supérieure à l'AJ-Ile comparé aux protéines COI1 ou JAZ seules (Sheard *et al.*, 2010). La région C-terminale des récepteurs JAZ contenant le domaine Jas (JA-associated) est nécessaire et suffisante à l'interaction avec COI1 (Katsir *et al.*, 2008b). Chez certaines JAZ, le domaine Jas, d'abord décrit par Yan *et al.* (2007), possède à son extrémité N-terminale deux résidus basiques conservés essentiels à l'interaction JAZ-COI1 (Melotto *et al.*, 2008). Ainsi, l'interaction directe avec COI1 est démontrée pour JAZ1 (At1g19180), JAZ2 (At1g74950), JAZ3 (At3g17860), JAZ6 (At1g72450), JAZ9 (At1g70700), et JAZ10 (At5g13220) (Thines *et al.*, 2007; Melotto *et al.*, 2008; Chini *et al.*, 2009b; Chung et Howe, 2009; Yan *et al.*, 2009; Sheard *et al.*, 2010).

The JAZ	JAZ1	JAZ2	JAZ3	JAZ4	JAZ5	JAZ6	JAZ7	JAZ8	JAZ9	JAZ10 ^a	JAZ11	JAZ12
F-box receptor^a												
COI1 (At2g39940)	X	X	X			X			X	X		
bHLH TFs^b												
MYC2 (At1g32640)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
MYC3 (At4g17880)	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
MYC4 (At5g46760)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
GL3 (At5g41315)	X	X						X	X	X	X	
EGL3 (At1g63650)	X	X						X	X	X	X	
TT8 (At4g09820)	X	X						X	X	X	X	
R2R3 MYB TFs^c												
PAP1 (At1g56650)	X							X			X	
GL1 (At3g27920)	X							X		X	X	
MYB21 (At3g27810)	X							X		X	X	
MYB24 (At5g40350)	X							X		X	X	
TFs involved in other hormonal signaling pathways^d												
EIN3 (At3g20770)	X		X						X			
EIL1 (At2g27050)	X		X						X			
GAI (At1g14920)	X											
RGA (At2g01570)	X		X						X			
RGL1 (At1g66350)	X											
Corepressor proteins^e												
NINJA (At4g28910)	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
TOPLESS (At1g15750)					X			X				
HDA6 (At5g63110)	X		X					X				
JAZ proteins^f												
JAZ1 (At1g19180)	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
JAZ2 (At1g74950)	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X
JAZ3 (At3g17860)	X	X	X	X				X	X	X	X	
JAZ4 (At1g48500)	X		X	X				X	X	X	X	
JAZ5 (At1g17380)	X	X			X	X		X				X
JAZ6 (At1g72450)	X	X			X	X		X		X		X
JAZ7 (At2g34600)												
JAZ8 (At1g30135)	X	X	X	X	X	X			X	X		X
JAZ9 (At1g70700)	X	X	X	X				X	X	X	X	
JAZ10 ^g (At5g13220)	X	X	X	X		X		X	X	X	X	X
JAZ11 (At3g43440)	X	X	X	X					X	X		
JAZ12 (At5g20900)	X	X			X	X		X		X		

Crosses indicate direct protein-protein interactions with a particular JAZ protein demonstrated with Y2H.

^aY2H data from Thines et al. (2007), Melotto et al. (2008), Chini et al. (2009b), Chung and Howe (2009), and Sheard et al. (2010).

^bY2H data from Chini et al. (2009b), Cheng et al. (2011), Fernández-Calvo et al. (2011), Niu et al. (2011), and Qi et al. (2011).

^cY2H data from Qi et al. (2011) and Song et al. (2011).

^dY2H data from Hou et al. (2010) and Zhu et al. (2011).

^eY2H data from Pauwels et al. (2010), Zhu et al. (2011), and Arabidopsis Interactome Mapping Consortium (2011).

^fY2H data from Chini et al. (2009b) and Chung and Howe (2009).

^gOnly Y2H with the clone corresponding to the JAZ10.1 splicing variant is shown.

Tableau I.2 : Liste récapitulative de toutes les protéines interagissant en système double hybride en levure avec les récepteurs JAZ d'*A. thaliana* (Pauwels et Goossens, 2011).

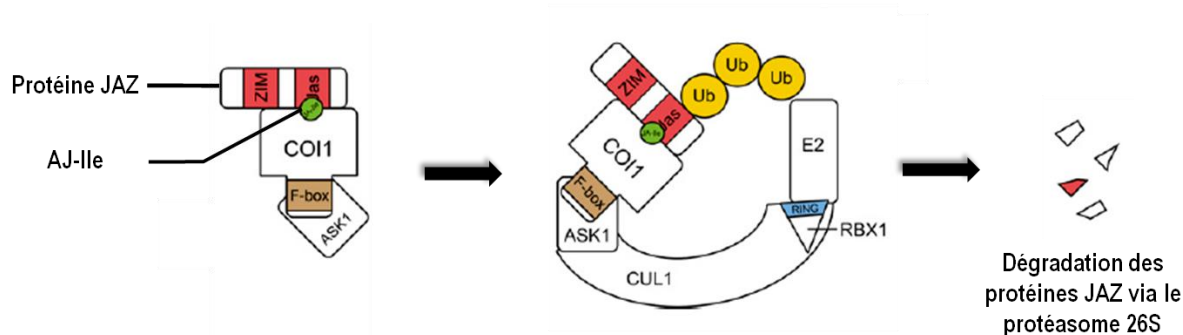


Figure I.9 : Modélisation du rôle du complexe SFC^{COI1} de type E3 ubiquitine ligase dans la dégradation des protéines JAZ (Pauwels et Goossens, 2011).

COI1 est une protéine nucléaire qui fait partie d'un complexe SCF (Skip-Cullin-F-box) de type E3 ubiquitine ligase requis pour toutes les réponses dépendantes de l'AJ testées à ce jour (Feys *et al.*, 1994; Xie *et al.*, 1998; Katsir *et al.*, 2008; Chini *et al.*, 2009a; Fonseca *et al.*, 2009a). Les plantes d'*A. thaliana* dépourvues du gène *coil* sont plus sensibles aux agents pathogènes nécrotrophes tels que *A. brassicicola* et *B. cinerea* (Thomma *et al.*, 1998; Lorenzo *et al.*, 2003) mais plus résistantes aux agents pathogènes bactériens biotrophes de type *P. syringae*, et montrent des niveaux élevés d'AS, ce qui est cohérent avec le rôle antagoniste des voies de signalisation induites par l'AS et de l'AJ démontré chez *A. thaliana* (Kloek *et al.*, 2001).

Les protéines à domaine F-box, comme COI1 forment, avec les protéines Skip1 (AsSK1 sur la figure I.9), des adaptateurs de substrat qui, lorsqu'elles sont liées à leur cible, sont recrutées par des cullines pour compléter le complexe SCF de type E3 ubiquitine ligase (Hua et Vierstra, 2011). Il est aujourd'hui largement admis que la protéine à F-box COI1, reconnaît et se lie aux protéines cibles JAZ en présence d'AJ-Ile. Le complexe SFC transfère ensuite des protéines ubiquitine sur les protéines JAZ, déclenchant ainsi sa dégradation *via* le protéasome 26S (Figure I.9) (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007). Néanmoins, peu d'études sont menées sur la (poly-) ubiquitination des récepteurs JAZ et AtJAZ6 est à ce jour la seule protéine JAZ pour laquelle une ubiquitinylation a été démontrée (Saracco *et al.*, 2009).

Les co-récepteurs JAZ régulent négativement la voie de signalisation dépendante de l'AJ en empêchant directement ou non l'activité d'un activateur de transcription (TF) contrôlant l'expression de gènes inductibles par l'AJ (Chini *et al.*, 2007, 2009b; Thines *et al.*, 2007; Sheard *et al.*, 2010; Fernandez-Calvo *et al.*, 2011; Pauwels et Goossens, 2011). Plusieurs modèles d'inhibition sont proposés et illustrés dans la figure I.10. Dans des conditions normales, la répression des TFs par les protéines JAZ peut nécessiter le recrutement des co-répresseurs TOPLESS (TPL) et TPL-like (TPR) par le biais de protéines adaptatrices NINJA (Pauwels *et al.*, 2010; Figure I.10B). Chez *A. thaliana*, les protéines NINJA se fixent au niveau du domaine ZIM de la plupart des JAZ, exception faite de JAZ7 et JAZ8 (Tableau I.2). Elles contiennent un motif EAR (ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression) dans leur extrémité N-terminale par lequel elles interagissent avec les protéines co-répresseur TPL et TPL-like (Pauwels *et al.*, 2010). Les protéines NINJA sont des protéines adaptatrices qui lient les complexes formés par les récepteurs JAZ et les protéines TPLs (Pauwels *et al.*, 2010). Quatre des 12 protéines JAZ d'*A. thaliana* (JAZ5, JAZ6, JAZ7 et JAZ8) contiennent des motifs EAR (Kagale *et al.*, 2010), ce qui suggère qu'elles sont capables d'interagir directement avec des protéines TPLs.

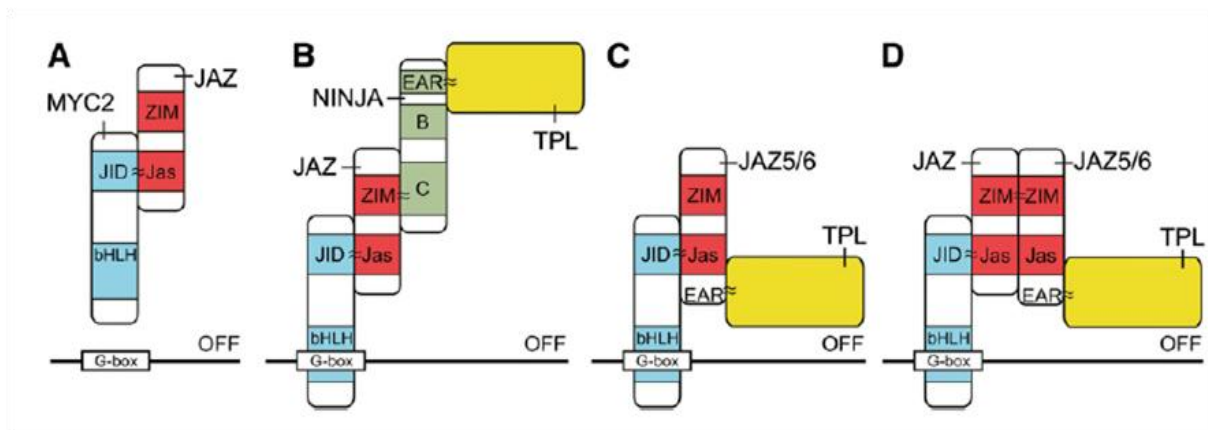


Figure I.10 : Modèles de répression d'un facteur de transcription par les récepteurs JAZs (Pauwels et Goossens, 2011). A) JAZ en interagissant directement avec MYC2 empêche sa fixation aux promoteurs de ses gènes cibles. B) La protéine adaptatrice NINJA se fixe sur JAZ et recrute un co-répresseur TPL pour inhiber l'activité transcriptionnelle de MYC2. C) JAZ5 / 6 possèdent un motif EAR de fixation aux corépresseurs TPLs et recrutent directement une protéine TPL pour inhiber l'activité transcriptionnelle de MYC2. D) JAZ forme un hétérodimère avec JAZ5 / 6 qui recrute un co-répresseur TPL pour inhiber l'activité transcriptionnelle de MYC2.

A ce jour, seule l'interaction directe de JAZ5 et JAZ8 avec des protéines TPLs été démontrée en système double hybride en levure (Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011 ; Figure I.10C et I.10D, Tableau I.2) et la validation de ces interactions par d'autres méthodes reste à faire. AtJAZ7 est la seule protéine JAZ pour laquelle aucune interaction avec des protéines NINJA et TPLs n'a été détectée. Il a ainsi été suggéré que AtJAZ7 réprime seule et directement l'activité des facteurs de transcription qui lui sont associés (Figure I.10A).

En présence d'AJ-Ile, les protéines JAZ sont dégradées et cela se traduit par la libération des TFs par les protéines NINJA et TPL et par l'activation des réponses transcriptionnelles médiées par l'hormone (Chini *et al.*, 2007; Maor *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Saracco *et al.*, 2009; Pauwels *et al.*, 2010; Sheard *et al.*, 2010).

Plusieurs facteurs de transcription responsables de l'activation des réponses dépendantes de l'AJ ont été identifiés tels que les TFs de la famille bHLH (basic helix-loop-helix) MYC2, MYC3 et MYC4 (Chini *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2011; Fernandez-Calvo *et al.*, 2011; Niu *et al.*, 2011). Fernandez-Calvo *et al.* (2011) ont montré que MYC3 et MYC4 sont des activateurs transcriptionnels capables d'activer l'expression de gènes en réponse à l'AJ et en particulier certains activés par MYC2. Cependant, alors que MYC2 joue un rôle majeur dans l'inhibition de la croissance racinaire par l'AJ, MYC3 et MYC4 seraient plutôt impliqués dans la réponse aux herbivores. En effet, le triple mutant *myc2myc3myc4* est affecté comme le mutant *coi1* dans l'activation de différentes réponses médiées par l'AJ, comme la sensibilité à la bactérie hémibiotrophe *Pseudomonas syringae*, la résistance à l'insecte *Spodoptera littoralis* et l'induction de l'expression de gènes dépendante de l'AJ (JAZ10 et VSP2) (Fernandez-Calvo *et al.*, 2011). Cette étude suggère que MYC2, MYC3 et MYC4 présentent une redondance fonctionnelle partielle et ont évolué vers des fonctions plus spécifiques. Ces deux dernières années, d'autres TFs cibles des protéines JAZ ont été identifiés (Tableau I.2). Cela inclus d'autres TFs bHLH tels que GL3 (GLABRA3), EGL3 (ENHANCER of GLABRA3) et TT8 (TRANSPARENT TESTA8), des TFs R2R3 MYB tels que PAP1 (PRODUCTION of ANTHOCYANINE PIGMENT1), GL1, MYB75, MYB21 et MYB24 (Qi *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2011) ainsi que des TFs impliqués dans d'autres voies de signalisation hormonales, dépendante de l'éthylène (ET) et de l'acide gibbéréllique (AG), comme EIN3 (ETHYLENE INSENSITIVE3), EIL1 (ETHYLENE INSENSITIVE 3 LIKE1), ERF1 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1) ou ORA59 (OCTADECANOID-RESPONSIVE ARABIDOPSIS AP2/ERF 59), GAI (GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE), RGA (REPRESSOR OF GA), et RGL1 (RGA-LIKE1) (Lorenzo *et al.*, 2005 ; Pré *et al.*, 2008 ; Hou *et al.*, 2010 ; Zhu *et al.*, 2011 ; Pauwels et Goosens, 2011 ; Kazan *et al.*, 2013).

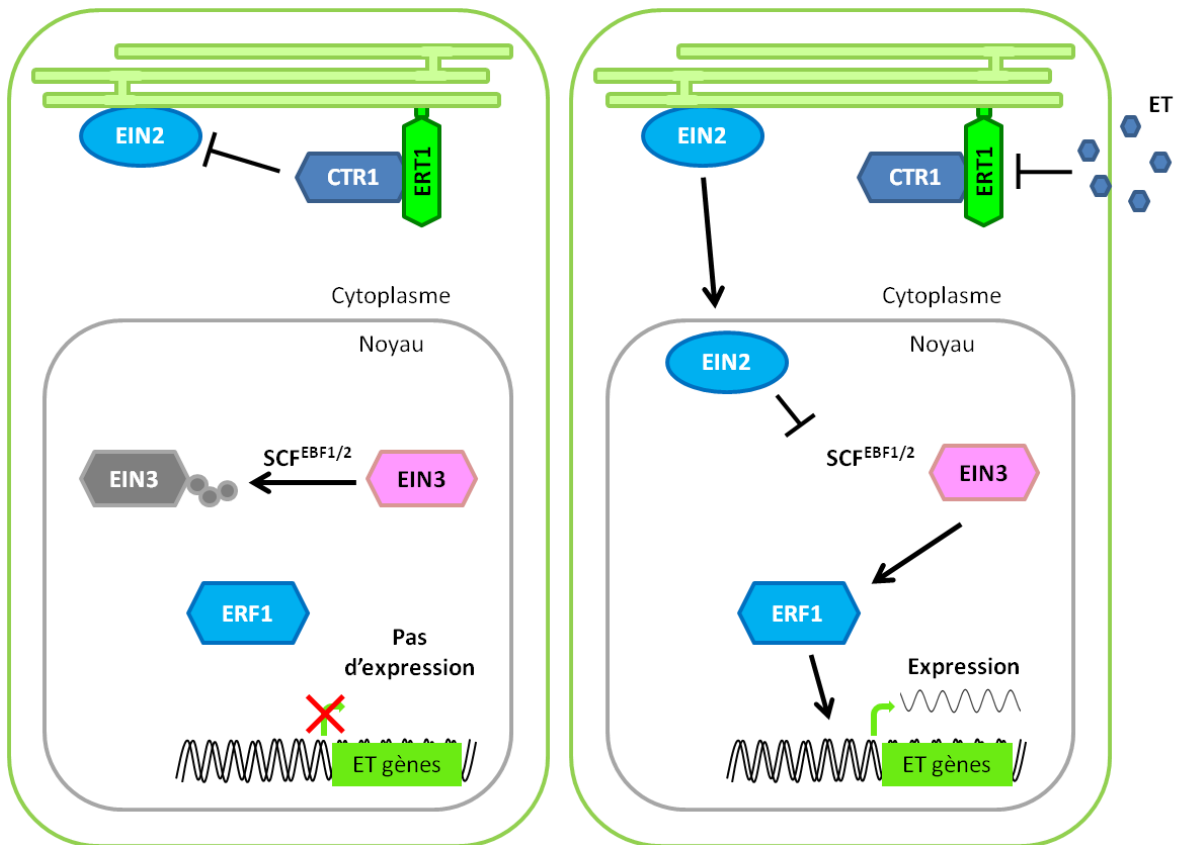


Figure I.11 : Représentation schématique de la cascade de régulation conduisant à l'expression des gènes de défense dépendante de l'éthylène.

Ces travaux confirment les interconnexions qui existent entre les différentes voies de signalisation hormonales et notamment avec la voie de signalisation dépendante de l'ET (Bari et Jones, 2009; Grant et Jones, 2009; Kuppusamy *et al.*, 2009; Pauwels *et al.*, 2009; Van der Ent *et al.*, 2009; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

I.4.2.2. La voie de signalisation induite par l'éthylène (Figure I.11)

Dans la voie de signalisation induite par l'ET, l'ET est perçu par des récepteurs membranaires tels que ETR1 (ETHYLENE RESPONSE 1), ERS1 (ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1), ETR2 (ETHYLENE RESPONSE 2), ERS2 (ETHYLENE RESPONSE SENSOR 2), et EIN4 (ETHYLENE INSENSITIVE 4; Bleecker *et al.*, 1988; Ecker, 1995; Hua *et al.*, 1998). ETR1 a été démontré comme étant localisé au niveau du réticulum endoplasmique (Chen *et al.*, 2002 ; Kendrick *et al.*, 2008). La liaison de l'éthylène se fait au niveau du domaine transmembranaire du récepteur ETR1 (Wang *et al.*, 2006). Génétiquement, ces récepteurs sont des régulateurs négatifs de la réponse à l'ET. Dans des conditions normales, lorsque le niveau d'ET est faible, ils maintiennent la régulation négative d'une kinase à sérine / thréonine de type Raf-like CTR1 (Constitutive Triple Response 1) sur un régulateur positif localisé dans le réticulum endoplasmique EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE 2) (Kieber *et al.*, 1993 ; Gao *et al.*, 2003 ; Alonso *et al.*, 2003 ; Bisson *et al.*, 2009). L'interaction physique de CTR1 avec EIN2 a été démontré (Clark *et al.*, 1998). Suite à la perception d'ET émis par le microorganisme et / ou issu des blessures, la répression de CTR1 sur EIN2 est levée, entraînant l'activation des facteurs de transcription EIN3 et EIL1 (Chao *et al.*, 1997). Le niveau des protéines de type EIN3 est régulé *via* l'interaction avec deux protéines de type F-box EBF1 et EBF2 (EIN3 binding F-box 1 et 2) qui les destinent à la dégradation *via* l'E3-ubiquitine ligase SCF^{EBF1/2} / 26S protéasome (Guo et Ecker, 2003; Potuschak *et al.*, 2003; Binder *et al.*, 2007). Ainsi, en présence d'ET, EIN2 inhiberait la dégradation des facteurs de transcription de type EIN3 par le protéasome. Ces facteurs de transcription activent à leur tour d'autres facteurs de transcription tels qu'ERF1, ce qui conduit à l'expression des gènes inductibles par l'ET. EIN3 et EIL1 font partie d'une famille multigénique composée de six membres chez *A. thaliana* (Wang *et al.*, 2002). EIN3 et EIL1 sont impliqués dans un grand nombre de réponses parmi lesquelles, les réactions de défense aux agents pathogènes (Guo et Ecker, 2004).

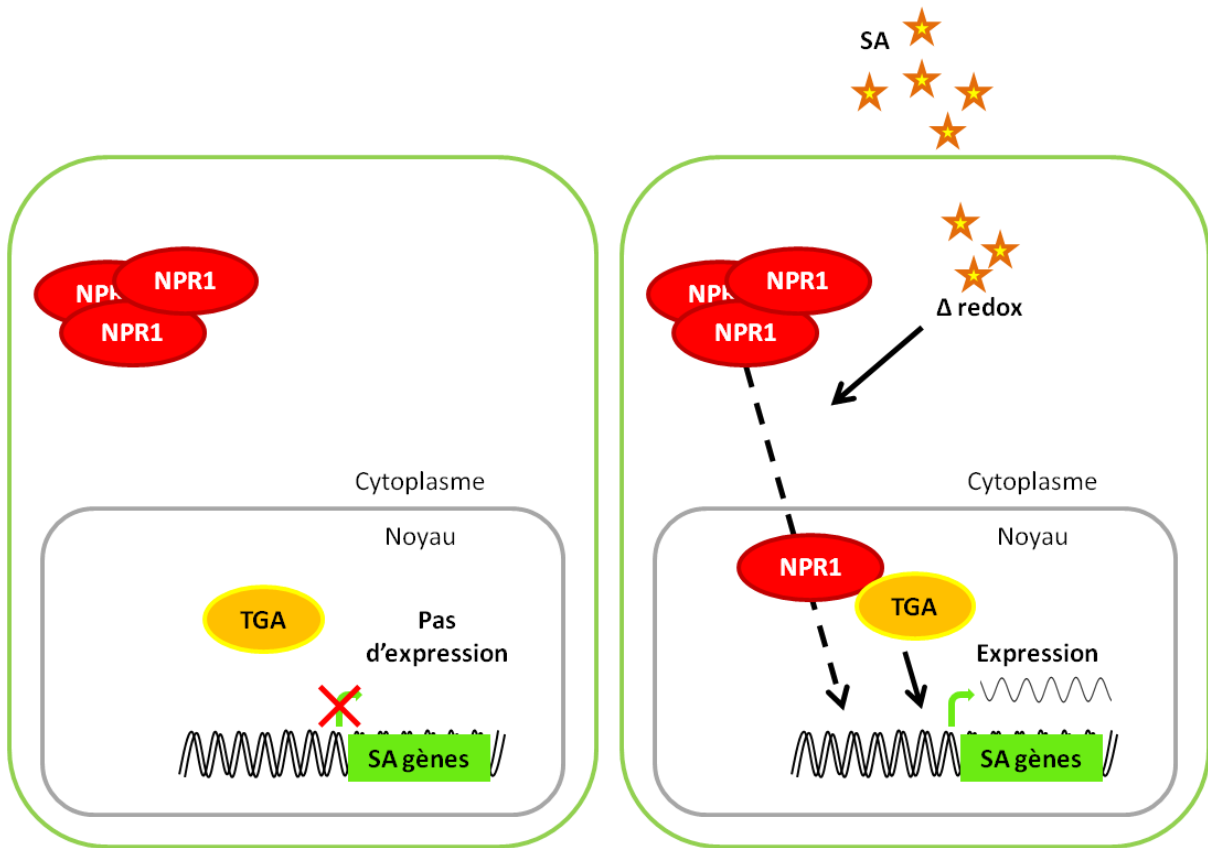


Figure I.12 : Représentation schématique de la cascade de régulation conduisant à l'expression des gènes de défense AS dépendante.

I.4.2.3. La voie de signalisation induite par l'acide salicylique (Figure I.12)

La séquence d'événements allant de la reconnaissance du pathogène au niveau local à l'induction de l'expression des gènes de défense liée à l'AS est extrêmement complexe. Mais il est évident que le régulateur protéique NPR1 (Nonexpressor of Pathogenesis-Related Genes1) aussi connu sous le nom de NIM1 (Non Immunity 1) joue un rôle crucial. Il est considéré comme un régulateur positif central de la cascade de signalisation qui mène à l'expression des gènes de défense tels que ceux codant les protéines PRs (Durrant et Dong 2004; Pieterse et Van Loon 2004). Les plants d'*A. thaliana* mutants *npr1*, ne sont plus capables de percevoir l'AS et sont donc hyper sensibles à l'attaque par des agents pathogènes biotrophes (Cao *et al.*, 1994). La fixation de l'AS à SABP2 (Salicylic Acid Binding Protein 2), une protéine de liaison à l'AS provoque un changement du potentiel redox du milieu intracellulaire (Dong, 2004 ; Mou *et al.*, 2003). Les oligomères de NPR1 sont alors convertis en monomères capables de migrer vers le noyau où NPR1 induit indirectement la transcription des gènes *PRs* en interagissant avec des facteurs de transcription de la famille TGA. Ces facteurs TGA activés se lient au promoteur de certains gènes codant les protéines PRs et induisent leur transcription (Durrant et Dong 2004). La mise en place des réactions de défense étant un processus coûteux pour la plante, la transcription des gènes qui y sont associés doit être étroitement régulée. En plus du régulateur positif NPR1, il a été isolé chez *A. thaliana* un régulateur négatif SNI1 (Suppressor of NPR1, Inducible 1), nécessaire pour amortir l'expression basale des gènes codant les protéines PRs (Li *et al.*, 1999; Mosher *et al.*, 2006). Cette protéine SNI1 s'accumule dans le noyau et réprime les gènes stimulés par NPR1 (Mosher *et al.*, 2006). De plus, il a récemment été démontré que les paralogues de NPR1, NPR3 et NPR4, sont des récepteurs de l'AS qui lient l'AS avec des affinités différentes (Fu *et al.*, 2012 ; Moreau *et al.*, 2012). NPR3 et NPR4 fonctionnent comme des adaptateurs de l'ubiquitine E3 ligase Cullin 3 et médient la dégradation de NPR1 de manière AS-dépendante. NPR4 n'interagit avec NPR1 qu'en l'absence d'AS. Une faible concentration en AS suffit à empêcher cette interaction (Fu *et al.*, 2012). NPR4 permettrait donc de limiter l'activation des réactions de défense en l'absence d'agents pathogènes. A l'opposé, NPR3 n'interagit avec NPR1 qu'en présence de fortes concentrations en AS (Fu *et al.*, 2012). Or de précédentes études montrent que de fortes concentrations en AS facilitent la mort cellulaire programmée (Torres *et al.*, 2005 ; Lu *et al.*, 2009) et suggèrent que NPR1 supprime la réaction hypersensible (Rate et Greenberg, 2001).

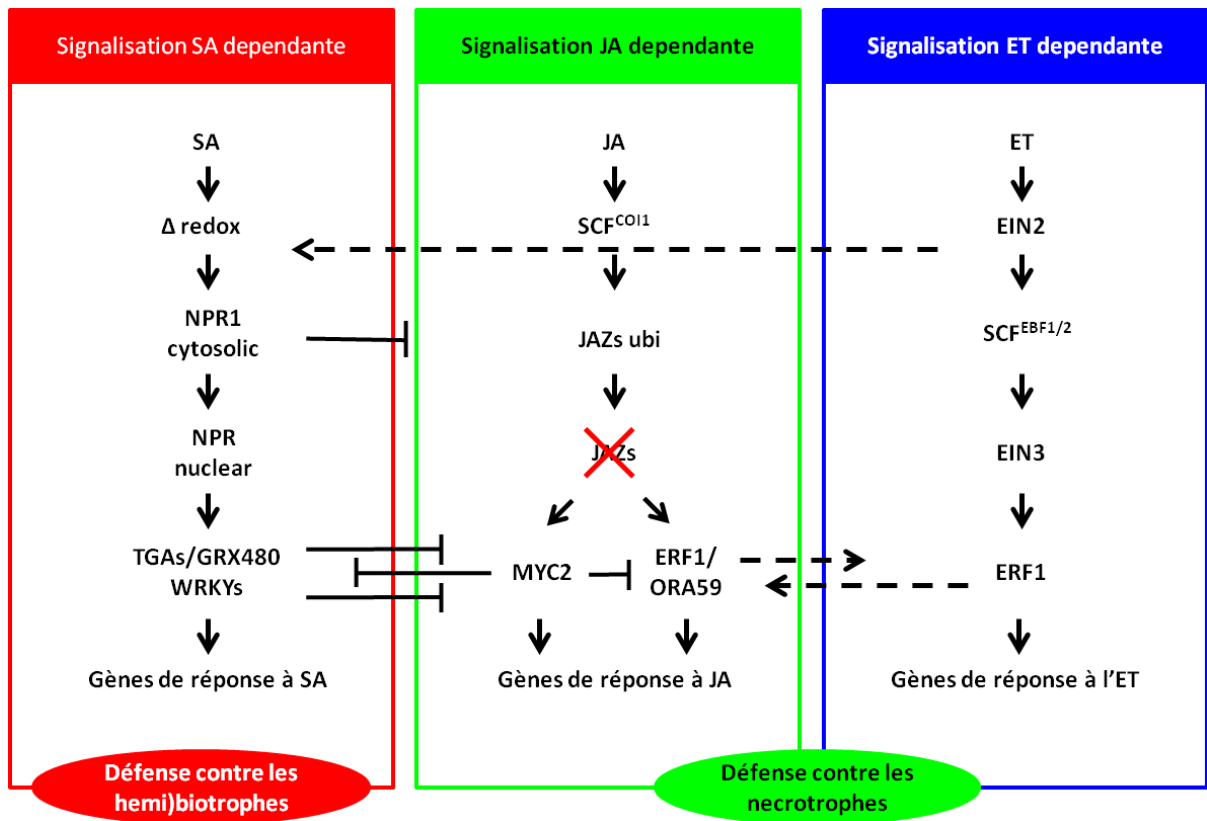


Figure I.13 : Représentation schématique des interconnexions qui existent entre les voies de signalisation ET-, AJ- and AS-dépendantes. T, effet négatif ; Flèche en pointillés, effet positif.

L'hypothèse émise est que NPR3 favoriserait la mise en place de la mort cellulaire programmée au niveau du site d'infection où la concentration en AS est élevée ainsi que sa restriction dans les cellules voisines où la concentration en AS est plus faible. Ainsi NPR1 pourrait s'accumuler et la réponse systémique acquise être mise en place.

I.4.2.4. Les connections entre les voies de signalisation AS et AJ dépendantes (Figure I.13)

Ces dernières années, plusieurs protéines avec un rôle important dans l'équilibre entre les voies de signalisation médiées par l'AS et l'AJ ont été identifiées chez *Arabidopsis thaliana* (Koornneef *et al.*, 2008). Parmi ces protéines, on retrouve la protéine kinase MPK4 (Petersen *et al.*, 2000), les protéines semblables à des lipases EDS1 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1) et PAD4 (PHYTOALEXIN-DEFICIENT4) (Brodersen *et al.*, 2006), NPR1 (Spoel *et al.*, 2003), la glutarédoxine GRX480 (Ndamukong *et al.*, 2007) et les facteurs de transcription WRKY tels que WRKY70 (Li *et al.*, 2004). La majorité de ces protéines est essentielle à la transduction du signal AS, NPR1 ayant un rôle central. NPR1 agit en aval d'EDS1 et PAD4 dans la voie de signalisation médiée par l'AS (Brodersen *et al.*, 2006) et régule l'expression AS dépendante des gènes GRX480 et WRKY70. Ces derniers codent des protéines qui suppriment l'expression des gènes dépendants de l'AJ (Ndamukong *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2004).

En plus de fonctionner comme un coactivateur transcriptionnel essentiel à l'expression des gènes de défense codant les protéines PRs, dépendant de l'AS (Dong, 2004), NPR1 est un régulateur négatif important de la voie de signalisation médiée par l'AJ (Spoel *et al.*, 2003 ; Pieterse et Van Loon, 2003). Chez *A. thaliana*, la capacité de l'AS à supprimer l'expression des gènes inductibles par l'AJ coïncide avec une augmentation du niveau de glutathion, un déterminant majeur de l'homéostasie redox cellulaire (Koornneef *et al.*, 2008). Cela suggère que la modulation de l'état redox intracellulaire par l'AS est essentielle à l'atténuation de la voie de signalisation liée à l'AJ. De plus, la localisation nucléaire de la forme activée de NPR1 n'est pas nécessaire à la répression des gènes inductibles par l'AJ, indiquant que l'effet antagoniste de l'AS sur la voie de signalisation médiée par l'AJ serait modulé par NPR1 dans le cytosol (Koornneef *et al.*, 2008 ; Glazebrook *et al.*, 2005). Chez le riz (*Oryza sativa*), des résultats similaires ont été observés (Yuan *et al.*, 2007).

Ainsi, la protéine NPR1 est impliquée dans le dialogue moléculaire entre les voies de signalisation AS- et AJ-dépendantes lorsqu'elle est cytoplasmique et dans l'activation des gènes de défense AS inductibles, lorsqu'elle est nucléaire. La protéine NPR1 a également été impliquée dans plusieurs réponses de défense dépendantes de l'AJ et de l'ET, que ce soit lors d'interactions bénéfiques avec des rhizobactéries (Van Wees *et al.*, 2008) ou lors d'interactions avec des agents pathogènes tel que *Verticillium longisporum* (Johansson *et al.*, 2006). Toutefois, les mécanismes moléculaires par lesquels NPR1 exerce ce rôle restent à élucider. Le TF MYC2 prend également part à ce dialogue moléculaire. En effet, c'est régulateur négatif de la voie de signalisation induite par l'AS. Des mutants *myc2* d'*A. thaliana* présente des concentrations importantes en AS, surexpriment des gènes codant des PR protéines et sont plus résistants à *P. syringae* comparé à des plantes sauvages (Nickstadt *et al.*, 2004 ; Laurie-Berry *et al.*, 2006). De plus le triple mutant *myc2myc3myc4* présente un niveau de résistance à *P. syringae* similaire à celui des mutants *coil* (Fernandez-Calvo *et al.*, 2011). Ainsi MYC2 semble être un acteur important des voies de signalisation AS-, AJ- et ET-dépendantes.

I.4.2.5. Les connections entre les voies de signalisation AJ- et ET-dépendantes (Figure I.13)

Dans de nombreux cas, les voies de signalisation AJ- et ET-dépendantes agissent en synergie. Par exemple, chez *A. thaliana*, la régulation du gène codant la défensine PDF1.2, nécessite l'activation concomitante des réponses de défense dépendantes de l'AJ et de l'ET (Penninckx *et al.*, 1998). Les facteurs de transcription, ERF1 et ORA59, sont deux acteurs importants des voies de signalisation AJ- et ET-dépendantes (Pré *et al.*, 2008 ; Lorenzo *et al.*, 2003). L'expression des gènes *ERF1* et *ORA59* est induite par l'AJ et l'ET. De plus, la surexpression des facteurs de transcription *ERF1* ou *ORA59* chez le mutant insensible à l'AJ, *coil*, ou d'*ERF1* chez le mutant insensible à l'ET, *ein2*, se traduit par l'expression constitutive du gène *PDF1.2* (Pré *et al.*, 2008 ; Lorenzo *et al.*, 2003). Cela suggère que ces facteurs de transcription sont des points de convergence importants des voies de signalisation AJ et ET dépendantes.

Le facteur de transcription MYC2 joue également un rôle essentiel dans la signalisation dépendante de l'AJ (Lorenzo et Solano, 2005) et régule de façon différentielle deux classes distinctes de gènes inductibles par l'AJ. MYC2 fonctionne comme un régulateur positif des gènes inductibles par l'AJ tels que *Vsp2* et *LOX2*, alors qu'il agit comme un régulateur négatif des gènes inductibles par l'AJ et l'ET tels que PDF1.2 qui sont activés par les ERFs (Lorenzo *et al.*, 2004). Ainsi, la « branche » ERF de la réponse à l'AJ est activée en présence d'AJ et d'ET, tandis que la branche MYC2 n'est activée qu'en présence d'AJ. Une telle différence de réponse est clairement observée après infection d'*A. thaliana* par un pathogène nécrotrophe tel qu'*Alternaria brassicicola*, qui induit la production d'AJ et d'ET, et par un pathogène biotrophe tel que *Fusarium occidentalis*, qui stimule la biosynthèse d'AJ, mais pas d'ET (De Vos *et al.*, 2005 ; Glazebrook, 2005). Par conséquent, le choix des ERFs ou de MYC2 permet à la plante d'activer l'ensemble des gènes inductibles par l'AJ les plus adaptés à sa défense dans un environnement donné. Récemment, Zhou et ses collaborateurs ont montré que les protéines JAZ interagissent directement avec des TFs associés à la voie de signalisation hormonale induite par l'ET comme EIN3 et EIL1. Se faisant, elles inhibent leur activité transcriptionnelle via le recrutement d'un co-répresseur HISTONE DEACETYLASE 6 (HD6 ; Zhu *et al.*, 2011). La présence d'AJ se traduit par la levée de la répression exercée par les protéines JAZs sur les TFs EIN3/EIL1 et par une induction de l'expression du gène *ERF1* et de ses gènes cibles (Zhu *et al.*, 2011). Ces travaux constituent une nouvelle preuve des connections qui existent entre les voies de signalisation hormonales induites par l'ET et l'AJ. Par ailleurs, EIN3 et EIL1 sont connus pour réprimer l'expression du gène *SID2* (SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT 2) codant une isochorismate synthase nécessaire à la biosynthèse de l'AS (Chen *et al.*, 2009). Ainsi, il est possible que les co-répresseurs JAZs soient également à l'origine de l'antagonisme des voies de signalisation induites par l'AJ et l'AS *via* la régulation des TFs EIN3 et EIL1.

I.4.2.6. Les connections entre les voies de signalisation ET- et AS-dépendantes (Figure I.13)

L'ET joue un rôle important dans la mise en place des réactions de défense de la plante aux attaques des agents pathogènes et des insectes (Van Loon *et al.*, 2006 ; Von Dahl et Baldwin, 2007). Depuis quelques années, il existe quelques évidences d'un dialogue moléculaire entre les voies de signalisation de l'ET et de l'AS.

L'étude de plants de tabac insensibles à l'ET (Tetr) a montré que l'ET est essentiel au déclenchement de réactions de défense dépendantes de l'AS lors d'une infection par le virus de la mosaïque du tabac (Verberne *et al.*, 2003). De plus, l'ET améliore la réponse d'*A. thaliana* à l'AS, ce qui conduit à une expression plus efficace du gène de réponse à l'AS *PR-1* (Lawton *et al.*, 1994 ; De Vos *et al.*, 2006). Cet effet synergique de l'ET sur l'expression du gène codant PR-1, inductible par l'AS, est inhibé chez le mutant ET insensible *ein2* (De Vos *et al.*, 2006). La modulation de la voie de signalisation de l'AS par l'ET est donc EIN2 dépendante. Dans le pathosystème *P. syringae-A. thaliana*, Glazebrook et ses collaborateurs (2003) ont montré que l'expression de nombreux gènes AS inductibles est significativement affectée chez le mutant *ein2*.

I.5. Les effecteurs

I.5.1. Définition d'un effecteur

Le terme « effecteur » est longtemps resté confiné au domaine de la phytopathologie moléculaire. Les effecteurs sont définis dans la littérature comme des protéines, et plus largement des petites molécules, sécrétées par les microorganismes pathogènes pour modifier la structure et/ou la fonction de la cellule végétale hôte. Ces altérations, peuvent faciliter l'infection (facteurs de virulence et toxines), empêcher le déclenchement des réactions de défense (facteurs d'avirulence et éliciteurs) ou les deux (Huitema *et al.*, 2004; Kamoun. 2006, 2007). Ces modifications peuvent s'étendre au phénotype de la plante hôte. En 1999, Richard Dawkins introduisait le concept de «phénotype étendu» (dont les effets vont au-delà des cellules dans lesquelles le pathogène réside) pour qualifier ce type de modification.

I.5.2. La localisation d'un effecteur

Deux types d'effecteurs sont distingués en fonction de leur localisation. Il s'agit des effecteurs apoplastiques, qui restent et agissent à l'extérieur de la cellule végétale, et des effecteurs cytoplasmiques, qui pénètrent à l'intérieur des cellules végétales.

Beaucoup d'effecteurs agissent dans l'espace extracellulaire, à l'interface plante-microorganismes, où ils interfèrent avec les défenses apoplastiques de la plante (Kamoun, 2006; Misas-Villamil et van der Hoorn, 2008 ; Win *et al.*, 2012 ; Doehlemann et Hemetsberger, 2013). Ils sont qualifiés d'effecteurs apoplastiques. Nombreux sont ceux qui ont pour fonction d'inhiber et de protéger contre les enzymes hydrolytiques des plantes, telles que les protéases, les glucanases, et les chitinases. *Cladosporium fulvum* sécrète, par exemple, Avr2 qui est un inhibiteur de cystéine protéases ayant pour cible les cystéine protéases apoplastiques Rcr3 et PIP1 de la tomate (Rooney *et al.*, 2005; Shabab *et al.*, 2008; Van Esse *et al.*, 2008). *Phytophthora infestans* est également connu pour sécréter des inhibiteurs de glucanases qui inhibent l'enzyme végétale apoplastique endo- β -1, 3 glucanase (Figure20) (Damasceno *et al.*, 2008; Rose *et al.*, 2002).

D'autres effecteurs sont libérés dans les cellules hôtes. Ils sont qualifiés de d'effecteurs cytoplasmiques. L'évolution a sélectionné chez les agents pathogènes de plante (bactéries, champignons, oomycètes et nématodes) de nombreuses structures d'infection supposées ou démontrées comme étant importantes pour le transport des effecteurs dans la cellule végétale. Les bactéries à Gram négatif utilisent des systèmes de sécrétion très spécialisés tel que le système de sécrétion de type 3 (Abramovitch *et al.*, 2006; Block *et al.*, 2008; Galan et Wolf-Watz, 2006; McCann et Guttman, 2008; Zhou et Chai, 2008). Les champignons biotrophes et les oomycètes peuvent utiliser des haustoria, des structures spécialisées qui se forment dans les cellules végétales et sont entourées par une membrane plasmique végétale modifiée, appelée membrane extrahaustoriale (Hahn et Mendgen, 2001; Panstruga, 2003 ; Catanzariti *et al.*, 2006; Dodds *et al.*, 2004; Kemen *et al.*, 2005; Whisson *et al.*, 2007). Certaines protéines fongiques, notamment la toxine hôte-sélective ToxA de *Pyrenophora tritici-repentis*, n'ont pas besoin de l'aide du champignon pour être transloquées dans les cellules végétales (Manning et Ciuffetti 2005; Sarma *et al.*, 2005). ToxA est probablement transportée à l'intérieur des cellules hôtes par le biais d'un récepteur de surface des plantes qui se lie au motif Arg-Gly-Asp (RGD) (Manning *et al.*, 2008). Les nématodes, quant à eux, utilisent un organe d'alimentation spécialisé connu sous le nom de stylet pour injecter leurs protéines effectrices dans les cellules parasitées du système vasculaire des plantes (Davis *et al.*, 2008 ; Rosso *et al.*, 2012).

I.5.3. Les cibles d'un effecteur

Un effecteur peut avoir une ou plusieurs cibles. Par exemple, AvrRpt2 de *Pseudomonas syringae* est transloqué via le système de sécrétion de type 3 dans la plante hôte et possède une activité protéolytique contre au moins cinq protéines d'*Arabidopsis*, y compris le régulateur de défense négative RIN4 (Chisholm *et al.*, 2005; Takemoto et Jones, 2005).

Chaque interaction d'un effecteur et de sa protéine cible peut avoir un effet bénéfique, négatif, ou neutre pour l'agent pathogène. C'est pourquoi, Van der Hoorn et Kamoun (2008) ont défini comme cibles « opérationnelles », les cibles qui, lorsqu'elles sont manipulées par des effecteurs, se traduisent par une altération de l'état de défense ou de la sensibilité. Il devient donc important de distinguer les cibles opérationnelles des autres types de cibles. Ces dernières ont été désignées comme des leurres, c'est à dire des protéines qui lorsqu'elles sont perturbées par des effecteurs, déclenchent la reconnaissance du pathogène par l'hôte, par le biais des protéines R (Van der Hoorn et Kamoun, 2008).

I.5.4. La taille d'un effecteur

Les effecteurs décrits jusqu'à présent sont généralement de petite taille (< 300 acides aminés,) et possèdent à leur extrémité N-terminale un peptide signal permettant leur sécrétion *via* le système membranaire endocellulaire. Toutefois, il existe des exceptions. Les effecteurs Avr-a10 et Avr-k1 de *Blumeria graminis*, par exemple, ne possèdent pas de peptide signal, ce qui suggère un mécanisme alternatif de sécrétion (Ridout *et al.*, 2006). Récemment, une voie de sécrétion alternative a été mise en évidence chez *Magnaporthe oryzae* (Giraldo *et al.*, 2013)

I.5.5. La présence de motifs conservés chez les effecteurs

La grande majorité des effecteurs ne présente pas de similarités de séquence avec des protéines connues, exception faite du peptide signal de sécrétion (Ellis *et al.*, 2009). Néanmoins, certains présentent des motifs caractéristiques tels que le motif RxLR, identifié chez les oomycètes et supposé impliqué dans transport de l'effecteur dans la cellule hôte. Ce motif conservé a permis de dresser le catalogue des effecteurs candidats de plusieurs oomycètes pathogènes (Tyler *et al.*, 2006; Win *et al.*, 2007; Gaulin *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2008; Haas *et al.*, 2009). Chez les effecteurs de champignons pathogènes, aucun motif consensus RxLR n'a pu être formellement identifié (Rafiqi *et al.*, 2010; Kale *et al.*, 2010) et ce malgré l'identification de motifs présentant des structures dégénérées proches.

Ces études suggèrent que de nombreux motifs proches du motif RxLR (motifs de type R/H/KxL/M/I/F/Y/W) sont également présents chez les champignons et permettraient l'entrée de l'effecteur dans la cellule de l'hôte. Le rôle réel de ce motif dans la translocation des effecteurs fait aujourd'hui débat (Bozkurt *et al.*, 2012 ; Ellis et Dodds, 2011 ; Tyler *et al.*, 2013 ; Yaeno *et al.*, 2011 ; Yaeno et Shirasu, 2013). Kale *et al.* (2010) ont constaté que le motif RxLR des effecteurs d'oomycètes interagit avec le phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) sur la surface externe de la membrane plasmique des cellules de plante et suggéré que la liaison à PI3P permet leur transport à l'intérieur des cellules végétales. Les phosphoinositides jouent un rôle important dans la régulation du trafic membranaire intracellulaire des cellules animales (Le Roy et Wrana, 2005 ; Thole et Nielsen, 2008). Il a donc été suggéré qu'ils pourraient faciliter l'endocytose dans la plante des effecteurs possédant un motif RxLR (Kale *et al.*, 2010). Toutefois, Yaeno *et al.* (2011), ont trouvé que la liaison de l'effecteur oomycète Avr1b à PI3P ne se fait pas *via* le motif RxLR mais *via* une zone riche en acides aminés positivement chargés dans la partie C-terminale. De même, Gan *et al.* (2010) ont montré que la liaison à PI3P de l'effecteur AVR1 de la rouille du lin n'est pas liée non plus à son motif RxLR. Enfin, il existe des effecteurs qui sont transportés dans la cellule végétale mais ne possèdent pas de motif particulier, comme Cmu1 d'*U. maydis* (Djamei *et al.*, 2011) ou encore ChECs d'*C. higginsianum* (Kleemann *et al.*, 2012).

D'autres motifs ont été identifiés chez les effecteurs d'oomycètes (Oliva *et al.*, 2010). Parmi les mieux caractérisés, on retrouve les motifs LxLFLAK et HVLVxxP, présents chez les effecteurs CRN (Crinkler effectors) de *Phytophthora* spp. (Win *et al.*, 2007; Haas *et al.*, 2009) ainsi que les motifs F/LxLYLALK et LxLYLAR/K, retrouvés chez *Aphanomyces euteiches* (Gaulin *et al.*, 2008) et *Pythium ultimum* (Levesque *et al.*, 2010) respectivement. Tout comme les motifs RxLR, ces motifs sont essentiels à l'importation des effecteurs CRN dans la cellule hôte (Schornack *et al.*, 2010). Récemment, un autre motif Y/F/WxC a été identifié dans la partie N-terminale d'effecteurs candidats de *B. graminis* f.sp. *hordei* et de *Puccinia graminis*. Les auteurs proposent qu'ils puissent jouer un rôle dans la translocation de ce type d'effecteurs dans la cellule végétale (Godfrey *et al.*, 2010) mais sans preuves fonctionnelles qu'il s'agisse d'effecteurs cytoplasmiques.

I.5.6. La richesse en cystéine des effecteurs

De nombreux effecteurs présentent également un grand nombre de cystéines au sein de leurs séquences protéiques. Il a été proposé qu'elles soient impliquées dans la formation de ponts disulfures et permettent de stabiliser la structure tertiaire de la protéine (Van't Slot *et al.*, 2005; Van den Burg *et al.*, 2003; Vervoort *et al.*, 1997; Van den Hooven *et al.*, 2001). Ainsi des mutants Avr4 de *C. fulvum* mutés au niveau de deux cystéines présentent une sensibilité accrue aux protéases (Van den Burg *et al.*, 2003) et la présence de deux cystéines est indispensable à l'activité biologique de ToxA, une toxine produite par le champignon *Pyrenophora tritici repentis* (Tuori *et al.*, 2000). Néanmoins, cette caractéristique n'est pas une systématique. Certains possèdent très peu de cystéines (< à 2) au sein de leur séquence protéique. C'est le cas d'AvrL567 et AvrM de *Melampsora lini*, Pw11, Pw12 et Pw13 de *Magnaporthe grisea* ou encore d'AvrLm1 de *Leptosphaeria maculans* (Stergiopoulos et de Witt 2009).

I.5.7. La coévolution des effecteurs et de leurs protéines cibles

Du fait d'une « course aux armements » permanente entre les acteurs du système immunitaire de la plante et les effecteurs des agents pathogènes, les séquences nucléotidiques codant ces effecteurs présentent généralement des niveaux d'évolution accélérée (Dodds *et al.*, 2006; Guttman *et al.*, 2006; Win *et al.*, 2007; Brunner *et al.*, 2009 ; Dodds *et al.*, 2012). Cette pression de sélection positive (encore appelée sélection diversifiante) est essentielle au contournement des mécanismes de défense de l'hôte et pourrait être un indicateur de l'importance fonctionnelle de certains loci contribuant à la survie de l'organisme. La recherche de gènes codants de petites protéines sécrétées sous pression de sélection diversifiante a permis d'identifier de nombreux candidats au sein des génomes (Stergiopoulos et de Witt 2009). On peut citer pour exemple les effecteurs d'oomycètes ATR13 et scr74 (Allen *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005), les effecteurs AvrM, AvrP123, AvrP4 et AvrL567 identifiées chez *M. lini* (Dodds *et al.*, 2006; Catanzariti *et al.*, 2006; Barrett *et al.*, 2009; Van der Merwe *et al.*, 2009) ou encore les effecteurs putatifs identifiés chez *Melampsora larici-populina* (Hacquard *et al.*, 2012).

I.5.8. L'expression des gènes codant pour les effecteurs

Enfin, les effecteurs présentent généralement des niveaux de transcrits très importants au cours de l'interaction plante/pathogène et faible voire nul dans d'autres conditions de culture (Ellis *et al.*, 2009). Ainsi, l'expression des gènes codant des effecteurs candidats d'*Ustilago maydis* et *M. oryzae* est spécifiquement induite lors du processus d'infection et dans les tissus infectés (Kamper *et al.*, 2006 ; Mosquera *et al.*, 2009). De plus, l'analyse de l'expression d'effecteurs pathogènes au cours de cinétiques d'infection a montré qu'ils peuvent être régulés de manière séquentielle au cours du processus d'infection (Kleemann *et al.*, 2012 ; Hacquard *et al.*, 2012 ; Duplessis *et al.*, 2011).

I.5.9. Les rôles d'un effecteur

Les effecteurs aident généralement les microorganismes qui les sécrètent à coloniser la plante hôte à plusieurs niveaux. Ils peuvent i) faciliter l'entrée dans les tissus et / ou les cellules de la plante hôte, ii) faciliter l'acquisition de nutriments provenant de l'hôte, et / ou iii) contourner le système immunitaire de la plante hôte en empêchant la reconnaissance des MAMPs et la production de phytoalexines, en inactivant les enzymes de défense des plantes, ou encore en interférant avec les voies de signalisation responsables de la mise en place des mécanismes de défense et avec l'expression des gènes de défense.

I.5.9.1. La neutralisation des enzymes de défense de la plante

Les plantes produisent des enzymes antimicrobiennes telles que des protéases, des hydrolases, des glucanases et des chitinases, capables de dégrader la paroi cellulaire des agents phytopathogènes qui envahissent l'apoplaste sans effets nuisibles pour la plante hôte (Lucas, 1998). Ce mécanisme de défense a un double rôle. Il permet d'atténuer la croissance fongique et d'induire les défenses de la plante, les produits de dégradation des parois cellulaires fongiques servant d'éliciteurs. Les agents pathogènes utilisent des molécules effectrices qui vont permettre, soit de stopper la sécrétion de ces enzymes végétales et composés antimicrobiens, soit d'inhiber leur activité après sécrétion (Bent et Mackey 2007).

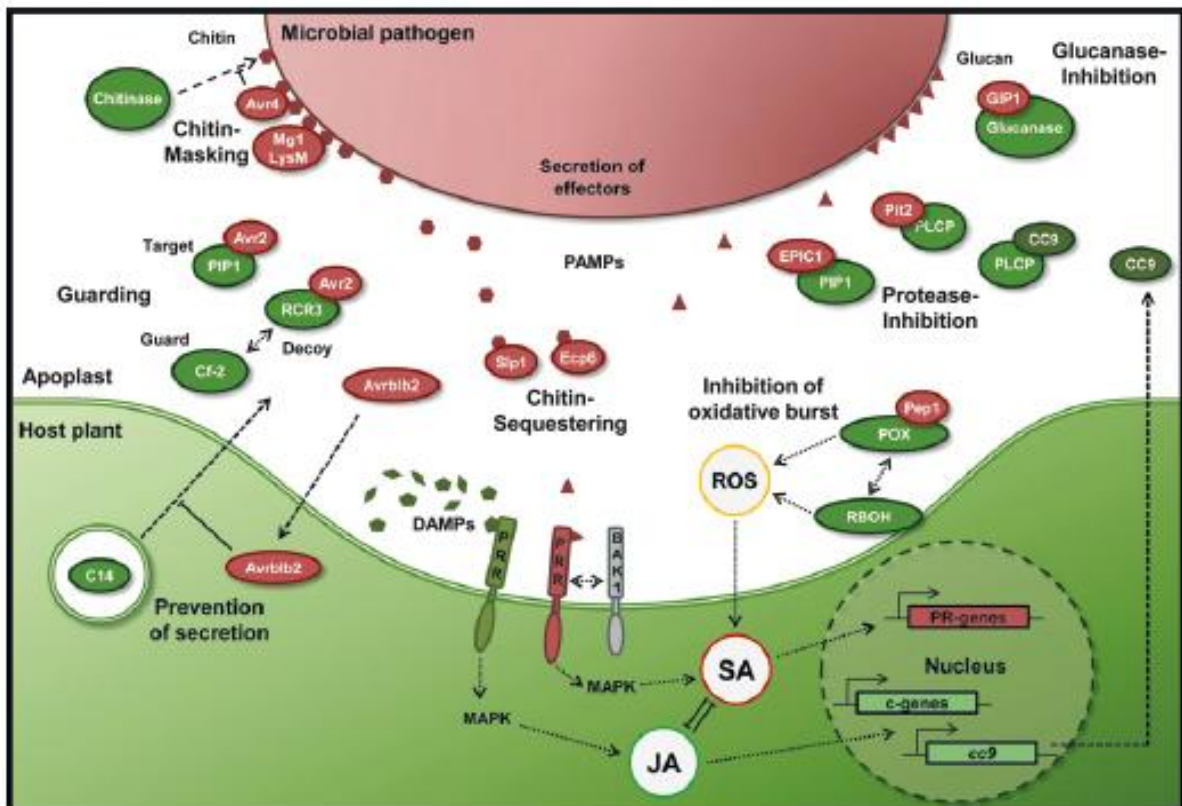


Figure I.14 : Le rôle des effecteurs fongiques dans la suppression des défenses apoplastiques de la plante (Doehlemann and Hemetsberger, 2013). Représentation schématique de l'infection d'une plante hypothétique par un champignon filamenteux pathogène. Effecteurs microbiens: Avr2, Avr4, Avrblb2, Ecp6, EPIC1, GIP1, PEP1, PIT2. Protéases végétales: C14, PIP1, PLCP (papain-like cysteine protease), Rcr3. Enzymes génératrices d'EROs: POX (péroxydase). Rboh, respiratory burst oxidase homolog. BAK1, Arabidopsis bri1-associated receptor kinase-1. C-genes, gènes de compatibilité. CC9, maize cystatin « corn cystatin 9 ». Cf-2, protéine de résistance de la tomate Cf-2. JA, acide jasmonique; MAPK, protéine kinase activée par les mitogènes. PAMP / DAMP, pathogen/damage-associated molecular patterns. PR genes, gènes codant les protéines PR; PRR, récepteurs de reconnaissance des PAMP / DAMP; ROS, espèces réactives de l'oxygène. SA, acide salicylique.

Le champignon apoplastique *C. fulvum* sécrète AVR2, un inhibiteur de cystéine protéase, qui se lie directement à la cystéine protéase RCR3 au cours de l'infection de la tomate, protégeant le champignon de son effet délétère (Figure I.14). Lorsqu'il est exprimé en système hétérologue chez la plante, AVR2 augmente également la sensibilité d'*A. thaliana* aux champignons pathogènes extracellulaires *Verticillium dahliae* et *Botrytis cinerea*, (van Esse *et al.*, 2008). Cette étude montre qu'AVR2 est capable d'inhiber des cystéines protéases de tomate et d'*A. thaliana* et que ces protéases jouent un rôle important dans les réactions de défense contre des agents pathogènes biotrophes et nécrotrophes (Rooney *et al.*, 2005, Shabab *et al.*, 2008, van Esse *et al.*, 2008). L'effecteur Pit2 d'*U. maydis* inhibe, quant à lui, les cystéines protéases CP2, CP1A/B et XCP2 de sa plante hôte (Figure I.14) (Doehlemann *et al.*, 2011 ; Mueller *et al.*, 2013). L'agent pathogène oomycète, *P. infestans*, est connu pour sécréter un nombre important d'inhibiteurs de cystéine et Kazal protéases (Tian et Kamoun 2005, Tian *et al.*, 2007, van Esse *et al.*, 2008). La protéase de la tomate similaire à la papaïne, PIP1, qui est induite par l'AS, est inhibée par l'inhibiteur EPIC2B de *P. infestans* (Tian et Kamoun 2005, Tian *et al.*, 2007 ; van Esse *et al.*, 2008 ; Song *et al.*, 2009). EPIC1 et EPIC2B de *P. infestans* sont des effecteurs similaires à AVR2 (Figure I.14). Ils peuvent aussi se lier et inhiber la cystéine protéase RCR3. Ces résultats montrent que les effecteurs de différents agents pathogènes peuvent cibler les mêmes enzymes apoplastiques de façon à faciliter la colonisation de l'hôte par le pathogène (Shabab *et al.*, 2008). D'autres effecteurs de *P. infestans*, EPI1 et EPI10, ciblent une protéine R de la tomate, la subtilisine-like sérine protéase P69B (Tian *et al.*, 2004, Tian et Kamoun 2005, Tian *et al.*, 2007). AVR123, un effecteur de *M. lini*, le champignon de la rouille du lin, montre également des similitudes avec les inhibiteurs de Kazal sérine protéase (Catanzariti *et al.*, 2006).

L'agent pathogène de soja, *Phytophthora sojae*, sécrète des protéines inhibitrices, GIP1 et GIP2, des glucanases. Elles ciblent l'endo- β -1,3-glucanase-A de la plante hôte afin de protéger l'agent pathogène au cours de l'infection et d'éviter la MTI induite par les oligoglucosides (Figure I.14) (Rose *et al.*, 2002).

Les effecteurs AVR4 de *C. fulvum* et Mgl LysM de *Mycosphaerella graminicola* se lient à la chitine des parois cellulaires fongiques pour la protéger des chitinases de la plante hôte (Figure I.14) (van den Burg *et al.*, 2006 ; Marshall *et al.*, 2011). AVR4 peut aussi protéger la chitine des champignons *Trichoderma viride* et *Fusarium solani f. sp. Phaseoli* contre les chitinases (van den Burg *et al.*, 2006). Ainsi, AVR4 ne protège pas seulement les champignons des chitinases végétales, mais il empêche aussi le déclenchement de la MTI induite par des oligomères de chitine (Libault *et al.*, 2007). Les effecteurs ECP6 de *C. fulvum* et Slp1 de *M. oryzae* présentent un domaine Lys-M de liaison aux carbohydrates, y compris la chitine. Ils sont impliqués dans la capture des oligomères de chitine libérés lors de la dégradation de la paroi cellulaire fongique afin d'empêcher la MTI (Figure I.14) (Bolton *et al.*, 2008 ; Mentlak *et al.*, 2012).

L'effecteur cytoplasmique d'*U. maydis*, Pep1, a récemment été caractérisé. Il s'agit d'un inhibiteur de la peroxydase POX12 sécrétée par la plante dans le but de générer un stress oxydant chez le pathogène (Figure I.14) (Doehlemann *et al.*, 2009 ; Hemetsberger *et al.*, 2012).

Ces exemples du contournement des enzymes de défense sécrétées par la plante par différents agents pathogènes montrent l'importance des effecteurs dans la prévention de la MTI et pour le développement du pathogène chez l'hôte.

I.5.9.2. La perturbation du système de sécrétion de la plante

Les MAMPs de plusieurs agents phytopathogènes fongiques et bactériens induisent des réactions de défense au niveau de la paroi cellulaire. Par exemple, la formation de papilles correspond à un épaississant localisé de la paroi cellulaire, principalement par addition de callose, à proximité des sites de pénétration des agents pathogènes. Elle est induite par une large gamme d'agents phytopathogènes (Bent et Mackey, 2007). Au cours de la production des papilles, des vésicules cellulaires végétales libèrent des matériaux destinés à renforcer la paroi cellulaire et des composés antimicrobiens aux sites de pénétration des agents pathogènes (Robatzek *et al.*, 2006). Plusieurs effecteurs peuvent agir sur les protéines impliquées dans ce type de transport, le réorienter et supprimer le dépôt de callose induit par les MAMPs. HOPM1, un effecteur de type III de *P. syringae* requis pour la virulence, est capable de supprimer les réactions de défense au niveau de la paroi cellulaire (Debroy *et al.*, 2004).

HOPM1 manipule le système d'ubiquitination de la plante afin de modifier le trafic vésiculaire. Il interagit spécifiquement avec AtMIN7, l'un des ARF-GEF (adénosine diphosphate ribosylation factor-guanine nucleotide exchange factor) d'*Arabidopsis* qui est impliqué dans le trafic vésiculaire (Nomura *et al.*, 2006). L'interaction de HOPM1 avec AtMIN7 induit la dégradation d'AtMIN7 *via* le protéasome, et par conséquent, empêche le dépôt de callose (Nomura *et al.*, 2006). HOPM1 à lui seul n'a pas les caractéristiques classiques d'une E3-ubiquitine ligase, ce qui suggère qu'il peut agir comme une protéine adaptatrice permettant la détection d'AtMIN7 par le système ubiquitin/26S protéasome de la plante (Angot *et al.*, 2007). Récemment, un effecteur cytoplasmique de *P. infestans*, Avrblb2, a été caractérisé. Il s'agit d'un inhibiteur de la sécrétion des protéases C14 à l'interface haustoriale (Figure20) (Bozkurt *et al.*, 2011).

I.5.9.3. La dégradation des protéines de la plante

La dégradation des protéines de la plante est réalisée soit par action de protéases sur le substrat végétal, soit par exploitation de la machinerie de dégradation des protéines de la plante (Zeng *et al.*, 2006). La modification SUMO ou sumoylation des protéines (small ubiquitin-like modifier) contrôle chez la plante plusieurs processus tels que la réponse à des stress biotiques et abiotiques, la signalisation hormonale, et le temps de floraison (Hanania *et al.*, 1999 ; Kurepa *et al.*, 2003 ; Lois *et al.*, 2003 ; Murtas *et al.*, 2003). Il a récemment été découvert que plusieurs effecteurs bactériens de type III, YopJ, XopD, YopT, et AvrXv4 possèdent une fonction cystéine protéase, ce qui suggère que la dégradation des protéines de l'hôte est une stratégie de défense importante chez les agents pathogènes (Hotson et Mudgett 2004). Les effecteurs YopJ, XopD et AvrXv4 ont des activités de SUMO-protéases. XopD s'accumule dans le noyau, révélant un rôle potentiel dans le clivage de facteurs de transcription SUMOylés (Hotson *et al.*, 2003 ; Hotson et Mudgett 2004). La protéase YopT a un effet cytotoxique. Elle détruit le cytosquelette d'actine lors de l'entrée dans la cellule, ce qui entraîne d'importants dommages aux cellules (Shao et Dixon, 2003).

Les effecteurs exploitent également la machinerie de dégradation des protéines de la plante hôte (protéasome) pour dégrader les protéines de défense (Angot *et al.*, 2007). L'extrémité C-terminale d'AvrPtoB de *P. syringae* possède une activité fonctionnelle E3-ubiquitine ligase capable de s'auto-ubiquitiner et vraisemblablement d'ubiquitiner des protéines cibles de la plante hôte (un membre de la famille Pto), afin d'induire leur dégradation *via* le protéasome. Cette activité empêche la HR chez les plants de tomates qui ne possèdent pas le gène de résistance Pto (Janjusevic *et al.*, 2006 ; Abramovitch *et al.*, 2006 ; Abramovitch *et al.*, 2003 ; Rosebrock *et al.*, 2007). AvrPto supprime également les réactions de défense AS indépendantes au niveau de la paroi cellulaire de la plante hôte (Hauck *et al.*, 2003). Il est possible qu'AvrPto interfère avec le trafic vésiculaire de manière similaire à HOPM1, car des tests doubles hybrides en levure ont montré qu'il interagit avec deux Rab GTPases (Hauck *et al.*, 2003). Chez *Phytophthora infestans*, l'effecteur AVR3a inhibe le processus de mort cellulaire programmée pendant la phase de biotrophie en stabilisant l'E3-ubiquitine ligase CMPG1 (Bos *et al.*, 2010). Enfin, chez *Magnaporthe oryzae* AvrPiz-t inhibe la MTI chez le riz en favorisant la dégradation d'une RING E3 Ubiquitine ligase APIP6 (Park *et al.*, 2012).

I.5.9.4. La perturbation des voies de signalisation

Lors de la perception des MAMPs par les PRRs, la mise en place des réactions de défense se fait *via* une cascade de phosphorylation par des protéines MAP kinase (MAPK). Par exemple, chez *Arabidopsis*, la reconnaissance de FLG22 par FLS2 induit une cascade de phosphorylation MAPK dépendante (Asai *et al.*, 2002, Gomez-Gomez et Boller, 2000). Les effecteurs bactériens de type III utilisent différents mécanismes pour déphosphoryler les éléments de signalisation MAP kinase et supprimer la réaction de défense (Göhre et Robatzek 2008). HOPAI1 de *P. syringae* code une enzyme, phosphothréonine lyase, qui supprime le groupement phosphate des résidus phosphothréonine des MAPKs afin d'arrêter la cascade de phosphorylation et de bloquer la signalisation induite par FLG22 à un stade précoce (Zhang *et al.*, 2007). Des essais d'expériences de pull-down ont montré que HOPAI1 interagit directement avec MAPK3 et MAPK6 (Zhang *et al.*, 2007). L'inactivation des MAPKs par HOPAI1 inhibe les réactions de défense telles que la production d'EROs et l'expression de gènes PR (Zhang *et al.*, 2007). HOPAO1, un autre effecteur de type III, présente un motif protéine tyrosine phosphatase et possède cette activité *in vitro* (Bretz *et al.*, 2003, Espinosa *et al.*, 2003).

L'expression transitoire de HOPAO1 chez *N. tabacum* supprime la HR induite par la MAPK kinase constitutivement active, NtMEK2 (Espinosa *et al.*, 2003). L'expression hétérologue de HOPAO1 chez *Arabidopsis* supprime également la production d'EROs et le dépôt de callose induits par la PTI, ce qui améliore la virulence et la multiplication de *P. syringae* pv *tomato* DC3000 (Underwood *et al.*, 2007).

Afin de favoriser la colonisation de la plante hôte, les agents pathogènes ciblent également les voies de signalisation hormonale impliquées dans la mise en place des réactions de défense et / ou le développement de la plante. Ainsi *Pseudomonas syringae* et *Hyaloperonospora arabidopsidis* produisent des effecteurs ayant pour cible AtJAZ3, un régulateur négatif de la voie de signalisation de l'acide jasmonique chez *A. thaliana* (Mukhtar *et al.*, 2011). De même *P. syringae* sécrète la coronatine (COR), une molécule qui mime la forme active de l'AJ, AJ-Ile. Elle est supposée active sur tous les récepteurs JAZ (Weiler *et al.*, 1994; Koda *et al.*, 1996; Bender *et al.*, 1999). En favorisant la voie de signalisation de l'AJ, COR inhibe les réactions de défense induites par la voie de signalisation antagoniste de l'AS (Cui *et al.*, 2005; Laurie-Berry *et al.*, 2006) et nécessaires à la mise en place de résistances contre *P. syringae*. Récemment, Geng et ses collaborateurs (2012) ont montré que COR inhibe le dépôt de callose qui se fait indépendamment de la voie de signalisation de l'AS. Ils ont également démontré que COI1 n'est pas impliqué. Ces résultats suggèrent que COR pourrait avoir d'autres cibles que le complexe corécepteur COI1-JAZ dans la cellule végétale.

Par ailleurs, il a récemment été démontré que le champignon biotrophe *Ustilago maydis* diminue les réactions de défense de la plante *via* la sécrétion d'une chorismate mutase Cmu1 (Djamei *et al.*, 2011). En effet, Cmu1, en conjonction avec une chorismate mutase cytoplasmique du maïs ZmCm2, diminue la concentration en chorismate, un précurseur de la voie de biosynthèse de l'AS, et par conséquent la concentration en AS. Une stratégie similaire pourrait être utilisée par le champignon *Sclerotinia sclerotiorum* (Communication personnelle de Dickman to ???? Djamei *et al.*, 2011).

I.5.9.5. La modification du transcriptome de la plante hôte et le détournement de son métabolisme

Certains effecteurs d'agents phytopathogènes agissent comme des facteurs de transcription. Ils peuvent se lier à des séquences promotrices spécifiques de l'effecteur et activer l'expression individuelle de gènes de la plante hôte pour favoriser la croissance de la bactérie ou neutraliser les défenses du système immunitaire de l'hôte. Il s'agit des TALEs (Transcriptional Activator Like Effector). Ils sont sécrétés par le SST3 des bactéries phytopathogènes *Xanthomonas* et *Ralstonia* (Kay *et al.*, 2007 ; Romer *et al.*, 2007). Ils présentent une structure caractéristique avec en N-terminal un peptide signal de sécrétion par le SST3, une région centrale comprenant des répétitions en tandem presque identiques de 34 ou 35 acides aminés et en C-terminal un motif leucine zipper répété imparfait, un motif de localisation nucléaire et un domaine d'activation acide (Schornack *et al.*, 2006). La famille TALE AvrBS3 de *X. campestris* pv *vesicatoria* est capable de se lier à une «upa-box" (Up-regulated by AvrBS3). Cette dernière est retrouvée dans le promoteur de *Upa20*, un régulateur majeur de la taille des cellules induisant l'hypertrophie, et de plusieurs autres gènes de l'hôte destinés à assurer un approvisionnement adéquat en nutriments pour favoriser la multiplication du pathogène (Gurlebeck *et al.*, 2006, Kay *et al.*, 2007, Szurek *et al.*, 2002...). Toutefois, chez les cultivars de plantes résistantes, le promoteur du gène de résistance *Bs3* possède également une «upa-box». Par conséquent, la liaison d'AvrBS3 à son promoteur induit la transcription de *Bs3* et la mort cellulaire programmée (Kay *et al.*, 2007). Cela montre que, sous la pression de sélection, les plantes peuvent évoluer vers la reconnaissance des effecteurs et les utiliser pour leur propre défense.

Par ailleurs, PtXo1 de *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* PX099 est capable d'activer la transcription du gène *OsSWEET11* chez son hôte. Les gènes *SWEETs* codent des transporteurs de glucose et sont conservés parmi le règne animal et végétal (Chen *et al.*, 2010). Ainsi, PtXo1 contrôle directement l'efflux de glucose de l'hôte vers la bactérie.

D'autres effecteurs modifient le transcriptome et le métabolisme de la plante hôte en interagissant avec des facteurs de transcription de la plante hôte ou en modifiant le pool d'ARNm présent dans les cellules végétales au cours de la cinétique d'infection. Chez *Xanthomonas campestris*, XopD interagit avec MYB30, un facteur de transcription impliqué dans la mise en place des réactions de défense et de la mort cellulaire programmée en réponse à une bactérie chez *A. thaliana*. L'interaction de XopD avec MYB30 réprime la transcription des gènes cibles de MYB30 et diminue les réponses de défense de la plante hôte (Canonne *et al.*, 2011; Canonne et Rivas, 2012).

HOPU1, une mono-ADP-ribosyltransférase de *P. syringae*, agit sur les protéines de liaison à l'ARN riches en glycine telles qu'AtGRP7 et AtGRP8. Il s'agit de chaperonnes à ARN (Fu *et al.*, 2007). Ainsi, HOPUI modifie le transcriptome de la plante en réduisant la transcription et l'expression des gènes de défense. Les mutants *grp7* d'*Arabidopsis* favorisent la croissance de *P. syringae* pv DC3000 tomato par rapport aux plantes sauvages (Fu *et al.*, 2007). Outre HOPUI, HOPO1-1-2 et HOPO1 codent également des mono-ADP-ribosyltransférases.

Chez le champignon *Blumeria graminis*, deux des effecteurs candidats identifiés présentent des homologies avec des ribonucléases bactériennes sécrétées BEC1011 et BEC1054. Au cours d'une cinétique d'infection, ces deux effecteurs sont surexprimés dès les premiers stades de la pénétration, peu avant la formation des premiers haustoria. Ils inhibent le processus de mort cellulaire programmée durant la phase de biotrophie (Pliago *et al.*, 2013). L'analyse structurale de ces effecteurs a révélé que les principaux acides aminés du site actif ne sont pas conservés, suggérant que ces ribonucléases ne sont peut être pas fonctionnelles (Nishikawa *et al.*, 1987 ; Pedersen *et al.*, 2012). Néanmoins, les auteurs suggèrent qu'elles pourraient jouer un rôle dans la séquestration des ARNm, modifiant ainsi le transcriptome de la plante hôte au profit de *B. graminis*. Enfin, chez *Hyaloperonospora arabidopsidis*, une étude récente a mis en évidence la présence de 15 effecteurs nucléaires, capables d'interagir directement ou indirectement avec des protéines nucléaires de la plante hôte et de modifier son transcriptome (Caillaud *et al.*, 2012).

I.5.10. L'émergence d'effecteurs symbiotiques

Contrairement aux interactions pathogènes compatibles, les interactions symbiotiques se caractérisent généralement par l'absence de symptômes et une inhibition rapide des réactions de défense. Un équilibre se crée entre les deux symbiontes lors de la colonisation. La symbiose est une interaction mutualiste au cours de laquelle chacun des deux partenaires a besoin de l'autre. Elle est le siège d'échanges nutritionnels très abondants. Néanmoins, de récentes études démontrent que les micro-organismes symbiotiques sécrètent également des effecteurs capables de supprimer les réponses de défense de la plante hôte, une condition essentielle à leur mode de vie (Zamioudis et Pieterse, 2012).

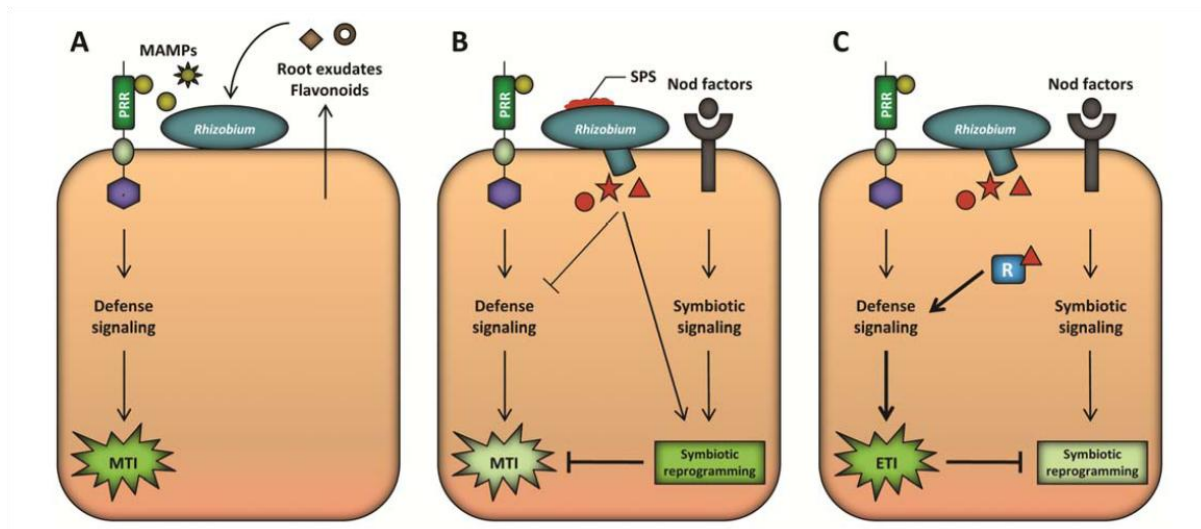


Figure I.15 : Représentation schématique de la modulation de l'immunité de la plante hôte lors d'une symbiose *Rhizobium*-légumineuses (Zamioudis and Pieterse, 2012). A, Les exsudats racinaires recrutent les bactéries *Rhizobium* et les flavonoïdes sécrétés préparent le microsymbionte à l'interaction. La plante hôte reconnaît initialement *Rhizobium* comme un envahisseur potentiel; Les MAMPs libérés par *Rhizobium* sont reconnus par les récepteurs PRR et une cascade de signalisation conduit à la MTI. B, La voie de signalisation symbiotique est activée dans les cellules végétales suite à la perception des facteurs de nodulation Nod. Elle neutralise la MTI via des mécanismes encore inconnus. Les effecteurs de *Rhizobium*, sécrétés par le système de sécrétion de type III (formes de couleur marron orangé), aident à la suppression de la MTI. SPS, polysaccharides de surface. C Dans le cas où une protéine de résistance de l'hôte (R) reconnaît un effecteur de *Rhizobium*, l'immunité déclenchée par les effecteurs (ETI) est activée et met fin au développement symbiotique. L'interaction est incompatible.

I.5.10.1. Les effecteurs des bactéries *Rhizobium*

La relation entre les *Rhizobia* et leurs plantes hôtes est très spécifique. Chaque souche *Rhizobium* peut établir une symbiose avec un nombre limité d'espèces végétales (Perret *et al.*, 2000 ; Yang *et al.*, 2010). Cette spécificité est déterminée par les signaux moléculaires de type flavonoïde échangés entre les deux partenaires.

De nombreuses souches de *Rhizobium* utilisent les systèmes de sécrétion de type III et IV afin de libérer des effecteurs dans le cytoplasme des cellules hôtes, de supprimer les réactions de défense de l'hôte et de favoriser la formation des nodules (Deakin et Broughton 2009 ; Figure I.15). Certains effecteurs, tels que NopL et NopP, semblent être spécifiques de certains rhizobia. Il est possible que NopL et NopP interfèrent avec les voies de signalisation des plantes, toutes deux peuvent être phosphorylés par des kinases végétales. Des études ont montré que NopL est probablement phosphorylé par une kinase MAP kinase (Skorpil *et al.*, 2005). En outre, l'expression ectopique de NopL dans *L. japonicus* bloque l'expression des chitinases (Bartsev *et al.*, 2004).

Tous les autres effecteurs de *Rhizobium* identifiés à ce jour ont des homologues chez les bactéries pathogènes. NopM appartient à la famille IpaH–SspH–YopM des effecteurs pathogènes trouvés chez les animaux. Même s'ils ne possèdent pas de signaux classiques de localisation nucléaire, les effecteurs pathogènes IpaH, SspH1 et YopM sont adressés aux noyaux des cellules hôtes (Bartsev *et al.*, 2004 ; Skorpil *et al.*, 2005). YopM interagit avec et module deux kinases eucaryotes (McDonald *et al.*, 2003). IpaH9.8 et SspH1 sont des E3-ubiquitine ligases (Rohde *et al.*, 2007). Msi061 pourrait également être impliquée dans l'ubiquitinylation des protéines de l'hôte (Hubber *et al.*, 2004). L'ubiquitinylation conduit à la dégradation prématurée des protéines marquées *via* le protéasome.

Msi059, Mlr6316 et éventuellement NopD possèdent un domaine cystéine protéase connu pour être impliqué dans la dé-ubiquitinylation des protéines eucaryotes (Hubber *et al.*, 2004). En revanche, son homologue XopD chez *Xanthomonas spp.* cible des protéines végétales SUMOylées. NopJ possède également un domaine cystéine protéase. Son homologue YopJ est connu pour être une acétyltransférase qui bloque la phosphorylation des MAP kinases par acétylation du site de phosphorylation (Mukherjee *et al.*, 2006).

Protein identification (JGI <i>Laccaria</i> database)	Family size	Length (amino acids)	Transcript concentration (FLM)	<i>P. trichocarpa</i> ECM/FLM ratio (fold)	Features
298595	sc	68	ND	12,913	MISSP7
333839	5	129	ND	1,931	Glycosyl phosphatidylinositol (GPI)-anchored
298667	2	70	ND	1,407	
332226	8	181	43	780	CFEM domain (INTERPRO IPR014005)
311468	2	59	ND	ND	
295737	8	288	131	252	
334759	sc	101	ND	18	
395403	4	121	24	93	
333423	9	120	6	72	Gonadotropin domain (IPR001545)
312262	4	106	85	53	
295625	4	199	325	48	
325402	8	238	310	74	Snake toxin-like (SSF57302)
316998	sc	56	137	57	
333197	3	148	266	8	
327918	2	154	763	4	Homologue in <i>C. cinerea</i>
307956	sc	74	336	90	Whey acidic domain (IPR008197)
327246	sc	194	1,025	18	Homologue in <i>C. cinerea</i>
303550	5	98	1,365	14	
300377	2	291	5,499	8	
293250	sc	224	127	10	Homologue in <i>C. cinerea</i>
298648	sc	64	1,108	12	
298646	2	73	1,028	14	
293729	3	210	3,000	7	

Tableau I.3 : Changement d'expression pour les transcrits codant les MiSSPs dans l'ectomycorhize *Laccaria bicolor/Populus trichocarpa* (Martin *et al.*, 2008).

Il y a quelques années, il a été suggéré que des gènes de résistance dominants R présents chez les plantes réguleraient aussi les interactions symbiotiques avec *Rhizobium* selon la règle gène-pour-gène observée lors des interactions plantes-pathogènes (Caldwell 1966, Devine et Kuykendall 1996). Deux gènes de résistance R du soja, RJ2 et RFG1 ont récemment été clonés. Yang et ses collaborateurs (2010) ont en effet démontré que ces gènes limitent les relations symbiotiques à certaines souches de *Bradyrhizobium japonicum* et *Sinorhizobium fredii* (Yang *et al.*, 2010). L'implication des gènes de résistance R de l'hôte dans le contrôle génotype-spécifique de l'infection et de la nodulation révèle un mécanisme de reconnaissance commun aux interactions plantes-bactéries pathogènes et / ou symbiotiques et supporte l'existence des gènes d'avirulence correspondants chez *Rhizobium*. Cette étude suggère également que l'établissement d'une symbiose nodule racinaire nécessite de contourner les réponses immunitaires déclenchées par les effecteurs de rhizobium.

I.5.10.2. Les effecteurs de champignons mycorhiziens

Le séquençage du génome du champignon basidiomycète ectomycorhizien *Laccaria bicolor* a révélé la présence de plus de 3000 protéines sécrétées dont 10% sont des petites protéines sécrétées (SSP, <300 acides aminés) riches en cystéines de type effecteur (Martin *et al.*, 2008, Martin et Selosse 2008). Elles ne présentent généralement pas ou très peu d'homologies avec des protéines connues. L'analyse du transcriptome du champignon dans différentes conditions a révélé que l'expression de plusieurs gènes SSP est spécifiquement induite au cours de l'interaction symbiotique (Tableau I.3). Ces gènes ont donc été renommés *MiSSPs* pour Mycorrhiza induced Small Secreted Proteins. Récemment, MiSSP7, la SSP la plus régulée au cours de l'interaction entre le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor* et *Populus trichocarpa*, a été caractérisé comme un effecteur indispensable au développement mycorhizien. MiSSP7 est sécrétée suite à la réception de signaux diffusibles sécrétés par les racines de la plante. Elle est ensuite importée dans la cellule végétale par un mécanisme d'endocytose phosphatidylinositol 3-phosphate dépendant et adressée au noyau des cellules où elle modifie le transcriptome de l'hôte (Figure I.16B). Des lignées RNAi *missp7* de *Laccaria bicolor*, pour lesquelles l'expression de MiSSP7 est fortement diminuée, ne sont plus capables de mycorhizer le peuplier (Plett *et al.*, 2011).

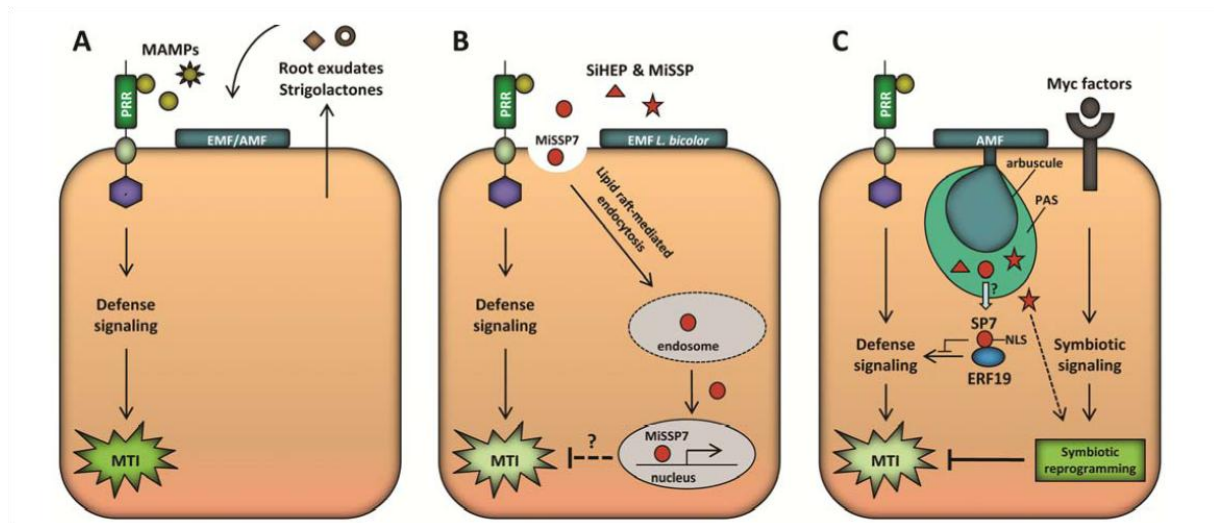


Figure I.16: Représentation schématique de la modulation de l'immunité de la plante hôte lors d'une symbiose ecto-et endomycorhizienne (Zamioudis and Pieterse, 2012). A, Les exsudats racinaires recrutent les champignons mycorhiziens et les préparent à l'interaction. La plante hôte reconnaît initialement les champignons ectomycorhiziens (EMF) et à arbuscules (AMF) comme des envahisseurs potentiels; Les MAMPs libérés par les champignons sont reconnus par les récepteurs PRR et une cascade de signalisation conduit à la MTI. B, *L. bicolor* sécrète des protéines similaires à des protéines surexprimées dans les haustoria des agents pathogènes basidiomycètes (SiHEP) et plusieurs petites protéines spécifiquement induites au cours de l'interaction symbiotique (MiSSP). Elles pourraient fonctionner comme des effecteurs apoplastiques ou cytoplasmiques et supprimer les réponses immunitaires de la plante hôte. MiSSP7 est essentielle au développement symbiotique. Elle est transportée dans la cellule végétale par endocytose et se localise dans le noyau où elle est supposée inhiber les réactions de défense de la plante hôte. C, Dans les symbioses à arbuscules, la voie de signalisation symbiotique est activée dans les cellules végétales suite à la perception des facteurs de mycorhization Myc. Elle neutralise la MTI *via* des mécanismes encore inconnus. Les champignons à arbuscules sécrètent des protéines (formes de couleur marron orangé) dans l'espace apoplastique ou periarbusculaire (PAS). Elles pourraient fonctionner comme des effecteurs apoplastiques ou cytoplasmiques et supprimer la MTI ou promouvoir le développement symbiotique. L'effecteur SP7 de *G. intraradices* est sécrété et transporté dans le cytosol puis dans le noyau des cellules végétales où il interagit avec le facteur de transcription ERF19 pour bloquer la MTI. NLS, signal de localisation nucléaire.

La comparaison du génome de l'ascomycète ectomycorhizien *Tuber melanosporum* avec celui de *L. bicolor* a montré que les outils moléculaires requis à l'établissement de la symbiose sont différents chez les ascomycètes et basidiomycètes. En effet, parmi les transcrits de *T. melanosporum* spécifiquement régulés dans l'ectomycorhize, aucun ne code pour des SSP (Martin *et al.*, 2010). Néanmoins, l'un des gènes les plus régulés dans les organes symbiotiques code une protéine sécrétée contenant un motif LysM. Il est possible qu'à la manière de l'effecteur Ecp6 chez *C. fulvum* (de Jonge *et al.*, 2010), cette protéine fixe et séquestre dans l'apoplaste la chitine avec pour objectif d'éviter de déclencher les réactions de défense de la plante.

De façon similaire à *L. bicolor*, l'analyse du transcriptome du champignon endomycorhizien *Rhizophagus irregulare* a mis en évidence un panel important de SSPs spécifiquement régulés dans les mycorhizes (Tisserant *et al.*, 2011). Ces SSPs sont très fortement surexprimées dans les arbuscules. Le transcrit le plus régulé au cours de l'interaction entre *R. irregulare* et *Medicago truncatula*, step3_c3163, code une SSP de 280 acides aminés de fonction inconnue présentant des similitudes avec plusieurs protéines de basidiomycètes biotrophes tels que *L. bicolor* et *M. larici-populina*. Parmi ces SSPs se trouve SP7 qui a récemment été décrit comme favorisant le développement symbiotique. Tout comme MiSSP7, SP7 est capable de pénétrer à l'intérieur des cellules végétales et d'aller dans le noyau où elle interagit avec ERF19, un facteur de transcription de la plante lié à la pathogénèse (Figure I.16C). L'étude a montré qu'ERF19 est fortement induit dans les racines par le champignon pathogène *Colletotrichum trifolii*, mais seulement de façon transitoire au cours de la mycorhization. De plus, lorsqu'elle est exprimée de façon constitutive dans les racines, SP7 conduit à une augmentation du taux de mycorhization et à une diminution du niveau des réponses de défense à *C. trifolii*. Ainsi SP7 est un effecteur symbiotique qui favorise le développement mycorhizien en contournant le système immunitaire de la plante (Kloppholz *et al.*, 2011).

Étant donné les résultats majeurs obtenus pour MiSSP7 et SP7, le rôle joué par d'autres SSPs, spécifiquement induites au cours de la mycorhization par *L. bicolor*, *R. irregulare* et d'autres champignons symbiotiques, devrait prochainement être élucidé.

I.6. Objectifs de la thèse

Bien que la morphologie, l'ontogénèse et le fonctionnement de la symbiose ectomycorhizienne aient été bien décrits dans de nombreux modèles, les mécanismes moléculaires aboutissant à l'établissement et au développement de l'ectomycorhize restent peu connus (Martin et Nehls, 2009 ; Plett et Martin, 2012). Par exemple, plusieurs gènes de plantes impliqués dans les réactions de défense sont surexprimés durant la formation du manteau et du réseau de Hartig mais ils sont réprimés à des stades plus tardifs du développement de l'ECM (Duplessis *et al.*, 2005; Le Queré *et al.*, 2005). L'analyse du génome de *Laccaria bicolor* (Martin *et al.*, 2008), premier champignon ectomycorhizien à être séquencé, a mis en évidence plusieurs originalités dont en particulier la présence d'un grand nombre de petites protéines sécrétées (<300 acides aminés). La fonction de la majorité d'entre elles est inconnue et certaines sont spécifiquement surexprimées dans l'ectomycorhize. Cela suggère que ces MiSSPs (Mycorrhiza induced Small Secreted Protein) pourraient jouer un rôle fondamental dans la structuration de l'interface symbiotique et le contrôle de l'immunité de la plante hôte, de son métabolisme et / ou de son développement. Le premier objectif de ma thèse a consisté à élucider la fonction de certaines MiSSPs de *L. bicolor*, en particulier MiSSSP7, MiSSSP8, MiSSSP13, MiSSSP17 et MiSSSP22, étude primordiale pour une meilleure compréhension de la symbiose ectomycorhizienne. L'hypothèse de travail est que ces MiSSPs correspondent à des effecteurs fongiques capables de réguler le métabolisme et/ ou le fonctionnement de la plante hôte au cours de l'ontogénèse. Plusieurs questions se posent alors :

Quel(s) est (sont) le(s) rôle(s) de ces effecteurs fongiques putatifs dans la biologie du champignon ? Sont-ils requis pour l'établissement de la symbiose et/ou le maintien d'une interface symbiotique fonctionnelle ?

Dans un contexte d'interaction, quelle est la localisation tissulaire de ces MiSSPs ? Sont-elles présentes dans le manteau externe et interne, dans les hyphes extramatriciels et le réseau de Hartig ? Quelle est leur localisation subcellulaire ? Se localisent-elles au niveau de l'apoplaste (effecteurs apoplastiques) ou du cytoplasme des cellules végétales (effecteurs cytoplasmiques) ?

Quels sont les cibles de ces MiSSPs? Interagissent-elles avec une ou plusieurs protéines de la plante hôte ? Sont-elles capables d'activer ou de réprimer l'expression de certains gènes?

Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé des techniques variées et complémentaires telles que i) le Signal Sequence Trap, pour vérifier leur sécrétion, ii) l'expression transitoire de protéines fusionnées au gène rapporteur GFP en système hétérologue (tabac) afin de déterminer leur localisation subcellulaire, iii) l'analyse de lignées transgéniques de *L. bicolor*, générées par ARN interférant, iv) la recherche des protéines cibles du peuplier par le développement du système double-hybride en levure (Yeast Two Hybrid System). Le chapitre II traitera des résultats obtenus pour MiSSP7 et le Chapitre III des résultats obtenus pour MiSSP8, MiSSP13, MiSSP17 et MiSSP22.

Par ailleurs, l'établissement d'une ectomycorhize fonctionnelle passe par différentes phases de développement qui sont la reconnaissance des deux partenaires (phase précoce), l'adhésion des hyphes à la surface des cellules racinaires et la formation du manteau et du réseau de Hartig (phase de colonisation) ainsi que la mise en place d'échanges nutritifs mutualistes (Phase tardive) (Smith et Read, 2008). L'analyse des données d'expression obtenues à partir de mycorhizes de *Paxillus involutus-Betula pendula* et *Pisolithus microcarpus-Eucalyptus globulus* montre que la transition d'une phase à l'autre peut s'expliquer par des différences d'expression des gènes ce qui suggère un contrôle génétique important (Johansson *et al.*, 2004; Duplessis *et al.*, 2005; Le Queré *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2008, 2010). En effet, les stades précoces du développement symbiotique se caractérisent par une surexpression des gènes impliqués dans l'adhésion et le remodelage des parois cellulaires. A l'inverse, les stades plus tardifs se caractérisent par une surexpression des gènes impliqués dans la respiration mitochondriale et dans le métabolisme du carbone des acides aminés et de l'azote (Duplessis *et al.*, 2005; Le Queré *et al.*, 2005, Deveau *et al.*, 2008). L'ontogénèse des ECMs requiert aussi le contrôle du développement de la plante hôte. Le système racinaire en contact avec les hyphes présente un nombre important de racines latérales et la croissance des apex racinaires est arrêtée lors de la formation du manteau (Felten *et al.*, 2009, 2010). Ainsi, la formation des ECMs est à l'origine d'une reprogrammation génétique importante chez les deux partenaires. Les facteurs de transcription (TFs) sont des acteurs clés des reprogrammations génétiques. A ce jour, seule une analyse complète des TFs du champignon ectomycorhizien *T. melanosporum* a été réalisée (Montanini *et al.*, 2011). Le second objectif de ma thèse a donc consisté à dresser une liste exhaustive des facteurs de transcription du champignon ectomycorhizien *L. bicolor* et à analyser leur rôle potentiel dans le développement symbiotique. Plusieurs questions se posent :

Quel est le niveau d'expression des TFs dans l'ECM ? Certains sont-ils surexprimés / réprimés ? Existe-t-il des spécificités d'hôte ?

Est-ce que certaines familles de TFs sont plus représentées dans l'ECM que dans le FLM ?

Sont-ils fonctionnels ? Activent-ils la transcription ?

Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé des techniques bioinformatiques, transcriptomiques et le système simple hybride en levure. Les résultats obtenus seront traités dans le chapitre IV.

Chapitre II : Identification des cibles végétales de l'effecteur symbiotique MiSSP7

Chapitre II : Identification des cibles végétales de l'effecteur symbiotique MiSSP7

Les champignons ectomycorhiziens forment des symbioses avec le système racinaire de la plupart des arbres et contribuent à améliorer leur croissance et leur résistance au stress. Elles sont à l'origine d'un échange réciproque de nutriments entre les deux partenaires. Ainsi, le champignon transfère à la plante des nutriments (azote, phosphate, sels minéraux, eau,...) présents en faibles quantités ou difficilement mobilisables tandis qu'il reçoit de la plante des sucres issus de la photosynthèse (Harley & Smith, 1983; Harley, 1989; Smith et Read, 2008). Malgré leur importance écologique au sein des écosystèmes forestiers, les mécanismes moléculaires contrôlant le développement et le fonctionnement de la symbiose ectomycorhizienne restent peu connus. Récemment les génomes de deux partenaires, le peuplier *P. trichocarpa* (Tuskan *et al.*, 2006) et le champignon ectomycorhizien *L. bicolor* (Martin *et al.*, 2008), ont été séquencés, offrant une occasion unique d'étudier les mécanismes moléculaires qui régissent la mise en place de la symbiose ectomycorhizienne. L'analyse de l'expression des gènes de *L. bicolor* dans l'ECM a souligné l'importance de petites protéines sécrétées (SSP) de type effecteur, spécifiquement induites au cours du développement mycorhizien (Mycorrhizal induced Small Secreted Proteins: MiSSP) (Martin *et al.*, 2008, Martin et Selosse, 2008). MiSSP7, la SSP la plus régulée au cours de l'interaction symbiotique, a été caractérisée comme le premier effecteur indispensable au développement mycorhizien. MiSSP7 est sécrétée, transportée dans la cellule végétale par un mécanisme d'endocytose phosphatidylinositol 3-phosphate dépendant puis adressée au noyau où elle modifie le transcriptome de la plante hôte (Plett *et al.*, 2011).

L'objectif premier de mon projet de thèse était d'identifier la ou les cibles végétales de MiSSP7 afin d'élucider son rôle crucial pour le développement symbiotique. Différentes techniques d'analyse des interactions protéine-protéine ont ainsi été développées : le système double hybride en levure (Plett *et al.*, 2011) et le système DivIVA en bactérie (Edwards *et al.*, 2009). Le système double hybride en levure a été développé au sein de notre laboratoire. Le système DivIVA a été développé par nos collaborateurs de l'ORNL, (Oak Ridge National Laboratory) aux Etats-Unis. Nous avons démontré que MiSSP7 interagit avec deux récepteurs de l'acide jasmonique de *P. trichocarpa*, PtJAZ6 et PtJAZ5, ce dernier avec une interaction plus faible. De plus, nous avons montré que PtJAZ6 interagit avec d'autres protéines nucléaires, POPTR_0014s09520 (PtMYC) et POPTR_0005s17740 (Pt14-3-3), probablement impliquées dans la formation d'un complexe de régulation transcriptionnel.

POPTR_0014s09520 présente des homologies avec un facteur de transcription de type Myc. POPTR_0005s17740 présente des homologies avec des protéines 14-3-3 et pourrait jouer le rôle de protéine d'échafaudage ayant pour but de maintenir l'intégrité du complexe et la répression des gènes cibles de PtMYC en l'absence d'AJ-Ile. Par ailleurs, nous avons montré qu'en présence de coronatine, l'interaction de PtJAZ6 avec PtCOI1 est augmentée, ce qui est en accord avec les résultats précédemment obtenus chez *A. thaliana*, suggérant que le même type de régulation des protéines JAZ a lieu chez *A. thaliana* et le peuplier. Ainsi, en présence d'AJ-Ile, l'interaction de PtJAZ6 avec PtCOI1 entraînerait la déstabilisation du complexe de régulation et la dégradation de PtJAZ6. Il a été montré que l'AJ inhibe la formation de mycorhizes *in vitro* et que MiSSP7 bloque la voie de signalisation dépendante de l'AJ chez une plante non hôte (plus précisément, MiSSP7 bloque l'inhibition de la croissance de la bactérie *P. syringae*). La surexpression de PtJAZ6 dans les racines (ce qui réprime la voie de signalisation dépendante de l'AJ) complémente les mutants d'ARN interférant *missp7* pour la formation du réseau de Hartig. Ainsi, MiSSP7 est un nouvel effecteur qui favorise le développement symbiotique en bloquant la voie de signalisation dépendante de l'AJ *via* son interaction avec PtJAZ6. A ce stade nous pouvons faire deux hypothèses quant au rôle de MiSSP7 sur la voie de signalisation dépendante de l'AJ : i) MiSSP7 stabilise le complexe de régulation par compétition avec l'AJ-Ile pour son site de fixation sur PtJAZ6 ou ii) MiSSP7 stabilise le complexe de régulation en empêchant l'interaction de PtCOI1 avec PtJAZ6 en présence d'AJ-Ile, et par conséquent la dégradation de PtJAZ6.

Les résultats obtenus au cours de cette analyse ont été rassemblés et discutés dans le manuscrit intitulé « **The Mutualistic Fungus *Laccaria bicolor* uses the Effector Protein MiSSP7 to Alter Host Jasmonate Signaling** », soumis dans la revue **PNAS**. Des expérimentations supplémentaires sont actuellement en cours pour répondre aux questions posées par les rapporteurs avant re-soumission.

The Effector Protein MiSSP7 of the Mutualistic Ectomycorrhizal Fungus *Laccaria bicolor* Interacts with *Populus* JAZ Proteins

Jonathan M. Plett^{1,2*}, Yohann Daguette^{1*}, Sebastian Wittulsky¹, Aurelie Deveau¹, Sarah J. Melton³, Annegret Kohler¹, Jennifer Morrell-Falvey³, Annick Brun¹, Claire Veneault-Fourrey¹, Francis Martin¹

¹ Laboratoire d'Excellence ARBRE, UMR INRA-Université de Lorraine 'Interactions Arbres/Micro-organismes', Centre INRA de Nancy, Champenoux, France 54180. ² Hawkesbury Institute for the Environment, University of Western Sydney, Richmond, NSW, Australia 2753 ³ Biological and Nanoscale Systems, BioSciences Division, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN 37831-6445.

Submitted to Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

Ectomycorrhizal (ECM) fungi, such as *Laccaria bicolor*, support forest growth and sustainability by providing growth limiting nutrients to their plant host through a mutualistic symbiotic relationship with host roots. We have previously shown that the effector protein MiSSP7 encoded by *L. bicolor* is necessary for the establishment of symbiosis with host trees, although the mechanistic reasoning behind this role was unknown. We demonstrate here that MiSSP7 interacts with the *Populus* host protein PtJAZ6, a putative negative regulator of jasmonic acid (JA) signaling in *Populus*. As with other characterized JAZ proteins, PtJAZ6 also interacts with PtCOI1 in the presence of the JA mimic coronatine and PtJAZ6 is degraded in plant tissues after JA treatment. The association between MiSSP7 and PtJAZ6 is able to protect PtJAZ6 from this JA induced degradation. Further, MiSSP7 is able to block, or mitigate, the impact of JA on *L. bicolor* colonization of host roots. We show that the loss of MiSSP7 production by *L. bicolor* can be complemented by transgenically varying the transcription of PtJAZ6 or through inhibition of JA signaling. We conclude that *L. bicolor*, in contrast to arbuscular mycorrhizal fungi and biotrophic pathogens, promotes mutualism by blocking JA action through the interaction of MiSSP7 with PtJAZ6.

mutualism | ectomycorrhizal fungus | defense | *Laccaria bicolor* | tree nutrition

Plants are constantly confronted by different organisms that seek to colonize their tissues in an effort to gain the nutrients stored there-in. Plants utilize hormones such as jasmonic acid (JA) to mediate defense signaling during microbial colonization. JA, is ubiquitous throughout the plant kingdom and is involved in the control of cell development and cycling, of vegetative growth and in the mediation of plant defensive responses (1,2). In *Arabidopsis*, the active form of JA, JA-Ile, is perceived by COI1, which then forms a complex with JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ)-transcriptional regulators and targets them for ubiquitination and degradation (3-5). As JAZ proteins are negative regulators of the JA signaling network, their degradation results in transcriptional activation within affected cells that mount plant defense networks and can alter plant cell physiology (6-8). Biotrophic pathogens have evolved methods of favoring JA signaling through the use of effector proteins as the outcomes of this hormonal pathway is considered less detrimental to their growth within plant tissues as compared to defenses induced by other plant hormones (e.g. salicylic acid (SA); 9-12). Not all organisms attempting to colonize plant tissues, however, have adverse effects on plant health. In particular, roots of most trees in temperate and boreal forests form a nutrient-acquiring symbiosis with mutualistic ectomycorrhizal (ECM) fungi (13). Trees that form a relationship with ECM fungi generally benefit from these relationships through an increase in growth rate and via elevated tolerance to biotic and abiotic stresses (14,15). While ECM fungi are thought to have evolved from wood- and litter decaying fungal ancestors, their

lifestyle more closely reflects that of biotrophic pathogens (16-18). Like colonization of plant tissues by biotrophic pathogens, the colonization of roots by ECM fungi is also disruptive to plant tissues as fungal hyphae use both hydrolytic enzymes and mechanical force to colonize the apoplastic space of the root (19). The invasive ECM hyphae that reside within the host apoplastic space form a hyphal network encasing the epidermal cells, the so-called Hartig net. The formation of the Hartig net is necessary to maximize the benefits of this mutualistic relationship as it is at the fungal:plant cell interface within the Hartig net that the fungus provides different growth limiting nutrients to the plant (e.g. nitrogen, phosphorus) in exchange for photosynthetically derived sugars. It is interesting to note that formation of the Hartig net, as opposed to colonization of tissues by the hyphae of biotrophic fungi, is inhibited by increased levels of JA (20). How the ECM fungus is able to aggressively colonize plant tissues and not be repulsed by plant defenses controlled by JA and other plant hormones is not well understood.

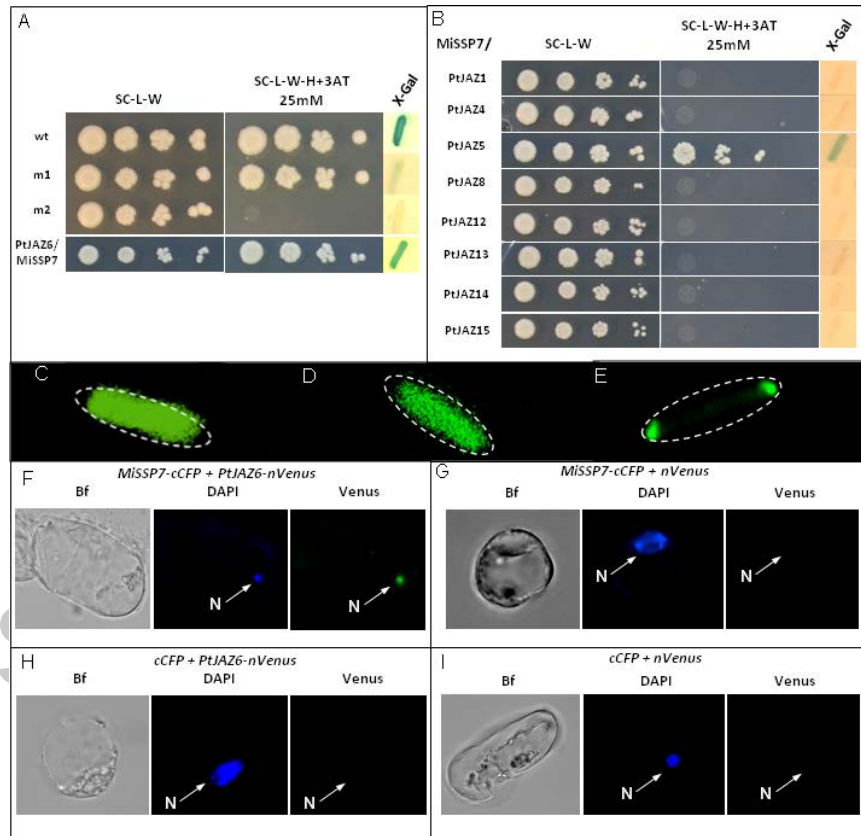
As pathogenic organisms favor the use of secreted 'effector' proteins to subvert host immunity, a great deal of research has focused on the role of pathogenic effectors and how they are used to modify the signaling of defense pathways controlled by plant hormones (21-25). For example, the pathogenic bacteria *Pseudomonas syringae* and the oomycete *Hyaloperonospora ara-*

Significance

Plants utilize the hormone jasmonic acid (JA) to modulate plant:microbe interactions. Disease causing microbes use proteins to alter host JA signaling to aid their growth in plant tissues. Beneficial symbiotic fungi, which colonize plant tissues and provide essential ecosystem services such as carbon sequestration and plant fertilization, can also alter JA signaling in plant cells to promote colonization. Here, we demonstrate that the MiSSP7 protein of the beneficial fungus *Laccaria bicolor* interacts with host plant JA signaling repressors and, in contrast to biotrophic pathogens, promotes symbiosis by blocking JA action. These results shed new light on how beneficial and pathogenic microbes have evolutionarily diverged in the mechanisms by which they overcome plant defenses.

Reserved for Publication Footnotes

137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204



205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272

Fig. 1. MiSSP7 interacts with PtJAZ6 and PtJAZ5. (A) MiSSP7 interacts with PtJAZ6 in Yeast II Hybrid system and activates two reporter genes (histidine biosynthesis, β -Gal activity). (B) MiSSP7 also interacts with PtJAZ5 but no other root-expressed JAZ protein, in Yeast II Hybrid system and activates two reporter genes (histidine biosynthesis, β -Gal activity). SC-L-W = synthetic complete medium without both leucine and tryptophan; SC-L-W-H+3AT = synthetic complete medium without leucine, tryptophan and histidine with the addition of 3-aminotriazol. (C) MiSSP7-GFP expressed in *E. coli* remains diffused within the cytosol before the induction of PtJAZ6-DivIVa. (D) Co-expression of DivIVa with MiSSP7-GFP exhibits maintenance of the GFP signal in the cytosol. (E) Co-expression of PtJAZ6-DivIVa with MiSSP7-GFP causes re-localization of the GFP signal to the poles of the *E. coli* indicating a positive physical interaction between the two proteins. (F) PtJAZ6-nVenus interacts with MiSSP7-cCFP in the nuclei of *Populus* protoplast cells and re-constitutes the Venus fluorescence in bimolecular fluorescence complementation interaction assay. Nuclear localization was determined by the co-localization of the Venus signal with DAPI fluorescence. (G) MiSSP7-cCFP does not interact with nVenus alone to re-constitute the green fluorescent signal. (H) cCFP and PtJAZ6-nVenus do not interact to re-constitute the green fluorescent signal. (I) cCFP and nVenus alone do not interact to re-constitute the green Venus fluorescent signal. Bf = brightfield image; DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole; N = nucleus.

bidopsisidis secretes a number of effectors that target either JAZ proteins that negatively regulate JA signaling (24) or effectors that manipulate ethylene signaling (25), while *Phytophthora infestans* produces different effectors that interfere with SA related signaling (22,23). Like pathogenic organisms, the ECM fungus *Laccaria bicolor* also produces effector proteins called MiSSPs (Mycorrhizal induced Small Secreted Proteins; 26). The first MiSSP of *L. bicolor* to be characterized, MiSSP7, was found to enter host cells and localize to the nucleus where it altered host cell transcription. Localization of MiSSP7 in host cell nuclei was found to be essential for the formation of the Hartig net although the mechanistic reasoning behind this effect was unknown (27). Here we demonstrate that MiSSP7 interacts with the JAZ-domain containing protein PtJAZ6 in the nuclei of the host plant *Populus trichocarpa* where it protects PtJAZ6 from JA induced degradation. MiSSP7 is, further, able to counter the negative impacts of JA on fungal colonization of host tissues, likely through this interaction with JAZ proteins. Our results further the concept that, like pathogenic organisms, mutualistic fungi use effectors to target plant host hormone pathways to foster fungal colonization.

Results:

As reported previously, *L. bicolor* MiSSP7 alone is able to enter roots cells of its host *P. trichocarpa* and alter transcription herein (27). Using a yeast reporter assay (28), we tested if the mature version of MiSSP7 (without a signal peptide) could bind to DNA and induce gene transcription. We found that MiSSP7 alone was not able to induce expression of the reporter genes (*SI Appendix*, Fig. S1), demonstrating that the MiSSP7 protein itself does not directly activate the differential gene transcription previously observed (27). Therefore, we utilized yeast II hybrid (YTH; 28) assays to determine the protein target of MiSSP7 in poplar root cells. In this particular version of YTH, a positive interaction between two proteins induces the expression of two reporter genes in the yeast cell: (i) an auxotrophic marker (*HIS3*) allowing growth of the yeast on a medium containing no histidine and supplemented with 3-aminotriazol, and (ii) a gene encoding a β -galactosidase gene which leads to the production of a blue colored pigment upon treatment with X-gal. Using these parameters, we screened $\sim 1.8 \times 10^7$ yeast zygotes from a cDNA library of poplar ectomycorrhizal roots and identified one plant protein that interacted with MiSSP7: a JAZ domain containing protein encoded by *P. trichocarpa* (POPTR_0003s06670; Fig. 1A). In plant genomes, JAZ proteins form a large multigene

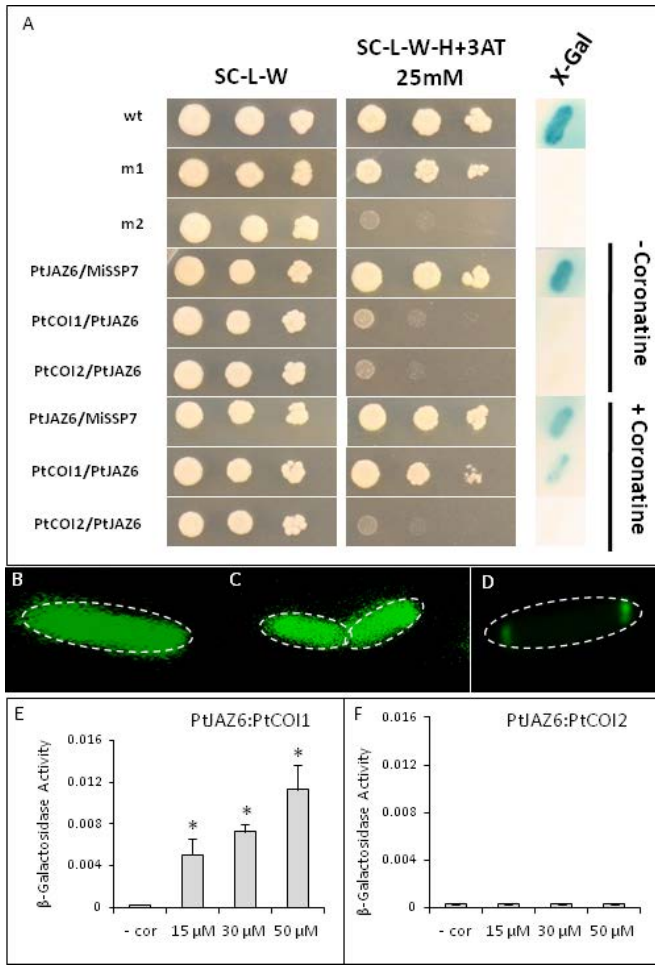


Fig. 2. PtJAZ6 interacts with PtCOI1 in the presence of coronatine. (A) Test of PtCOI1 and PtCOI2 interaction with PtJAZ6 using the Yeast II Hybrid system demonstrates that a positive interaction is only achieved between PtCOI1 and PtJAZ6 when coronatine is present in the growth medium as indicated by the activation of two reporter genes: histidine biosynthesis and β -Gal activity (blue coloration after treatment with X-gal). (B) PtJAZ6-GFP expressed in *E. coli* remains diffused within the cytosol prior to induction of PtCOI1-DivIVa. (C) Co-expression of DivIVa with PtJAZ6-GFP exhibits GFP signal in the cytosol. (D) Co-expression of PtJAZ6-GFP with PtCOI1-DivIVa in medium supplemented with coronatine causes re-localization of the GFP signal to the poles of the *E. coli* indicating a positive interaction between the two proteins. (E) The strength of the interaction between PtJAZ6 and COI1 in yeast cells improves with increasing quantities of coronatine in the growth medium (as determined by an increase in β -galactosidase activity in the yeast cultures) while no amount of coronatine tested induced an interaction between PtCOI2 and PtJAZ6 (F).

family (*SI Appendix*, Fig. S2). The JAZ protein identified as interacting with MiSSP7 shows closest homology to AtJAZ6 in *Arabidopsis* (*SI Appendix*, Fig. S2), therefore we will henceforth refer to this protein as PtJAZ6. While no other JAZ proteins were identified as interacting with MiSSP7 in the general YTH screens, we wished to test if MiSSP7 was able to interact with the other *Populus* JAZ-domain containing proteins found in the *P. trichocarpa* gene repertoire (*SI Appendix*, Fig. S2) and expressed in the ectomycorrhizal roots of *Populus* colonized by *L. bicolor* (Fig. 1B; *SI Appendix*, Fig. S3). Of the other JAZ-domain containing proteins, only PtJAZ5 (POPTR_0001s16639), the paralogous gene to PtJAZ6 (*SI Appendix*, Fig. S2) that shares 73% amino acid identity with PtJAZ6, was also found to interact with MiSSP7 as denoted by growth of yeast colonies on medium lacking histidine and by the blue coloration of the colonies treated with X-Gal (Fig.

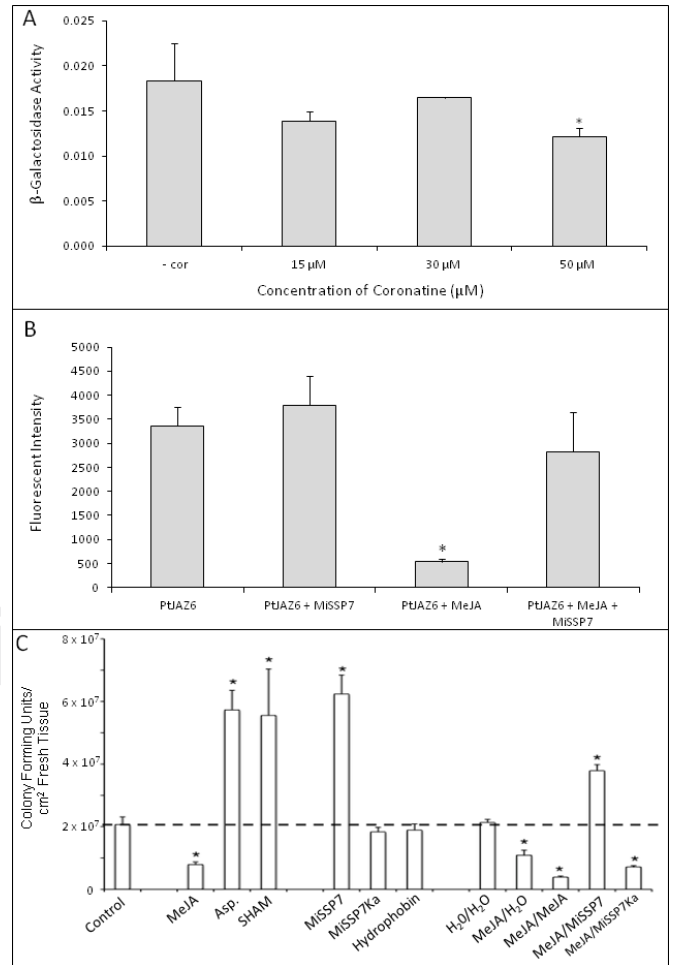


Fig. 3. MiSSP7 alters PtJAZ6 cycling in planta and blocks MeJA activity in *Nicotiana benthamiana* leaves. (A) Treatment with 50 μ M of coronatine significantly reduced the β -galactosidase activity in yeast colonies expressing MiSSP7 and PtJAZ6 as compared to -coronatine (+ SEM; $p < 0.05$) (B) MiSSP7 treatment of *N. benthamiana* leaves reduces MeJA induced nuclear degradation of PtJAZ6-GFP as determined by decrease in GFP fluorescence. (C) MiSSP7 blocks MeJA induced restriction of *P. syringae* DC3000 growth in the leaves of *N. benthamiana*. Values reported are the number of colony forming units per square centimeter of leaf area after 3 days of growth. Dashed line represents the median number of colony forming units retrieved under control conditions. \pm SEM. * = significant difference from control conditions ($p < 0.05$)

1B). Transcription of both *PtJAZ6* and *PtJAZ5* was found to be significantly regulated by MeJA treatment of poplar roots and, to a lesser extent, during the normal course of *L. bicolor* colonization of poplar root tips (*SI Appendix*, Fig. S3).

As the interaction between MiSSP7 and PtJAZ6 was the stronger interaction (as determined by stronger growth on medium lacking histidine and a stronger blue coloration of yeast colonies expressing the MiSSP7:PtJAZ6 constructs; Fig. 1A,B), we proceeded with an in-depth characterization of PtJAZ6's role during the root colonization process by *L. bicolor*. To further verify this interaction, we used two other model interaction systems: the *in vivo* DivIVa interaction system used to confirm direct physical interactions between proteins as reported in Edwards et al. (29; Fig. 1C-E) and the *in planta* bimolecular fluorescence complementation method (BiFC; Fig. 1F-I). In the former test, we found no re-location of MiSSP7 to the poles of the *E. coli* in cells expressing only MiSSP7-GFP (i.e. without induction of PtJAZ6-DivIVa; Fig. 1C), or in cells co-expressing MiSSP7-GFP

409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476

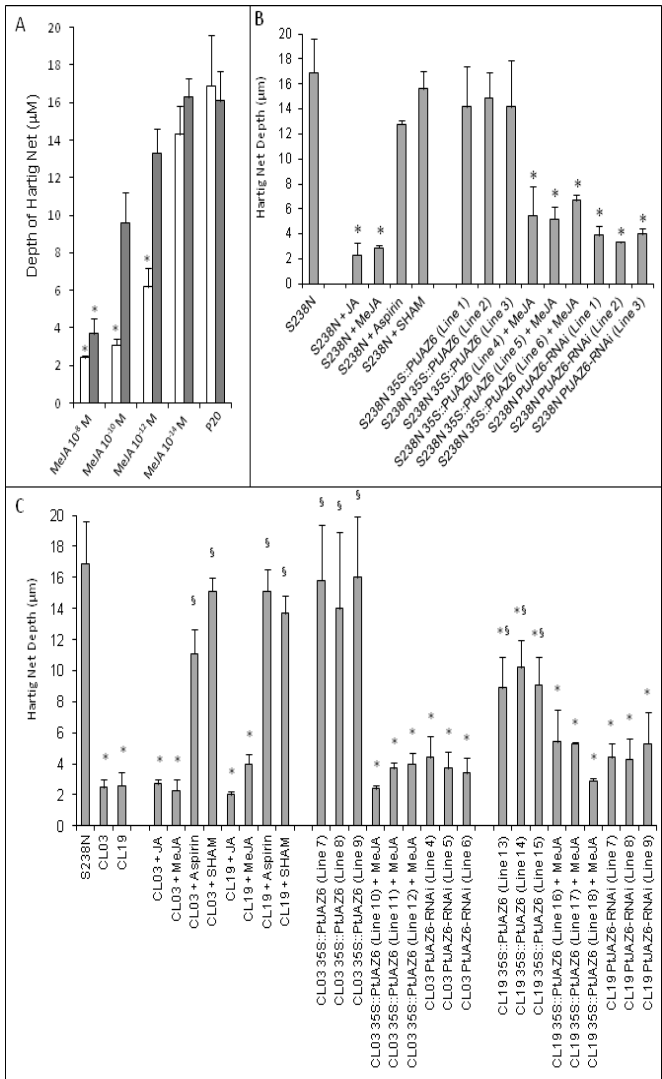


Fig. 4. MiSSP7 activity in ECM root tips mimics pharmacological variation of JA biosynthesis or transgenic variation of PtJAZ6 levels. (A) Growth of *L. bicolor* hyphae between epidermal roots cells (= Hartig net formation) of *P. tremula* x *P. alba* 717-1B4 with simple application of differing concentrations of MeJA (white bars; 10^{-8} to 10^{-14} M) or concurrent application of 15 μ M MiSSP7 with differing concentrations of MeJA (grey bars). * = significant difference from Hartig net development of *L. bicolor* under control conditions (Pachlewski solid medium) ($p < 0.05$). \pm SEM. (B) Depth of hyphal penetration during colonization by wild-type *L. bicolor* S238N (=Hartig net formation) into the apoplast between epidermal root cells of either wild-type *P. tremula* x *P. alba* 717-1B4 or transgenic lines over-expressing PtJAZ6 (35S::PtJAZ6 Line x) or lines with RNAi reduction of PtJAZ6 (PtJAZ6-RNAi Line x) under control conditions, with external addition of JA (+JA) or MeJA (+MeJA), or external addition of JA biosynthesis inhibitors (+Aspirin or +SHAM). (C) The effect that either variation in JA biosynthesis or that transgenic over-expression of PtJAZ6 (35S::PtJAZ6 Line x) or RNAi reduction of PtJAZ6 (PtJAZ6-RNAi Line x) have on the ability of wild-type *L. bicolor* (S238N) or two mutant lines of *L. bicolor* unable to produce MiSSP7 (CL03, CL19) to form a Hartig net. Further, we also tested the ability of externally applied MeJA (10^{-8} M) to saturate the phenotype of 35S::PtJAZ6 roots (35S::PtJAZ6 + MeJA Line x). \pm SEM. * indicates significant difference from wild-type Hartig net formation under control conditions and § indicates significant different in Hartig net depth as compared to either CL03 or CL19 ($p < 0.05$). Each transgenic line (denoted by a number of 1-n) is an independent transformation event.

and the DivIVa protein (Fig. 1D) demonstrating that MiSSP7-GFP does not interact with the DivIVa protein itself. When we expressed MiSSP7-GFP with either PtJAZ6-DivIVa, we found

that the GFP signal re-located to the poles of the cell thus confirming the physical interaction between these two proteins (Fig. 1E). As a further level of confirmation concerning the MiSSP7:JAZ interaction in a physiologically relevant context, we also used BiFC in poplar protoplasts. We observed fluorescence only in cells co-expressing MiSSP7 with PtJAZ6 (Fig. 1F-I). This fluorescence was observed in the nuclei of the poplar cells, the localization of both MiSSP7 and JAZ proteins (SI Appendix, Fig. S4). Therefore, through the proof of three separate methods in *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Populus*, we have demonstrated that MiSSP7 interacts with the JAZ-domain protein PtJAZ6.

AtCOI1 is a receptor of JA and is a known interacting protein of most JAZ proteins in *Arabidopsis* (4-7). Interaction between AtCOI1 and a JAZ protein in the presence of the active form of JA (i.e. JA-Ile) is necessary for induction of JA signaling through the degradation of JAZ proteins (5,7). Unlike *Arabidopsis*, *Populus* encodes two homologues to AtCOI1 which will be denoted here as PtCOI1 (POPTR_0008s06460) and PtCOI2 (POPTR_0010s20030). To determine if the identified PtJAZ6 mirrored the biology of its orthologue AtJAZ6, we performed both a directed YTH and DivIVa interaction assay between PtJAZ6 and either PtCOI1 or PtCOI2 with and without the JA-Ile mimic coronatine (Fig. 2). In both assays only PtCOI1 was found to interact with PtJAZ6 and only in the presence of coronatine (Fig. 2A-D). Further, the strength of the interaction between PtJAZ6:PtCOI1 was increased in yeast cells grown under higher levels of coronatine as determined by a concomitant increase in the levels of β -galactosidase activity (Fig. 2E,F). As coronatine did not affect the growth rate of these cells (SI Appendix, Fig. S5A) nor did it promote the interaction between two proteins from a pathway that is unrelated to JA-Ile/coronatine (i.e. negative control for coronatine promotion of protein:protein interactions SI Appendix, Fig. S5B), these results indicate that, like the *Arabidopsis* model, PtJAZ6 interacts with PtCOI1 but only in the presence of a JA-Ile mimic.

As coronatine induces the interaction between PtCOI1 and PtJAZ6, we tested whether or not coronatine could increase the strength of the interaction between MiSSP7 and PtJAZ6 as quantified by β -galactosidase activity of the yeast cells (Fig. 3A). At all concentrations tested, however, coronatine had no visible effect on promoting the interaction between these proteins. Rather, at the highest concentration, coronatine significantly disrupt the interaction between MiSSP7 and PtJAZ6 as demonstrated by a significant decrease in β -galactosidase activity of the yeast colonies grown on 50 μ M of coronatine (Fig. 3A). Our results demonstrate, therefore, that coronatine does not promote the interaction between MiSSP7 and PtJAZ6.

As coronatine or JA *in planta* lead to the ubiquitination and degradation of JAZ proteins (5,7), and because our findings above suggest that coronatine interferes with MiSSP7 binding to PtJAZ6, we investigated whether MiSSP7 could, conversely, inhibit JA induced degradation of PtJAZ6 *in planta*. In this experiment we expressed a GFP-tagged PtJAZ6 in *Nicotiana benthamiana*. After the appearance of GFP expression, we infiltrated leaves with 1×10^{-8} M MeJA, 1.5×10^{-5} M MiSSP7 or MiSSP7 + MeJA and determined if the GFP fluorescence decreased after treatment. Treatment with MeJA alone resulted in the almost complete loss of nuclear fluorescence indicating degradation of the protein (Fig. 3B) while leaves treated with 1.5×10^{-5} M MiSSP7 had no effect on the PtJAZ6-GFP localization or average intensity in nuclei (Fig. 3B). This supports previous findings that JA induces the degradation of JAZ proteins (5,7) and makes it an ideal platform to test how MiSSP7 might interfere in this process. We found that administration of MeJA + MiSSP7 together resulted in maintenance of a strong nuclear GFP fluorescence that was not significantly different from control conditions (Fig. 3B). Together these data would suggest that MiSSP7 is interfering with the

477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544

545 MeJA-induced degradation of the PtJAZ6-GFP fusion protein in
546 the nucleus thereby resulting in an increased lifetime for PtJAZ6.

547 We further confirmed the role of MiSSP7 in impeding the
548 effect of MeJA *in planta* using the pathogenic interaction between
549 *N. benthamiana* leaves and *Pseudomonas syringae* DC3000. In this
550 experiment we analyzed the ability of MiSSP7, inhibitors of the JA
551 signaling pathway and MeJA to control the growth of *P. syringae*
552 DC3000 in the leaves of *N. benthamiana* (Fig. 3C). We found that
553 MeJA induced a decrease in *P. syringae* growth in *N. benthamiana*
554 leaves while the JA biosynthetic inhibitors aspirin and SHAM led
555 to an increase in the growth of *P. syringae* in *N. benthamiana* leaves
556 (Fig. 3C). If leaves were infiltrated with MiSSP7, we found that the
557 *P. syringae* population in leaves increased, mirroring the effect of
558 JA biosynthetic inhibitors. To ensure that the effect of MiSSP7 on
559 *P. syringae* growth was not associated with the protein remaining
560 in the apoplastic space, and thus acting as an additional carbon
561 source for the bacterium, we used two controls – we treated leaves
562 with either a mutated version of MiSSP7 (MiSSP7Ka), which
563 cannot enter plant cells (27), or with a secreted hydrophobin of *L.*
564 *bicolor* (JGI protein ID 399293) that also remains in the apoplast
565 or on cellular membranes (30). In both of these cases, growth of
566 the bacteria was not affected (Fig. 3C) indicating that MiSSP7 is
567 affecting bacterial growth by altering plant cell physiology rather
568 than directly influencing the bacterium itself. To determine if
569 MiSSP7 could counter MeJA action in the leaves, and thereby en-
570 courage bacterial proliferation, we co-infiltrated leaves with MeJA
571 and MiSSP7 and determined the growth potential of *P. syringae*.
572 We found that bacterial growth was significantly higher in leaves
573 treated with MiSSP7 in conjunction with MeJA as opposed to
574 MeJA treatment alone (Fig. 3C; $p < 0.05$). Therefore MiSSP7 was
575 able to block, or mitigate, the action of MeJA in leaves of *N.*
576 *benthamiana*.

577 Given the key role of MiSSP7 in the formation of the Hartig
578 net during the colonization of *P. trichocarpa* roots by *L. bicolor*
579 (26), the role of JA in inhibiting *L. bicolor* colonization of poplar
580 root tips (20) as well as the ability of MiSSP7 to associate with
581 PtJAZ6, we were interested in determining: (i) if MiSSP7 appli-
582 cation could block the limiting effect of JA on *L. bicolor* Hartig
583 net development and (ii) if altering levels of JA or of PtJAZ6
584 could complement *L. bicolor missp7* RNAi mutants that exhibit
585 restricted development of the Hartig net (27). The inhibition
586 of Hartig net formation induced by exogenous MeJA is dose
587 dependent, with lower concentrations of MeJA (10^{-14} M) having
588 no significant effect on the establishment of the Hartig net and
589 concentrations higher than 10^{-12} M significantly inhibiting Hartig
590 net formation (Fig. 4A). When 15 μ M synthetic MiSSP7 was
591 exogenously added to the root system undergoing colonization by
592 *L. bicolor* in the presence of MeJA, however, the development of
593 a Hartig net was reinstated at concentrations of MeJA that would
594 normally be inhibiting this process (i.e. 10^{-10} M; Fig. 4A). As JA
595 treatment of tissues results in the degradation of JAZ proteins
596 (5,7), this would suggest that reduced expression of PtJAZ6 may
597 affect colonization of poplar roots by wildtype *L. bicolor*. To test
598 this, we generated transgenic roots with increased or decreased
599 production of PtJAZ6 and tested the ability of *L. bicolor* to form
600 a Hartig net in these roots (Fig. 4B; *SI Appendix*, Fig. S6,7). We
601 found that in *PtJAZ6* RNAi lines, the development of the Hartig
602 net was significantly impeded (Fig. 4B). Similarly, formation of a
603 Hartig net in *L. bicolor missp7* lines was found to be re-instated
604 if roots were treated with aspirin or SHAM or if *PtJAZ6* was
605 over-expressed in root tissues ($>2^4$ fold Fig. 4C; *SI Appendix* Fig.
606 S7). The observed establishment of the Hartig net in 35S::*PtJAZ6*
607 roots colonized *L. bicolor missp7* was abolished by the external
608 application of MeJA indicating that the phenotype was due to
609 altered JA signaling rather than an artifact of the transformation
610 process (Fig. 4C). Therefore, an increase in the expression of
611 *PtJAZ6* or the pharmacological suppression of JA signaling are

612 both able to replace the role of MiSSP7 during the development
613 of the Hartig net.

614 Discussion:

615 Plants have developed a complex defensive response system to
616 protect themselves against invasion by detrimental organisms,
617 often mediated by plant hormones. Invading organisms, in turn,
618 have developed various methods to circumvent the plant's de-
619 fenses or control plant cell function to their benefit. Pathogens
620 such as *Pseudomonas syringae* and *Hyaloperonospora arabidop-*
621 *sidis*, attempt to manipulate the plant response by producing
622 effectors that target different components of the JA and ET
623 signaling pathways in such a fashion that colonization is favored
624 (24-25). Like pathogenic bacteria, mutualistic fungi affect plant
625 hormone signaling cascades to achieve colonization (31-36), al-
626 though the knowledge of the mechanistic reasoning behind most
627 of these differences is in its infancy. We demonstrate here that
628 MiSSP7, an effector protein produced by the mutualistic ECM
629 fungus *L. bicolor*, targets plant-encoded JAZ proteins in partic-
630 ular PtJAZ6 and interacts with it in the nucleus of the plant.
631 Through this interaction, MiSSP7 is able to block the activity
632 of MeJA and promote the proliferation of both bacteria and *L.*
633 *bicolor* in plant tissues. This effect is likely due to the ability of
634 MiSSP7 to stabilize the JAZ protein and reduce the JA induced
635 degradation of the JAZ protein. Finally, we demonstrate that
636 the activity of MiSSP7 during the colonization process can be
637 replaced by either inhibiting JA signaling *in planta* or through
638 transgenic over-expression of the PtJAZ6 gene.

639 It is interesting that MiSSP7 acts to *block* the action of JA in
640 tissues as both biotrophic pathogens and mutualistic arbuscular
641 mycorrhizal (AM) fungi promote JA accumulation in plant tissues
642 during colonization and a decrease in SA levels (37). In these
643 latter systems, JA appears to favor colonization of plant tissues.
644 More recently, observations have been made that the distantly
645 related *L. bicolor* is distinct from other biotrophic organisms
646 in that JA inhibits their proliferation within root tissues (20)
647 and the observation that the colonization by the ECM fungus
648 *Paxillus* results in SA accumulation in root tissues and a decrease
649 in JA biosynthesis (32). Our results give the first mechanistic
650 insight into how an ECM fungus may negatively regulate plant
651 JA signaling in cells that are in direct contact with fungal hyphae
652 through direct interaction between an ECM fungal effector pro-
653 tein and plant JAZ proteins. JAZ proteins within the *Arabidopsis*
654 model have been shown to be JA signaling repressors. While
655 our results do not yet definitively prove a similar function for
656 PtJAZ6, its homology to AtJAZ6 and our results presented here
657 suggest that this is the role played by PtJAZ6 in poplar roots. It
658 would then follow that MiSSP7-induced stabilization of PtJAZ6
659 results in an extended period of JA signaling repression during the
660 colonization of poplar roots by *L. bicolor*. This repression within
661 root rhizodermal cells is sufficient to allow for the penetration of
662 fungal hyphae into the root and establishment of the Hartig net.
663 Therefore MiSSP7 is a master regulator of plant colonization by
664 *L. bicolor* due to its ability to target and interact with the plant
665 protein PtJAZ6 in root cells encased by the Hartig net. These
666 findings have a fundamental impact upon our understanding of
667 how *L. bicolor* 'negotiates' a symbiotic relationship by altering
668 a plant's ability to respond to increases in the pools of JA-
669 Ile precursors. It remains to be seen if other mutualistic fungi
670 similarly target JAZ-domain proteins and, thereby, affect the JA
671 responsiveness of their host plant to foster symbiotic interactions.

672 Materials and Methods

673 Template cDNA for all cloning and YTH procedures was generated from
674 RNA extracted using *Populus trichocarpa* roots undergoing colonization by *L.*
675 *bicolor* S238N after 0, 2, 4, 6 and 12 weeks post contact with the fungus. Yeast
676 DNA reporter assay and yeast II hybrid screens were performed as outlined
677 previously (28,29). DivIVa and BiFC interaction tests were used to verify each
678
679
680

681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748

interaction found in the YTH as per (29,39). In the former system, one protein is constitutively expressed with a GFP-tag and the other protein is inducibly expressed with a DivIVa-tag (a tag that causes localization of the tagged protein to the poles of the *E. coli* cell). Before induction of the DivIVa-tagged protein, or in the case of a negative interaction between the two proteins, the GFP signal remains localized within the general cytoplasm of the *E. coli*. In the case of a positive interaction between the proteins of interest, however, the DivIVa-tagged protein together with the GFP-tagged protein (and thus the GFP signal) will relocate to the poles of the cell. In BiFC the two proteins of interest are tagged with two parts of a fluorescent protein that, in-and-of themselves, are not fluorescent. Should the two proteins of interest interact, however, the fluorescent protein is re-instated and regains the ability to fluoresce (39).

An *in vitro* assay was used to determine the effects of different chemicals on the ability of *L. bicolor* S238N to colonize poplar roots after 2 weeks of contact between the two organisms as per Felten et al (34). To test if transcriptionally altering the transcription of *PtJAZ6* could complement the loss of MiSSP7 in *L. bicolor* *missp7* RNAi mutants during mycorrhization, we used *A. rhizogenes* strain 15834 to generate stably transformed roots of *Populus tremula* x *P. alba* 717-1B4 using a technique similar to that described in Chabaud et al. (40). In short, 1 cm explants of 2 month old *Populus tremula* x *P. alba* 717-1B4 plants were taken, their leaves removed and the base inoculated with *A. rhizogenes* carrying the appropriate plant transformation vector using a sterile needle. Infected explants were then planted in solid

1. McDowell JM, Dangel JL (2000) Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem Sci* 25:79–82.
2. Thomma B, et al. (2001) Different micro-organisms differentially induce Arabidopsis disease response pathways. *Plant Physiol Biochem* 39:673–680.
3. Fonseca S, et al. (2009) (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat Chem Biol* 5:344–350.
4. Yan J, et al. (2009) The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *Plant Cell* 21:2220–2236.
5. Katsir L, Schilmiller AL, Staswick PE, He SY, Howe GA (2008) COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:7100–7105.
6. Chini A, et al. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signaling. *Nature* 448: 666–671.
7. Thines B, et al. (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signaling. *Nature* 448:691–696.
8. Yan YX, et al. (2007). A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell* 19: 2470–2483.
9. Weiler EW, et al. (1994) The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signaling molecules in higher plants. *FEBS Letters* 345:9–13.
10. Koda Y, et al. (1996) Similarities of the biological activities of coronatine and coronafacic acid to those of jasmonic acid. *Phytochemistry* 40:93–96.
11. Bender CL, Alarcon-Chaidez F, Gross DC (1999) *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:266.
12. He P, et al. (2004) Activation of a COI1-dependent pathway in Arabidopsis by *Pseudomonas syringae* type III effectors and coronatine. *Plant J* 37:589–602.
13. Kiers ET, et al. (2011) Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 333:880–882.
14. Korkama T, Fritze H, Pakkanen A, Pennanen T (2007) Interactions between extraradical ectomycorrhizal mycelia, microbes associated with the mycelia and growth rate of Norway spruce (*Picea abies*) clones. *New Phytol* 173:798–807.
15. Bellion M, Courbot M, Jacob C, Blaudez D, Chalot M (2006) Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Lett* 254:173–181.
16. 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
17. Floudas D, et al. (2012) The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* 336:1715–1719.
18. Plett JM, Martin F (2011) Blurred boundaries: lifestyle lessons from ectomycorrhizal fungal genomes. *Trends Genet* 27:14–22.
19. Massicotte HB, Peterson L, Melville LH (1989) Hartig net structure of ectomycorrhizae synthesized between *Laccaria bicolor* (Tricholomataceae) and two hosts: *Betula alleghaniensis* (Betulaceae) and *Pinus resinosa* (Pinaceae). *Amer J Bot* 76:1654–1667.
20. Plett JM, et al. (*in press*) Ethylene and jasmonic acid act as negative modulators during mutualistic symbiosis between *Laccaria bicolor* and *Populus* roots. *New Phytol*
21. Martin F, Kamoun S (2011) Effectors in plant-microbe interactions. F Martin and S Kamoun ed. John Wiley & Sons Inc.
22. Tian M, Huitema E, Da Cunha L, Torto-Alalibo T, Kamoun S (2004) A Kazal-like extracel-

ular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. *J Biol Chem* 279:26370–26377.

MS medium and allowed to root for 3 weeks. To test the effect of MiSSP7 and different chemical agents that affect jasmonic acid (JA) signaling on the growth of *P. syringae* DC3000, we infiltrated leaves of *N. benthamiana* with 10 mM MgCl₂ (as a control) or 10 mM MgCl₂ supplemented with the different chemicals outlined in the text followed by infiltration of a suspension of 10⁴ cfu/mL *P. syringae* DC3000. Bacteria were allowed to grow in plant tissues for three days after which 1 cm² of leaf was ground, plated on King Buffer medium and cfu/cm² counted as per (41).

Full methods and any associated references can be found in supplementary data.

Acknowledgments: .

This work was supported by the European Commission within the Project ENERGYOPLAR (FP7-211917), and the ANR project FungEffector (to FM). This research was also sponsored by the Genomic Science Program (project 'Plant-Microbe Interactions'), U.S. Department of Energy, Office of Science, Biological and Environmental Research under the contract DE-AC05-00OR22725. We would like to thank the Arabidopsis Biological Resource Center at The Ohio State University for the BiFC vectors, M. Buée and Y. Dessaux for kindly supplying the strain 15834 of *A. rhizogenes* and T. Kazmierca for supplying *N. benthamiana* plants. We would also like to acknowledge the technical assistance of B. Pêtre and M. Ouassou. FM's research group is part of the Laboratory of Excellence ARBRE (ANR-11-LABX-0002-01).

23. Tian M, Benedetti B, Kamoun S (2005) A second Kazal-like protease inhibitor from *Phytophthora infestans* inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69B of tomato. *Plant Physiol* 138:1785–1793.
24. Mukhtar MS, et al. (2011) Independently evolved virulence effectors converge onto hubs in a plant immune system network. *Science* 333:596–601.
25. Cohn JR, Martin GB (2005) *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* type III effectors AvrPto and AvrPtoB promote ethylene-dependent cell death in tomato. *Plant J* 44:139–154.
26. Martin F, et al. (2008) The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* 457:88–92.
27. Plett JM, et al. (2011) A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Curr Biol* 21:1197–1203.
28. Plett JM, Montanini B, Kohler A, Ottonello S, Martin F (2011) Tapping genomics to unravel ectomycorrhizal symbiosis. *Methods Mol Biol* 722:249–281.
29. Edwards AN, et al. (2009) An *in vivo* imaging-based assay for detecting protein interactions over a wide range of binding affinities. *Analyt Biochem* 395:166–177.
30. Plett JM, et al. (2012) Phylogenetic, genomic organization and expression analysis of hydrophobin genes in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Fungal Genet Biol* 49:199–209.
31. Hause B, Schaarschmidt S (2009) The role of jasmonates in mutualistic symbioses between plants and soil-born microorganisms. *Phytochem* 70:1589–1599.
32. Luo Z-B, et al. (2009) Upgrading root physiology for stress tolerance by ectomycorrhizas: insights from metabolite and transcriptional profiling into reprogramming for stress anticipation. *Plant Physiol* 151:1902–1917.
33. Klopffholz S, Kuhn H, Requena N (2011) A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Curr Biol* 21:1204–1209.
34. Felten J, et al. (2009) The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates lateral root formation in poplar and *Arabidopsis* through auxin transport and signaling. *Plant Physiol* 151:1991–2005.
35. Sukumar P, et al. (2013) Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant-microorganism interactions. *Plant Cell Environ* 36: 909–919.
36. Splivallo R, et al. (2009) Truffles regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene. *Plant Physiol* 150: 2018–2029.
37. López-Ráez JA, et al. (2010) Hormonal and transcriptional profiles highlight common and differential host responses to arbuscular mycorrhizal fungi and the regulation of the oxylipin pathway. *J Ex Bot* 61: 2589–2601.
38. Walhout AJM, Vidal M (2001) High-throughput yeast two-hybrid assays for large-scale protein interaction mapping. *Methods* 24:297–306.
39. Lee LY, et al. (2012) Screening a cDNA library for protein-protein interactions directly in planta. *Plant Cell* 24:1746–1759.
40. Chabaud M, et al. (2003) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation. In *The Medicago truncatula handbook*, U. Mathesius, E.P. Journet, L.W. Sumner eds.
41. Pastar I et al. (2013) Interactions of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in polymicrobial wound infection. *PLoS One* 8:e56846.

749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816

Supplementary Figures:

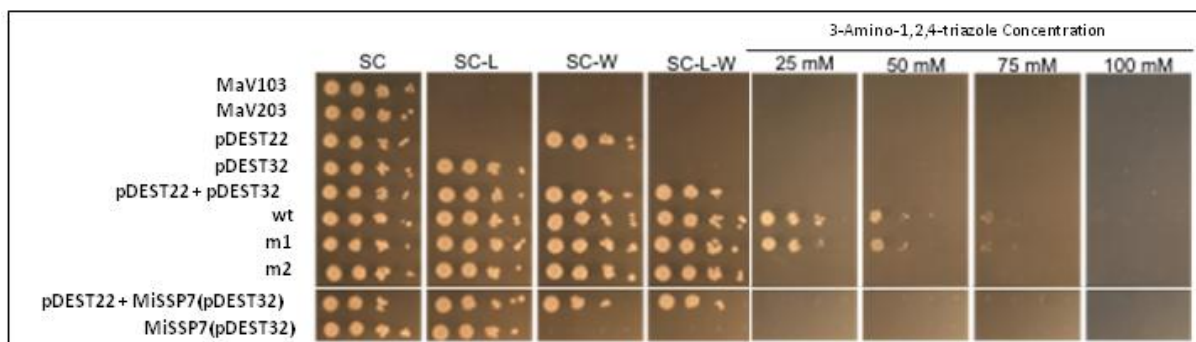


Fig. S1: MiSSP7 cannot induce gene expression in yeast reporter system. Yeast analysis demonstrates that MiSSP7 (pDEST22 + MiSSP7(pDEST32) or MiSSP7(pDEST32)) is not able to activate transcription of the histidine biosynthesis reporter gene as compared to a strong interaction positive control (wt), a weak interaction control (m1) and all negative controls (m2; MaV103; MaV203; pDEST22; pDEST32; pDEST22 + pDEST32). SC = synthetic complete medium; SC-L = synthetic complete medium without leucine; SC-W = synthetic complete medium without tryptophan; SC-L-W = synthetic complete medium without both leucine and tryptophan.

Fig. S2: Phylogenetic tree of JAZ proteins from 10 different plant species. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the JTT matrix-based model (12). The bootstrap consensus tree inferred from 500 replicates (13) is taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed (14). Branches corresponding to partitions reproduced in less than 30% bootstrap replicates are collapsed. Evolutionary analyzes were conducted in MEGA5 (14). As the JAZ proteins are very divergent we included all amino acids in the analysis. All proteins are identified by either published name (for *Arabidopsis thaliana*) or by Phytozome annotation. POPTR: *Populus trichocarpa*; AT: *Arabidopsis thaliana*; Glyma: *Glycine max*; Mdo: *Malus domestica*; Ppe: *Prunus persica*; Cpa: *Carica papaya*; Egr: *Eucalyptus grandis*; Csi: *Citrus sinensis*; Ccl: *Citrus clementina*; Medtr: *Medicago truncatula*.

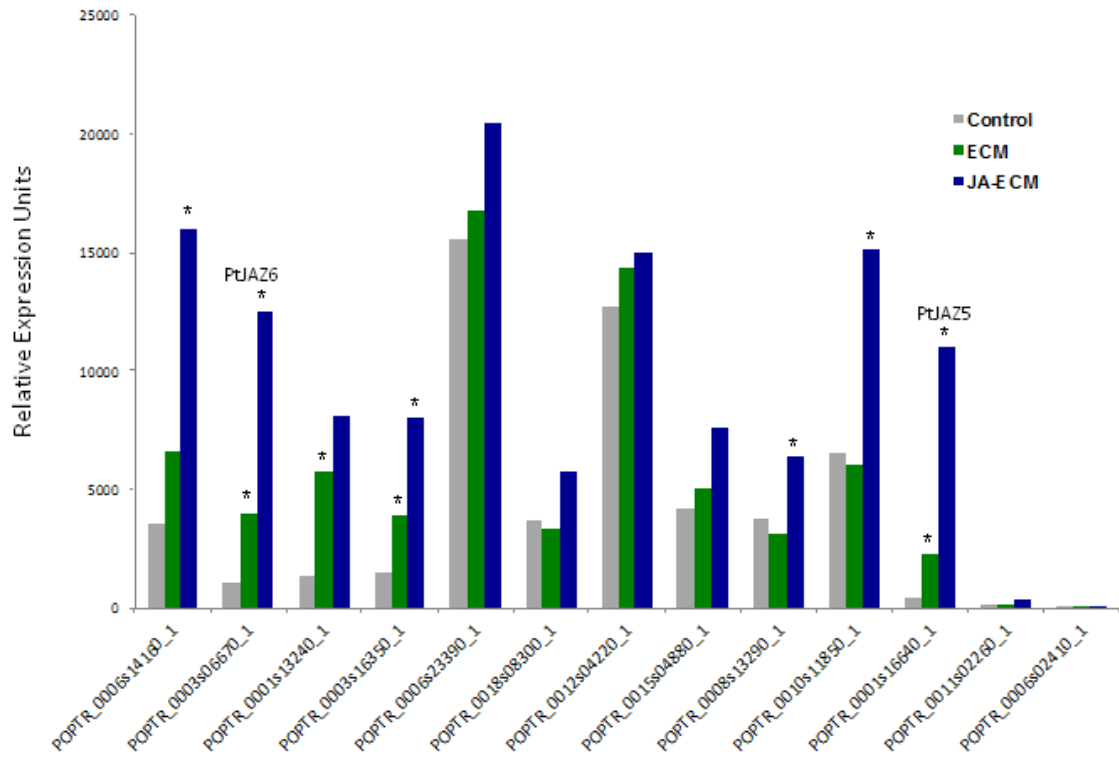


Fig. S3: Expression of different JAZ domain-containing genes are induced during *L. bicolor* colonization and by 1×10^{-8} M JA treatment. Relative expression of the 13 JAZ domain containing genes in the *Populus trichocarpa* genome in fine roots, in mature ECM root tips and in 1×10^{-8} M JA treated ECM root tips as measured by whole genome oligo-arrays. All tissues were grown under the same conditions and harvested after 2 weeks post contact between roots and *L. bicolor*. All values are the mean of 3 biological replicates. * = significant difference from control conditions ($p < 0.05$).

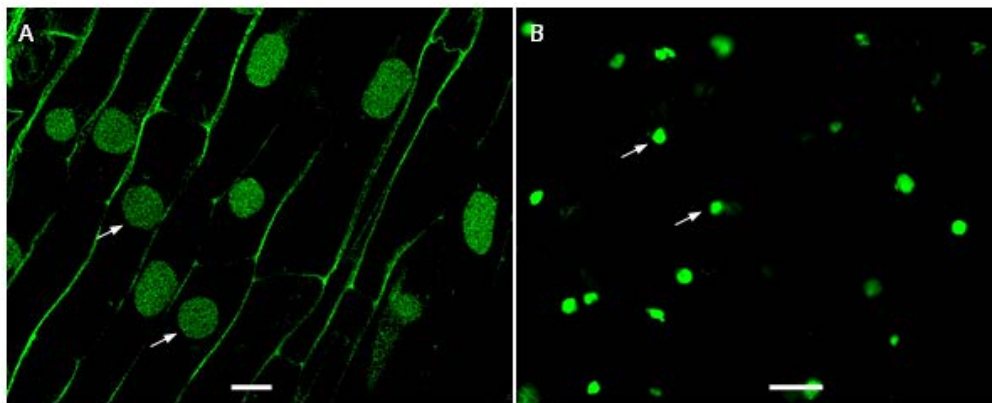


Fig. S4: MiSSP7 and PtJAZ6 localize to plant nuclei. (A) Root cells treated with 15 μM MiSSP7-FAM exhibit uptake of the fluorescent molecule and localization of the protein in the plant nucleus (examples indicated with arrows). Scale bar = 10 μm . (B) Transient transformation of *N. benthamiana* leaves with *35S::PtJAZ6-GFP* construct via agroinfiltration results in production of GFP-tagged PtJAZ6 which localizes predominantly in the nucleus (examples indicated with arrows). Scale bar = 40 μm .

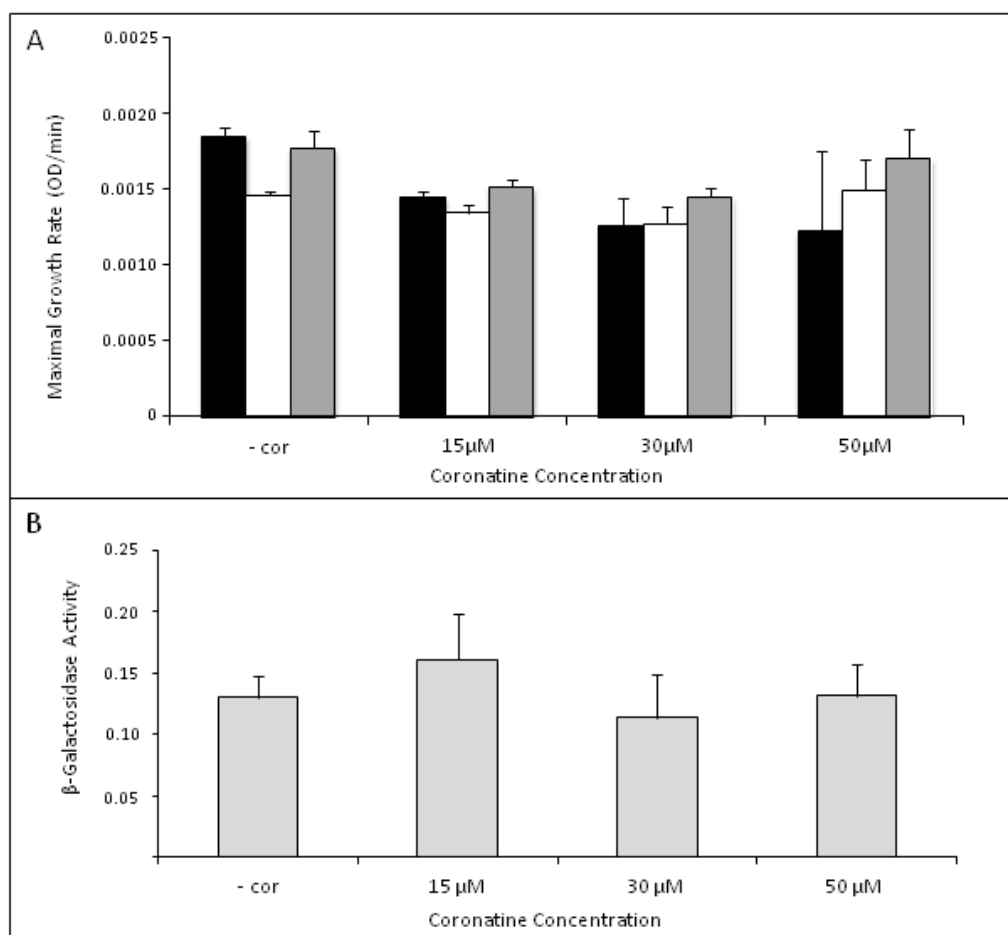


Fig. S5: Coronatine does not affect yeast growth nor does it alter the interaction between proteins unrelated to the JA pathway. (A) A comparison of maximal growth rate of yeast expressing MiSSP7+PtJAZ6 (black bars), PtJAZ6+PtCOI1 (white bars) or PtJAZ6+PtCOI2 (grey bars). (B) β-galactosidase activity of yeast cells grown on differing concentrations of coronatine and expressing the control interacting proteins of the ProQuest YTH System (Life Technologies). ± SEM.

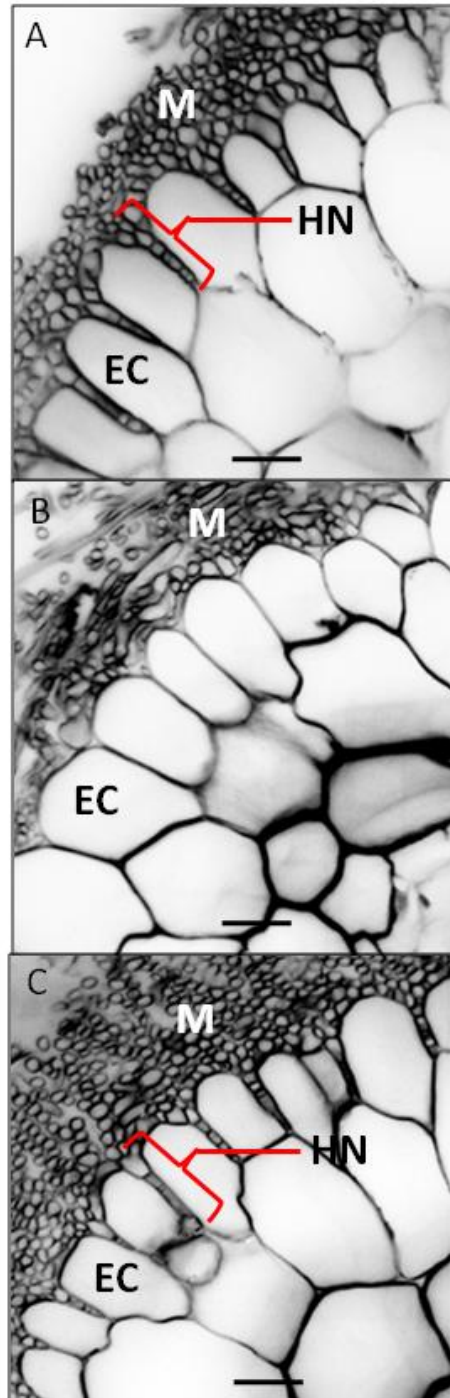


Fig. S6: Transgenic variation of *PtJAZ6* expression alters *L. bicolor*'s ability to form a Hartig net. (A) Transverse cross-section of control ECM roots with no altered expression of *PtJAZ6* exhibit normal mantle formation (M) and formation of a Hartig net (HN). (B) Transverse cross-section of *PtJAZ6-RNAi* ECM root with no visible Hartig net. (C) Transverse cross-section of *35S::PtJAZ6* ECM root with normal Hartig net development. Scale bar = 15 μ m. Parentheses show the depth of the Hartig net in (A) and (C).

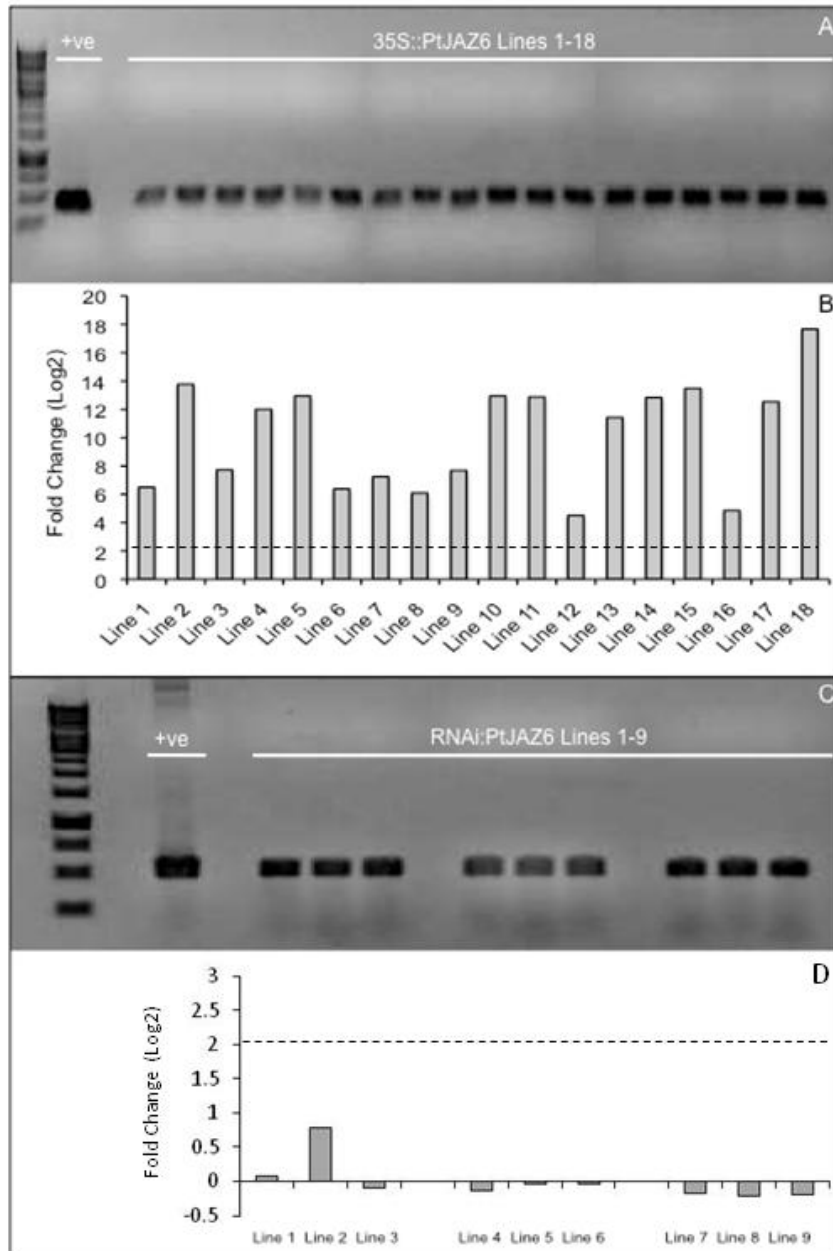


Fig. S7: Proof of gDNA insertion of *PtJAZ6* T-DNA constructs and mis-regulation of *PtJAZ6*. (A) PCR proof of gDNA insertion of the *35S::PtJAZ6* T-DNA construct into 18 independent transformant *Populus* lines (denoted in main text as *35S::PtJAZ6* Line 1-18) and (B) subsequent quantitative PCR proof of over-expression of *PtJAZ6*. This graph is the expression of *PtJAZ6* in colonized mutant root tissues as compared to uncolonized control root tissues. (C) PCR proof of gDNA insertion of the *PtJAZ6-RNAi* T-DNA construct into 9 independent transformant lines (denoted in main text as *PtJAZ6-RNAi* Line 1-9) and (D) subsequent quantitative PCR analysis of the levels of *PtJAZ6*. This graph is the expression of *PtJAZ6* in colonized mutant root tissues as compared to uncolonized control root tissues. In (B) and (D) the dashed line represents the normal expression of *PtJAZ6* in wildtype roots of poplar colonized by *L. bicolor*. Expression values over this line represent over-expression of the gene and expression values under the line represent reduced expression of the gene. +ve = PCR of the hygromycin resistance gene in the transformation vector.

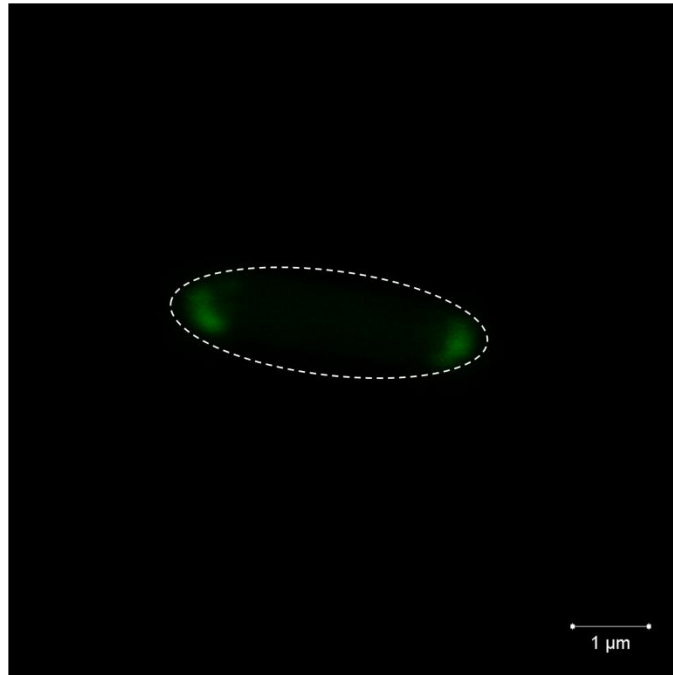


Figure S8: PtJAZ6 interacts with PtCOI1 in the presence of coronatine. Co-expression of PtJAZ6-DivIVa with PtCOI1-GFP causes re-localization of the GFP signal to the poles of the *E. coli* indicating a positive interaction between the two proteins.

PtJAZ6 pourrait faire partie d'un complexe de liaison à l'ADN

Nous disposons de beaucoup d'informations concernant les protéines qui interagissent avec les récepteurs JAZ chez *A. thaliana* (Pauwels et Goossens, 2011). Toutefois, nous ne savons pas si ces interactions sont conservées chez *P. trichocarpa*. C'est pourquoi nous avons effectué une série de croisement Y2H avec PtJAZ6 comme appât, contre des banques racine et mycorhize. Nous avons ainsi identifié 4 protéines : PtJAZ6 (POPTR_0003s06670), une protéine 14-3-3 (POPTR_0005s17740 ; Pt14-3-3), un facteur de transcription MYC (POPTR_0014s09520 ; PtMYC) et à nouveau MiSSP7 (Figure S9). Toutes les interactions ont été confirmées en utilisant le système DivIVA.

Les interactants de PtJAZ6 étant connus pour faire partie du complexe de liaison à l'ADN (Chini *et al.*, 2009; Kerkhoff *et al.*, 1991; Pan *et al.*, 1999; Bridges et Moorhead, 2005; Chavalier *et al.*, 2009), nous nous sommes intéressés à l'architecture de ce complexe putatif. Nous avons testé la capacité de chaque protéine à former des homodimères ou à interagir avec les autres membres du complexe. Ainsi, nous avons montré que les protéines PtJAZ6, Pt14-3-3 et PtMYC forment des homodimères (Figure S9). Mis à part PtJAZ6 qui semble constituer le noyau central du complexe, Pt14-3-3 et PtMYC n'interagissent pas les unes avec les autres (Figure S9). Ces interactions ont également été confirmées à l'aide du système DivIVA.

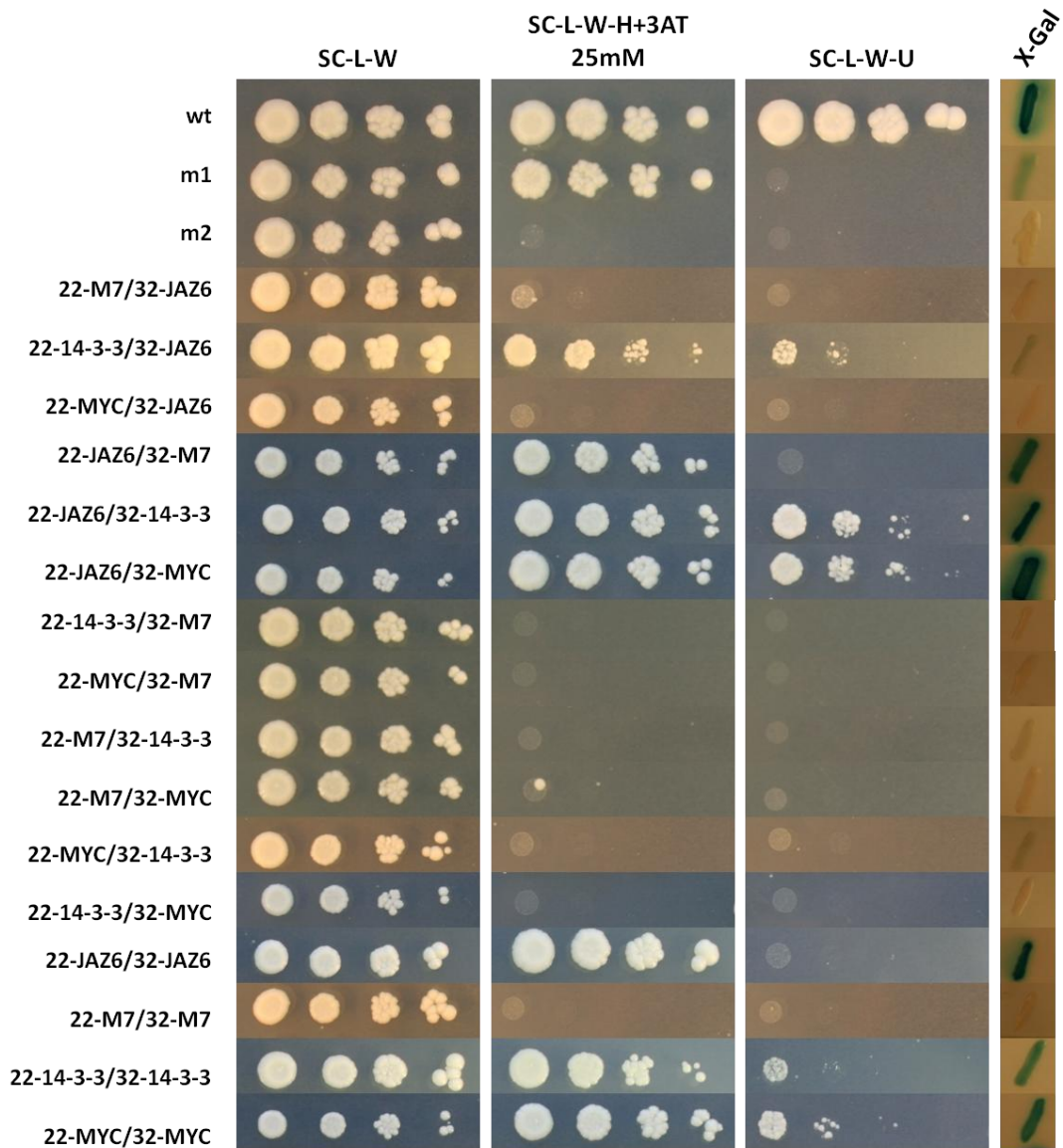


Figure S9: PtJAZ6 makes up part of a DNA binding complex. Interactions were tested using Yeast II Hybrid system. Positive interaction is indicated by the activation of at least two reporter genes: histidine biosynthesis, uracil biosynthesis and β -Gal activity (blue coloration after treatment with X-gal).

Supplementary Materials and Methods

DNA recombination procedures

Template cDNA for all cloning procedures was created from RNA extracted using the RNeasy Plant kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions with the addition of 25 mg polyethylene glycol 8000/mL RLC buffer to the extraction solution from *Populus trichocarpa* roots undergoing colonization by *L. bicolor* S238N. An on-column DNA digestion step with DNase I (Qiagen) was also included to avoid DNA contamination. RNA quality was verified by Experion HighSens capillary gels (Bio-Rad). Synthesis of cDNA from 100 ng of total RNA was performed using the iScript kit (Bio-Rad) according to manufacturer's instructions. For cloning procedures all primers were ordered from Eurogentec (France) and PCR amplification was performed using Accuprime Pfx Taq (Invitrogen) according to manufacturer's instructions and optimized according to each primer pairing. All primers were designed using *L. bicolor* genome version 2.0 (<http://genome.jgi-psf.org/>) and *P. trichocarpa* genome version 3.0 (www.phytozome.net). All vectors, with the exception of the BiFC vectors, used in this study were GATEWAY compatible (Invitrogen) and BP and LR clonase recombination reactions were performed according to instructions provided by the manufacturer (Invitrogen). Genes used in BiFC cloning were inserted directly into the vectors (pSATN-cCFP and pSATN-nVenus) using BglII and BamHI site using the In-Fusion recombination enzyme as per manufacturer's instructions (Clontech). *Escherichia coli* strain DH5 α was utilized for all sub-cloning procedures.

Yeast I and yeast II hybrid analyses

Yeast I and II hybrid screens were carried out according to (1,2). Yeast II mating were performed with MiSSP7 as bait protein against a cDNA library of *Populus trichocarpa* roots colonized with *Laccaria bicolor* at different stages of development. In each case, at least one third of the mated cells (Usually 1×10^6 to 3×10^6 zygotes) were plated on selective medium and analyzed for interacting proteins. To ascertain if coronatine would affect the level of the interaction between MiSSP7 and PtJAZ6, we grew *S. cerevisiae* Mav203 colonies expressing both MiSSP7 and PtJAZ6 on minimal selective medium (SC-L-W) supplemented with a range of coronatine concentrations (0, 15, 30, 50 μ M) for 24 hours after which colonies were frozen for 30 seconds in liquid nitrogen and the amount of β -Gal activity assay was performed as described by (2). A minimum of three biological replicates were performed at each concentration of coronatine to ensure reproducibility of each value measured.

DivIVa interaction tests

Full length genes of interest were cloned into either pNDIV, pCDIV, pNGFP or pCGFP for the *in vivo* DivIVa interaction tests (3). For the interaction tests, *E. coli* strain BL21(DE3) (Invitrogen) were freshly co-transformed with two plasmids (one p*DIV and one p*GFP) and grown in Luria-Bertani (LB) medium supplemented with 15 μ g/ml chloramphenicol and 50 μ g/ml ampicillin for each test and were grown at 37°C for all tests. Positive colonies containing the two vectors were sub-cultured into fresh $\frac{1}{2}$ LB medium supplemented with chloramphenicol and ampicillin and grown for 2-3 hours. At this point, the cells were observed to ensure that the GFP-tagged protein was being expressed and was located in the cytoplasm after which the DivIVa-tagged protein was induced with L-arabinose to a final concentration of 0.2% to LB medium. Cultures were

induced for a maximum of 30-45 minutes and observed within this timeframe for re-localization of the GFP marker. Images were captured with a Leica TCS SP2 scanning confocal microscope as reported in Edwards et al. (3). A positive interaction was met if at least 50% of the cells exhibited GFP relocalization to the poles of the bacterium.

In vitro mycorrhiza formation

An *in vitro* assay was used to determine the effects of different chemicals on the ability of *L. bicolor* S238N to colonize poplar roots. In this assay, *P. tremula* x *P. alba* clone 717-1B4 was rooted in between two cellophane membranes on the surface of solid MS medium (4). At the same time, new *L. bicolor* fungal colonies were grown on a cellophane membrane on Pachlewski solid medium (2.7 mM di-ammonium tartrate, 7.3 mM KH_2PO_4 , 2.0 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 13 mM maltose, 110 mM glucose, 2.9 μM thiamine-HCl, and 1 mL of a trace-element stock solution Kanieltra medium solidified with 1.2% agar). Once the poplar roots had achieved a length of between two and three centimeters, they were transferred onto a cellophane membrane on mycorrhization media low-glucose Pachlewski solid medium (control) or medium supplemented with a final concentration of 10^{-8} M MeJA or JA, 100 μM aspirin or SHAM and placed into direct contact with 10 day old *L. bicolor* or *L. bicolor missp7* RNAi mutant colonies as per Felten et al. (4). Concentrations of these compounds were chosen based on previous work which showed their biological activities at these dosages (5-8). To test if MiSSP7 could block the effect of MeJA, after 1 week of direct contact between *L. bicolor* and *P. tremula* x *P. alba* clone 717-1B4 on low-glucose Pachlewski medium supplemented to a final concentration of 10^{-8} - 10^{-14} M MeJA (test) or the equivalent amount of water (control), newly emerged lateral roots in contact with *L. bicolor* were dosed with either sterile distilled water (control) or with 15 μM of MiSSP7 peptide in water (Southeastern BioLab; Huntsville, AB). The synthesis of the MiSSP7 peptide followed strict quality control to avoid contamination with pirate peptides and was controlled using HPLC to ensure the production of a full length product. Mycorrhizal root tips were allowed to develop for two weeks at which point at least three mycorrhizae were harvested from each root and fixed in 4% paraformaldehyde solution and treated as described below to analyze the development of the Hartig net.

Microscopy

As MiSSP7 expression during the mycorrhization process is essential for the formation of the Hartig net, we used a microscopic method to analyze the development of the Hartig net as described by Plett et al. (9). Briefly, mycorrhizal root samples were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 hours at 4°C and then embedded in 6% agarose. 25-30 μm thick sections of the mycorrhizal roots were taken using a Leica 1200 series vibratome. Attention was paid to always take sections in the middle of the colonized root (approximately 2 mm from the root apex) to ensure the ability to compare the development of the Hartig net between samples. The development of the Hartig net is defined here as the depth of penetration within the apoplastic space between the rhizodermal cells of the root (*SI Appendix*, Fig. S6). The depth of penetration was determined using ImageJ analysis of our microscopic images. The data presented in this paper for the development of the Hartig net is the average of at least three biological replicates.

Stable Expression of PtJAZ6 in Populus Roots

To test if transgenically altering the transcription of *PtJAZ6* (either by overexpressing the gene under the control of a 35S:: promoter or by reducing the level of transcripts using RNAi knockdown) could complement the loss of MiSSP7 in *L. bicolor missp7* RNAi mutants during mycorrhization, we used *A. rhizogenes* strain 15834 to generate transformed roots of *Populus tremula x P. alba* 717-1B4 using a technique similar to that described in Chabaud et al. (10). The strain of *A. rhizogenes* was chosen based on its relatively high transformation rate (approximately 50%) and the ability to produce roots with a normal architecture. Briefly, the coding sequence of *PtJAZ6* was cloned into the vector pH2GW7 for overexpression using the primer set: GGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGGCGAATATGGCACAG (forward primer) and GGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCAATTTAAGCTCGAGC (reverse primer) and into the vector pH7GWIWG2(II) for RNAi knockdown using the primer set GGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGAAGACAGGGTTACAGCAAGAGC(forward primer) and GGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCTGGGAGGCCTAGGATGATCC (reverse primer). These vectors were transformed into *A. rhizogenes* strain 15834 and selected for on LB media supplemented with 75 µg/mL spectinomycin. To generate transgenic roots, 1 cm shoot cuttings of *P. tremula x P. alba* 717-1B4 were taken from 1.5 month old plants and a sterile syringe tip coated in transgenic *A. rhizogenes* was used to puncture the stem of the cutting several times. These cuttings were placed in MS agar media and left to root at 22°C for 3 weeks. *In vitro* mycorrhization experiments were carried out as above. As the transformation process never yields 100% transformed roots, we also took samples of each root tested after the mycorrhization tests were completed and extracted the RNA (using the QIAgen RNeasy Plant extraction Kit) and DNA (using the QIAgen DNeasy Plant extracion kit) to ensure the integration of the T-DNA (*SI Appendix*, Fig S7 A,C) as well as the altered expression of *PtJAZ6* (*SI Appendix*, Fig S7 B,D), respectively. Within this paper, each transformed root is considered as an independent transformation event, and the development of the Hartig net between the three mycorrhizal root tips was used to calculate the standard deviation within each independently transformed root.

Transient Expression of PtJAZ6 in N. benthamiana

Agrobacterium tumefaciens strain GV3010 was transformed with a pMDC plasmid containing the full cDNA sequence for *PtJAZ6* in phase with a GFP tag. These cells were grown overnight at 28°C in 5 mL of YEB medium supplemented with Rifampicine (100µg/ml), Gentamycine (10µg/ml) and Kanamycine (50µg/ml). After overnight growth, *Agrobacterium* cultures were pelleted by spinning at 4,000 rpm for 15 minutes and resuspended in an equal volume of infiltration buffer (10mM MgCl₂, 10mM MES, pH5.6, 200µm Acetosyringone). Bacteria were left in the infiltration buffer for at least 2h at 28°C with gentle shaking. After this incubation the OD₆₀₀ of the solution was adjusted to between 0.1-0.2 and young *N. benthamiana* leaves were infiltrated with a syringe. Between three and seven biological repetitions were performed. Agroinfiltrated plants were incubated 24 to 48h at room temperature until GFP signal was seen in the leaves. At this stage the leaves were then infiltrated with either 10⁻⁸M MeJA, 3.4 µM MiSSP7 or a combination of the two and left for a further 24 hours. Small fragments (0.5-1cm²) of leaves were excised from the infiltrated area and mounted on slides with water or 60% glycerol and analyzed with confocal microscope using the same exposure time and laser settings.

Pseudomonas syringae DC3000 Infiltration

We grew *Nicotiana benthamiana* from seed for 6 weeks under long day conditions (16 hr light/8 hr dark) at 24°Celsius. Plants were always used before they reached flowering age. *P. syringae* DC3000 was always propagated freshly on KB plates three days before each test and grown at 28°C. The night before each test one colony was seeded in 5 mL of liquid King buffer and grown with constant agitation for 12 hours at 28°C. The morning of the test, 1 mL of overnight *P. syringae* DC3000 culture was spun down and washed 2 times in 10 mM MgCl₂. This solution was diluted in 10 mM MgCl₂ to a concentration of 10⁴ cfu/mL.

To test the effect of MiSSP7 and different chemical agents that affect jasmonic acid (JA) signaling on the growth of *P. syringae* DC3000, we infiltrated leaves of *N. benthamiana* with 10 mM MgCl₂ (as a control) or 10 mM MgCl₂ supplemented with either 15 μM MiSSP7, MiSSP7Ka (a mutant version of MiSSP7 that cannot enter plant cells), *L. bicolor* Hydrophobin (JGI protein # 399293) (another *L. bicolor* small secreted protein with no known effect on defense induction), 10⁻⁸ M methyl jasmonate (MeJA; to stimulate JA signaling) or 1 mM SHAM or aspirin (inhibitors of JA biosynthesis). The concentration of MeJA used has been shown to induce JA signaling responses and the biosynthetic inhibitors of JA were chosen based on concentrations that were sufficient to block JA signaling in both tomato and poplar (5-8). One plant was used per treatment type to avoid confounding our results by the induction of systemic induced resistance by treating one plant with several compounds and each leaf was fully infiltrated with the selected chemical. One hour was allowed to pass after the infiltration of the chemical before being infiltrated with the bacterial solution to allow the chemicals to induce an effect in the plant cells. As with the chemicals, each leaf was fully infiltrated with the bacterial suspension. Plants were left under original growth conditions for three days after which 1 cm² sections of infected leaves beside the original infiltration zones were cut, ground in 10 mM MgCl₂ and then plated in serial dilution on KB agar plates using a spiral plating system (Spiral System; Interscience). Colonies were counted as instructed by the manufacturer of the SPIRAL after 36 hours of growth. For each data point reported in Fig. 3, three separate biological replicates were performed three separate times for a total of nine biological replicates. For each biological replicate, two technical replicates were plated and counted. Growth in bacterial cfu after 3 days was similar to levels in *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 growth as reported in (11).

In order to determine if MiSSP7 could block the induction of JA signaling by MeJA, we used the same experimental set-up as described above, but added in an additional infiltration step with the second chemical with 1 hour in between each infiltration step. Therefore, leaves were infiltrated with water/water (as a control), MeJA/water, MeJA/MeJA, or MeJA/MiSSP7. Again, to ensure that the effect of MiSSP7 was due to its entry into the plant cell, we included the control of MeJA/MiSSP7Ka.

Statistical Analysis

At least three independent biological replicates were performed for each test outlined in this paper, unless otherwise noted, to ensure reproducibility and significance of data reported. A Student's two-tailed independent *t*-test calculated using Excel was used to determine the significance of the results obtained ($p < 0.05$) unless otherwise noted.

Supplementary References:

1. Plett JM, Montanini B, Kohler A, Ottonello S, Martin F. (2011) Tapping genomics to unravel ectomycorrhizal symbiosis. *Methods Mol Biol* 722:249-281.
2. Walhout AJM, Vidal M (2001) High-throughput yeast two-hybrid assays for large-scale protein interaction mapping. *Methods* 24:297-306.
3. Edwards AN, et al. (2009) An *in vivo* imaging-based assay for detecting protein interactions over a wide range of binding affinities. *Analyt Biochem* 395:166-177.
4. Felten J, et al. (2009) The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates lateral root formation in poplar and *Arabidopsis* through auxin transport and signaling. *Plant Physiol* 151:1991-2005.
5. Peña-Cortés H, Albrecht T, Prat S, Weiler EW, Willmitzer L (1993) Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta* 191:123-128.
6. Arimura G, Huber DP, Bohlmann J. (2004) Forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*) induce local and systemic diurnal emissions of terpenoid volatiles in hybrid poplar (*Populus trichocarpa* x *deltoides*): cDNA cloning, functional characterization, and patterns of gene expression of (-)-germacrene D synthase, PtdTPS1. *Plant J*. 37:603-616.
7. Sita GL, Bhattacharya A, Vidya CSS (2000) Cloning of defense related genes against pathogens in forest trees. *Forest. Sci.* 66:467-483.
8. Wasternack C (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* 100:681-697.
9. Plett JM, et al. (2012) Phylogenetic, genomic organization and expression analysis of hydrophobin genes in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Fungal Genet Biol* 49:199-209.
10. Chabaud M, et al. (2003) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation. In *The Medicago truncatula handbook*, U. Mathesius, E.P. Journet, L.W. Sumner eds.
11. Pastar I et al. (2013) Interactions of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in polymicrobial wound infection. *PloS One* 8:e56846.
12. Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *CABIOS* 8: 275-282.
13. Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985:783-791.
14. Tamura K et al. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol Evol.* 28: 2731-2739.

**Chapitre III : Caractérisation fonctionnelle d'effecteur
symbiotique putatif du champignon ectomycorhizien
*Laccaria bicolor***

Chapitre III : Caractérisation fonctionnelle d'effecteur symbiotique putatif du champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor*

Au cours d'une interaction plante-pathogène, le microorganisme sécrète généralement une batterie d'effecteurs destinés à promouvoir la colonisation de la plante hôte à plusieurs niveaux. Ils peuvent faciliter l'entrée dans les tissus et / ou les cellules de la plante hôte, favoriser l'acquisition de nutriments provenant de l'hôte, ou contourner le système immunitaire de la plante hôte. L'objectif à terme est de coloniser de manière extensive la plante hôte voire d'entraîner sa mort (Martin et Kamoun, 2012). Les interactions mycorhiziennes améliorent généralement la nutrition, la croissance et la résistance au stress de la plante hôte. Elles se caractérisent par l'absence de symptômes et de réactions de défense sur le long terme ainsi que par des échanges mutualistes abondants entre les deux partenaires (Smith et Read, 2008). Bien qu'ils s'agissent d'interactions très différentes, de récentes études ont montré qu'à l'instar des agents pathogènes, les champignons mycorhiziens sécrètent des effecteurs capables de supprimer les réactions de défense de la plante hôte, une condition essentielle à leur mode de vie (Kloppholz *et al.*, 2011 ; Plett *et al.*, 2011). Les protéines SP7 et MiSSP7, respectivement sécrétées par *R. irregularis* et *L. bicolor*, sont capables de pénétrer à l'intérieur des cellules végétales et d'aller dans le noyau. SP7 interagit avec ERF19, un facteur de transcription de la plante lié à la pathogénèse, et empêche l'expression des gènes de défense qu'il contrôle (Kloppholz *et al.*, 2011). Dans le chapitre précédent, nous avons montré que MiSSP7 perturbe la voie de signalisation dépendante de l'AJ en interagissant avec deux récepteurs de l'acide jasmonique, PtJAZ6 et PtJAZ5, ce qui empêche la mise en place de réactions de défense (Plett, Daguerre *et al.*, soumis). Des analyses transcriptomiques ont révélé la présence de plusieurs autres MiSSPs de fonction inconnue dans le génome du champignon ectomycorhizien *L. bicolor* (Martin *et al.*, 2008). Au cours de ma thèse, j'ai initié l'analyse fonctionnelle de trois MiSSPs : MiSSP8, MiSSP17 et MiSSP22. Pour cela, j'ai utilisé des techniques variées et complémentaires telles que i) le Signal Sequence Trap (Plett *et al.*, 2011), ii) l'expression transitoire de protéines fusionnées au gène rapporteur GFP en système hétérologue chez le tabac (Curtis and Grossniklaus, 2003), iii) la production et l'analyse de lignées transgéniques de *L. bicolor*, générées par « ARN interférent » (Kempainen *et al.*, 2010), iv) le système double-hybride en levure (Plett *et al.*, 2011).

L'objectif premier de ce projet était de démontrer si oui ou non ces MiSSPs sont essentielles au développement symbiotique et d'identifier le compartiment ainsi que les protéines cibles de ces MiSSPs chez la plante hôte. Nous avons confirmé la sécrétion de MiSSP8 et MiSSP17 par *L. bicolor* via un adressage au réticulum endoplasmique mais pas celle de MiSSP22. Nous avons montré que MiSSP8 et MiSSP17 sont essentielles au développement symbiotique tandis que MiSSP22 ne l'est pas. Les expériences de localisation subcellulaire vont dans le sens d'une localisation dans la paroi et à la membrane plasmique pour MiSSP8 et d'une colocalisation avec le réticulum endoplasmique pour MiSSP17. Dans les deux cas, nous avons identifié plusieurs protéines cibles chez le peuplier qui laissent supposer un rôle dans le contournement des réactions de défense mises en place par la plante hôte.

Les résultats obtenus au cours de cette analyse ont été rassemblés et discutés dans le manuscrit en préparation intitulé « **New effectors secreted by *Laccaria bicolor* are required for symbiosis development** ».

Title: New effectors secreted by *Laccaria bicolor* are required for symbiosis development.

Authors: Yohann Daguerre^{1,2}, Annick Brun^{1,2}, Minna Kempainen³, Alejandro Pardo³ and Francis Martin^{1,2} and Claire Veneault-Fourrey^{1,2}.

Affiliations:

¹ INRA, UMR 1136, Interactions Arbres/Microorganismes (IAM), Centre INRA de Nancy, Champenoux, France

² Université de Lorraine, UMR 1136, Interactions Arbres/Microorganismes (IAM), Faculté des Sciences, Vandoeuvre les Nancy, France

³ Laboratorio de Micología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes and CONICET, Roque Saenz Pena 352, B1876 Bernal, Provincia de Buenos Aires, Argentina

Abstract

Roots of the most ecologically and economically important forest trees form mutualistic interaction with ECM fungi contributing to forest fitness and productivity.. Although ontogeny of ectomycorrhiza is well studied, molecular mechanisms mediating symbiosis development and functioning are widely unknown. Recently, effectors similar to the one's found in phytopathogenic microbes were characterized in the mutualistic fungi *Laccaria bicolor* and *Glomus intraradices*. Like pathogenic organisms, ECM fungi (e.g. *Laccaria bicolor*) also produce effector proteins called MiSSPs (Mycorrhizal induced Small Secreted Proteins). Here, we show that two others effector-like protein from *L bicolor*, MiSSP8 and MiSSP17 are secreted and essential for symbiosis development. Our results indicate that MiSSP8 is a cell-wall associated and plasma membrane protein whereas MiSSP17 localizes within endoplasmic reticulum vesicles. Further, we show that these symbiosis effectors are evolving under purifying selection pressure, contrasting with the effector genes from plant pathogenic microbes. Our findings indicate that small-secreted proteins are a common way of communication between plants and their associated microbes, whatever their ways of life are (from mutualistic to pathogenic

Introduction:

Roots of the most ecologically and economically important forest trees (Pinaceae, Fagaceae, Nothofagaceae, Betulaceae, Myrtaceae, Dipterocarpaceae and Fabaceae) are able to interact with mutualistic fungi (Harley and Harley, 1987; Wilcox, 1991; Smith and Read, 2008, Wang and Qiu. 2006..). As these plant lineages dominate boreal, cool temperate, Mediterranean and some tropical forests, associated ectomycorrhizal (ECM) fungi are important actors for forest ecosystem functioning. During its lifetime over several hundred years, root's tree will host a succession of different communities of ECM fungi as well as shelter several ECM fungal species at the same time. This mutualistic interaction relies on fair-trade exchange of nutrients. Indeed, the hyphal networks assimilate organic nitrogen and phosphorous trapped in organic polymers from the soils and supplies the plant root cells with their nitrogen and phosphorous needs (Chalot and Plassard 2011). In return, the plant cells provide carbon derived from their photosynthesis activity, up to 20% of photosynthesis products (Leake *et al.* 2001, Nehls *et al.* 2010). This intimate mutualistic plant-fungal interaction is thus crucial for seedling establishment, tree productivity and sustainable forest management.

Consequently, deciphering how plants interact with their mutualistic partners is essential for a comprehensive understanding of plant biology. In this context, we are addressing the question of how ECM mutualistic interactions can be established in such a long-term manner? Which mechanisms allow *Laccaria bicolor* to be not recognized as intruders by a wide range of trees?

Ontogeny of ectomycorrhizae and the associated mechanisms are well known (Smith and Reads, 2008). However molecular dialogue governing recognition and interaction between the two partners is still poorly documented. During early stages of the interaction, plants and fungi communicate without physical contact by diffusible molecules (Horan and Chilvers, 1990; Burgess *et al.*, 1996; Felten *et al.*, 2009). Root exudates contain compounds like rutin flavonol and cytokinin zeatin modifying fungal growth (Gogala, 1991 Lagrange et al, 2001. Martin et al, 2001.). Mushrooms are also able to secrete phytohormones such as auxin, ethylene or jasmonic acid involved in root and symbiotic development (Ho, 1987; Karabaghli-Degron et al, 1998. Rincon et al, 2001. Rincon *et al.* , 2003, Reddy et al, 2006; Graham and Linderman, 1980, Rupp et al, 1989. Splivallo et al, 2009;. Felten *et al.*, 2009; Miersch et al, 1999). Nevertheless, little is known on what is occurring when plant and fungus are in contact.

Plant pathogenic microbes use a wide range of small secreted proteins called effectors either acting in the apoplast or entering plant cells to alter metabolism and immunity in order to enhance microbe growth and survival within plant tissues (Rafiqi *et al.*, 2012; Win *et al.*, 2012; Bozkurt *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2012). Genome sequencing and transcriptomic analysis on the ectomycorrhizal fungus *L. bicolor* (Martin *et al.*, 2008) and the endomycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (Tisserand *et al.*, 2012) revealed a large number of small secreted proteins specifically induced in mycorrhizae. Recent studies demonstrate that such proteins are indeed essential for symbiotic development and have similar role to the one's found for phytopathogenic microbes effectors (Rafiqi *et al.* 2012, Zamioudis and Pieterse, 2012). SP7 from the endosymbiont *G. intraradices* enters the plant cell and localizes to the plant nucleus where it interacts with Ethylene Response Factor19 (ERF19) to repress plant defence signaling (Kloppholz *et al.* 2011). When SP7 is expressed in the hemibiotrophic fungus *Magnaporthe oryzae*, the length of the biotrophic phase is prolonged and hypersensitive response is suppressed. MiSSP7 of the ectosymbiont *L. bicolor* is a 7kDa protein required for fungal colonization and ECM formation (Plett *et al.*, 2011). MiSSP7 enters the plant cell and localizes within nuclei of plant root cells. Recent findings indicate that MiSSP7 interacts with the jasmonic acid signalling pathway through its direct action on the jasmonate receptor protein JAZ (jasmonate zim domain) (Plett *et al.* unpublished).

In the ectosymbiont *L. bicolor* genome, a dozen of other small secreted proteins are up-regulated during symbiosis (Martin *et al.* 2008). In this study we are focusing on functional analysis of three of these Mycorrhiza induced Small Secreted Proteins (MiSSP) to assess (i) whether they are required for symbiosis and (ii) what are the plant partners in order to better understand their role within symbiosis (divert plant immune system or dealing with plant metabolism to establish fair-trade nutrient exchanges). We showed that two of them were effectively secreted using signal trap system in yeast and that these two are required for symbiosis establishment. *In planta* localisation reveals distinct pattern and yeast-two hybrid system brings to light plant partners.

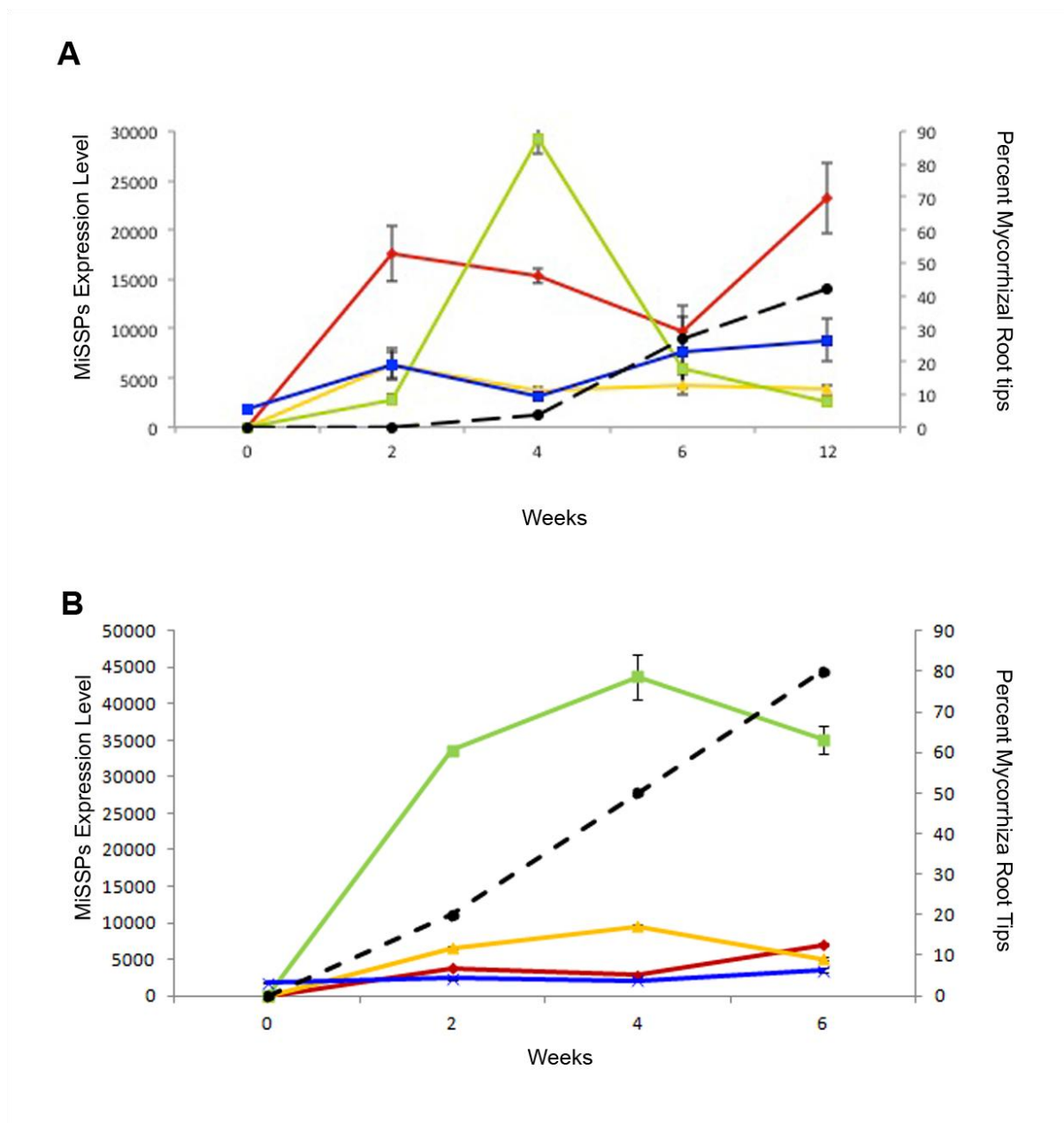


Figure 1: Quantification of MiSSPs throughout symbiosis development.

Expression level of MiSSP7 (red line), MiSSP8 (yellow line), MiSSP17 (green line) and MiSSP22 (blue line) genes was quantified during ECM development between *L. bicolor* and either *Populus trichocarpa* (A) or *Pseudotsuga menziesii* (B). Data were extracted from microarrays manufactured by Roche NimbleGen Systems Limited (Madison, WI). All values are shown as mean standard deviation; n = 3. The percentage of mycorrhized root tips throughout the time course is indicated with the dashed line. (mean +/- SD, n = 200).

Results:

Gene regulation of three putative symbiosis effectors during a time-course of ECM development.

Among the *L. bicolor* small-secreted protein encoding genes which expression are highly induced and/or specific to mature ECM root tips (Martin *et al.*, 2008), we chose three MiSSPS to functionally analyzed according to their expression profiles or their sequence characteristics. MiSSP8 is the most highly regulated symbiosis specific-MiSSP after MiSSP7, the first proven symbiosis effector in *L. bicolor* (Plett *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2008). MiSSP17 protein displayed a CFEM domain, a fungal specific cysteine rich domain likely involved in fungal pathogenesis (Xue *et al.*, 2002; Grell *et al.*, 2003; Kulkarni *et al.*, 2003; Joly *et al.*, 2010). MiSSP22 was chosen as it was expressed in all tissues (from free living mycelium to fruiting bodies) but its expression is induced in ECM root tips and fruiting bodies.

To determine at which plant infection steps these MiSSPs are expressed, we performed transcriptomic analysis throughout a 12-weeks time course of mycorrhization of the Angiosperm *Populus trichocarpa* roots and a 6-weeks time course on the conifer Douglas fir *Pseudotsuga menziesii* (Fig.1).

MiSSP7 transcripts were not detected in free-living mycelium but were detected during all stages of colonization. However, its expression level was three-times higher during *P. trichocarpa* colonization than Douglas's one, after 12 weeks (23244 versus 7008, respectively). In contrast, *MiSSP17* gene is highly regulated during Douglas fir colonization (expression level up to 43699 after 4 weeks). *MiSSP17* expression level is maintained at high level (>30000) during Douglas fir colonization, whereas during *P. trichocarpa* colonization its expression is high (29288) at only one time-point (4 weeks after contact). These two proteins may somehow relate to host specificity.

MiSSP8 and *MiSPP22* transcripts were detected at high level (> 2000) during all stages of colonization whatever the colonized host, suggesting that these two proteins are required throughout the mycorrhizal development. MiSSP8 expression level is higher during Douglas fir colonization compared to *P. trichocarpa* colonization (mean of 7058 in Douglas versus mean of 4522 in *Populus*), whereas it is the opposite for MiSSP22 expression level (mean of 2642 in Douglas versus mean of 6491 in *Populus*).

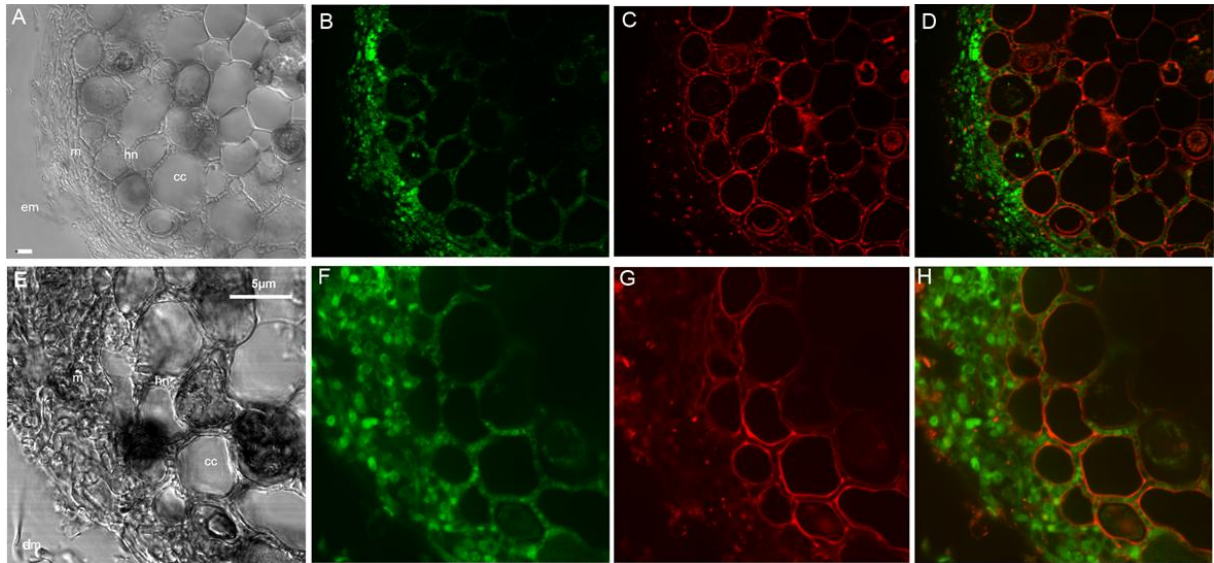


Figure 2: *L. bicolor* MiSSP8 and MiSSP17 proteins are expressed in the mantle and the Hartig net of *Populus trichocarpa/L.bicolor* ectomycorrhizal root tips.

(A-D) Laser-scanning confocal microscopy image of a transverse section of 12 weeks-old *L. bicolor-P. trichocarpa* ectomycorrhiza root tips. Indirect immunolocalization of *L. bicolor* MiSSP8 (B) and MiSSP17 (E) proteins. Plant root cells are counterstained with propidium iodide (C-F). (D-H) Photoshop-merged images. m = mantle, hn = Hartig net, em = extramatricial mycelium, cc = cortical cell. (A,B,C,D) Scale bar, 10 μ m. (E,F,G,H) Scale bar, 5 μ m

These results showed firstly that the three analyzed MiSSPs are expressed at different phases of the colonization process and secondly that gene expression polymorphism is occurring when *L. bicolor* colonized two different host plants.

MiSSP8 and MiSSP17 are secreted proteins, produced in mantle and Hartig net fungal cells.

To investigate whether the effector candidates are effectively secreted, we used both the signal trap system in yeast and immunolocalisation on mature ECM root tips using specific anti-bodies against these proteins. Fusion of a functional signal peptide to SUC2 invertase enables the secretion of the invertase and thus allowed the growth of a Δ *Suc2* yeast strain on medium containing sucrose as the sole carbon source. As negative control, we used Δ *Suc2* yeast strain transformed with an empty-vector and as a positive control, Δ *Suc2* yeast strain transformed with MiSSP7 complete gene (containing the signal peptide) already characterized as a fungal secreted protein. Secretion of MiSSP7, MiSSP8 and MiSSP17 were confirmed while secretion of MiSSP22 was not (Fig. 2).

Immunolocalisation using specific anti-bodies against MiSSP8 or MiSSP17 on mature ECM root tips of *P.trichocarpa* showed that both MiSSP8, MiSSP17 are produced in fungal cells forming the mantle and the Hartig net. This localization is consistent with an assumed secretion during fungal colonization of plant cells. However, no protein was detected inside the plant cells using this method (Fig. 2). These experiments showed that no direct secretion of fungal proteins could be detected using immunolocalisation technique in our model.

MiSSP8 and MiSSP17 are essential for ECM development, whereas MiSSP22 is not.

In order to test whether MiSSP8, MiSSP17 and MiSSP22 were essential for mycorrhization, at least 10 independent silenced lines of *Laccaria bicolor* were generated for each gene (Figure S1 for molecular analysis). We used silencing through RNAi as homologous gene replacement does not occur in the basidiomycete *L. bicolor* (Kemppainen *et al.*, 2009). The ability of five independent transgenic lines to form ectomycorrhiza was tested *in vitro* on 717-1B4 poplars. Wild-type strain S238N, strains carrying empty vector e(ev7 and ev9) were able to colonize poplar root tips and to form ECM with nearly 40-45% of the root tips, whereas this percentage dropped to 3-12% with the mispp8 or mispp17 silenced strains (Fig. 3A). Efficiency of RNA silencing were checked on the few ectomycorrhizal tips formed with the respective mutants using , real time reverse transcription-PCR analysis (Fig. 3B).

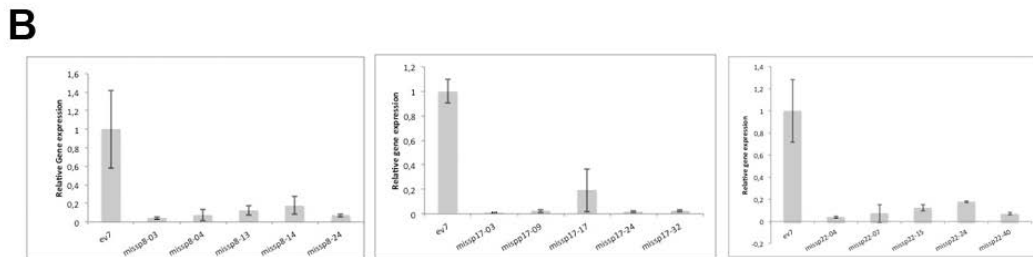
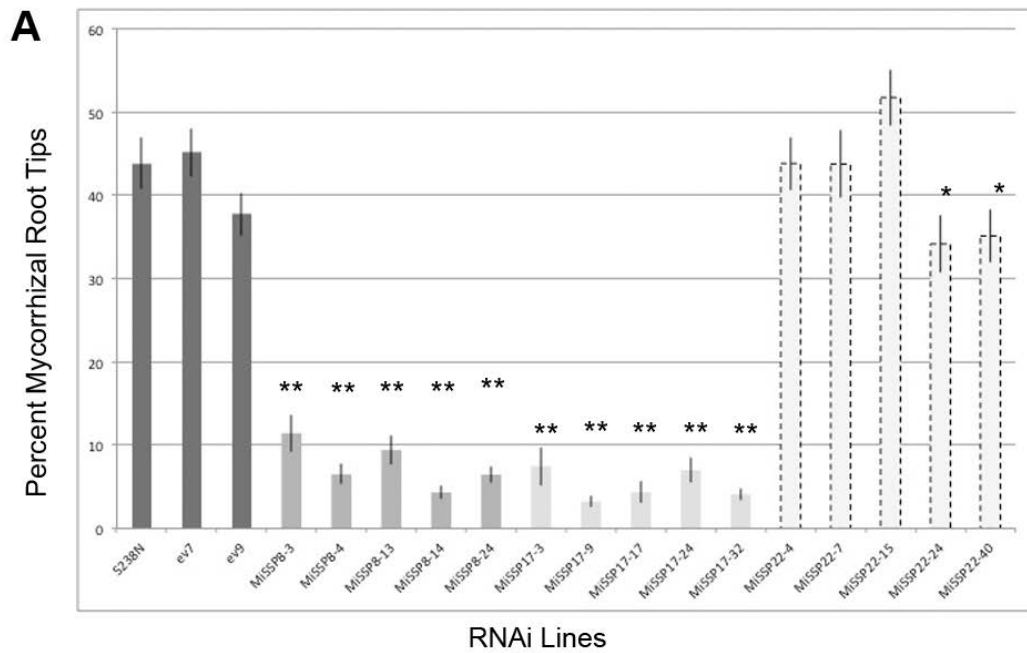


Figure 3. Ability of *missp* RNAi lines to form ectomycorrhizal root tips.

A. Percentage of mycorrhizal root tips formed by wild-type *L. bicolor* S238N and two empty vector transformation controls (ev7 and 9) versus five independent *L. bicolor* *missp8*, *missp17* and *missp22* RNAi lines. All values are shown as mean \pm standard deviation; n 25; * indicates significant difference from wild-type, ev7 and ev9.

B. Reduced *MiSSPs* transcript levels in *L. bicolor* silenced lines in contact with roots of *P. trichocarpa* as measured by quantitative RT-PCR. All values are shown as mean \pm standard deviation; n = 3; ev indicates fungal strains transformed with an empty vector.

All tested mutants display a strong decrease of expression of their respective target gene: from a decrease of 80% for MiSSP17 in *missp17-17* to 99% for *missp17-03* (Fig. 3B). Interestingly, the few ectomycorrhiza formed with *missp17* silenced lines showed a similar morphology to the control ones (wild-type S238N and empty-vector strains), while ectomycorrhiza formed with the *missp8* silenced lines displayed atypical morphologies where root tips were thinner and less puffy (data not shown). Therefore, MiSSP8 and MiSSP17 are essential for the ectomycorrhizal development.

Whereas *missp8* and *missp17* silenced lines are impaired in mycorrhization capacity, the *missp22* silenced lines is not impaired, except the *missp22-24* and *missp22-40* silenced lines where we observed a 5% decrease of mycorrhization. However, no correlation between the degree of silencing and the phenotype was observed. We therefore conclude that MiSSP22 is not essential for mycorrhizal development.

Functional validation of the signal peptides of the MiSSP-encoding proteins.

To functionally validate the signal peptide predictions of the selected MiSSP-encoding genes, we used a genetic assay based on the requirement of yeast cells for invertase secretion to grow on sucrose or raffinose media (Klein *et al.*, 1996; Jacobs *et al.*, 1997). The cDNA of four MiSSPs were fused in frame to the mature sequence of yeast invertase in the vector pSUC2-GW (Plett *et al.*, 2011). As negative controls, we tested MiSSP7 without its signal-peptide. Signal peptides of MiSSP7 and SUC2 were both used as positive controls. Both were able to grow on SD-W (yeast growth without invertase secretion) (Fig. 4A) and YPSA medium (growth only when invertase is secreted) (Fig. 4B). By contrast, the negative control yeast strains and the yeast strain transform with the signal peptide of MiSSP22 did not grow on YPSA. These results indicate that the signal peptide of MiSSP8, MiSSP17 are functional in yeast, whereas the one of MiSSP22 is not.

***In planta* localization using transient expression within *Nicotiana benthamiana* leaves reveals different localization of these fungal proteins.**

To investigate the sub-cellular localization of the proven secreted MiSSP8 and MiSSP17 proteins, GFP (Green-fluorescent proteins)-tagged MiSSP were transiently expressed in *Nicotinia benthamiana* using *Agrobacterium*-mediated gene delivery.

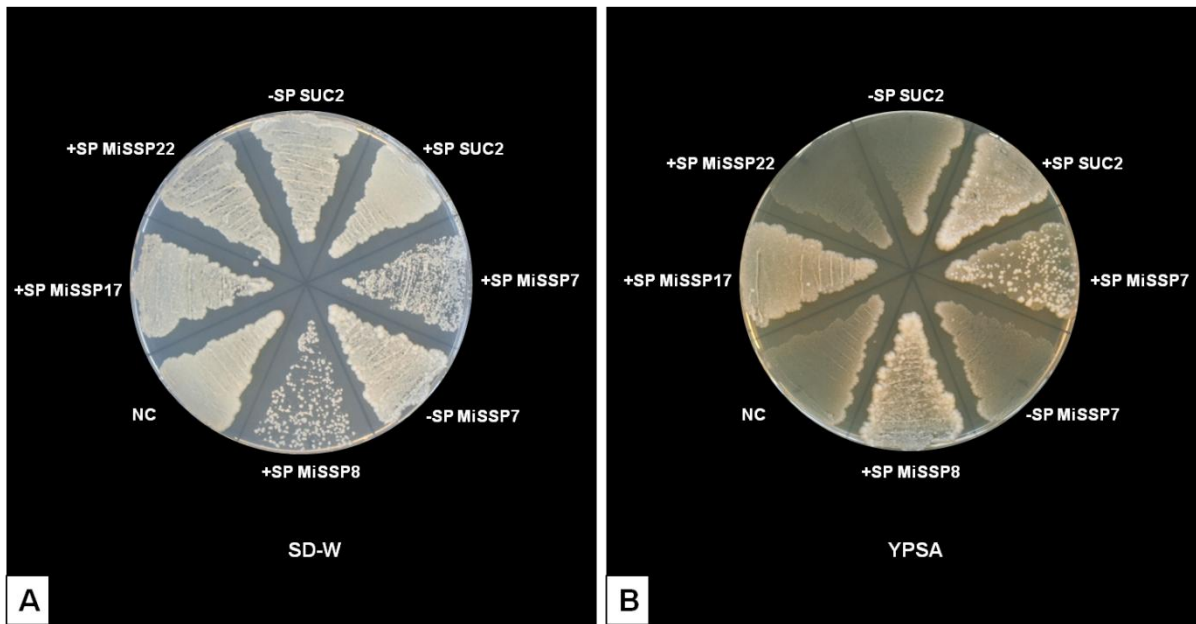


Figure 4. Functional validation of the signal peptides of MiSSP8 and MiSSP17 using the yeast invertase secretion test

The cDNA encoding MiSSP proteins with their native signal peptides were fused in frame to the invertase gene in the pSUC2-GW vector. Constructions were used to transform the yeast YTK12 strain. Strains unable to secrete invertase can grow on SD-W medium (**A**) but not on YPSA medium containing sucrose (**B**). Controls include YTK12 transformed with constructions expressing SUC2 with and without signal peptide as well as N-terminal fusion of SUC2 with MiSSP7, with and without signal peptides.

Three types of fusion proteins were expressed: (i) mature protein (lacking signal-peptide):GFP (ii) native (containing signal-peptide) protein:GFP and (iii) GFP:mature protein. Both N-terminus and C-terminus GFP fusion with the mature form of either MiSSP8 or MiSSP17 protein displayed a nucleo-cytoplasmic localization as the negative control GFP (data not shown). However, the GFP-tagged native proteins (i.e. the form of protein containing their native signal-peptide) display drastically different localization. The MiSSP8::GFP fusion protein accumulated at the cell periphery (Fig. 5B). After plasmolysis, the fluorescence signal remained associated with the plasma membrane, as confirmed with the overlap of MiSSP8::GFP signal and the red fluorescence of a coexpressed plasma membrane-localized mCherry (Nelson *et al.*, 2007)(Fig. 5B). In addition, a weak MiSSP8::GFP signal remained associated with plant cell walls (Fig.5B.). In addition, a poplar root uptake assay employing synthetic peptide of MiSSP8 fused to FAM revealed that the peptide accumulated within the apoplastic space and did not enter root cells. (Fig. 5A). The MiSSP17::GFP fusion was confined to vesicle-like structures. We co-expressed MiSSP17::GFP with mCherry tagged reticulum-endoplasmic (Nelson *et al.*, 2007). Both proteins co-localized (Fig. 5C). MiSSP17 localization could reflect its actual secretion by the plant cell machinery or its proper site of action when inside the plant cell. The expression and stability of the fusion proteins was verified by Western blot analysis for each candidate (data not shown).

MiSSP8, MiSSP17 and MiSSP22 interact with several fungal/plant partners

To identify poplar proteins interacting with either MiSSP8 or MiSSP17, a yeast-two hybrid screen was performed using a cDNA library generated with mRNA of ectomycorrhiza of *Populus / Laccaria bicolor*. The screening was performed using the mature (lacking signal peptide) of MiSSP8 or MiSSP17 fused to the GAL4 DNA binding domain. We first checked that these two fusion proteins were not able to activate on their own the three reporter genes used during the screen. The yeast Mav103 expressing BD::MiSSP8 or BD::MiSSP17 were unable to grow on medium without uracil, without histidine supplemented with 25mM of 3-AT and did not express b-galactosidase protein (Fig. 6). MiSSP8 and MiSSP17 are not transcriptional activators in yeast and may be used as baits for yeast-two hybrid screen. We identified and confirmed two MiSSP8 interactors and one MiSSP17 interactors (Fig. 6). MiSSP8 was able to interact with a CAP64-like protein from *Laccaria bicolor* and a universal stress protein family from *Populus trichocarpa*. MiSSP17 was able to interact with a protein showing similarities with a Phenylalanine Amonnia Lyase (PAL2) from *Populus trichocarpa*.

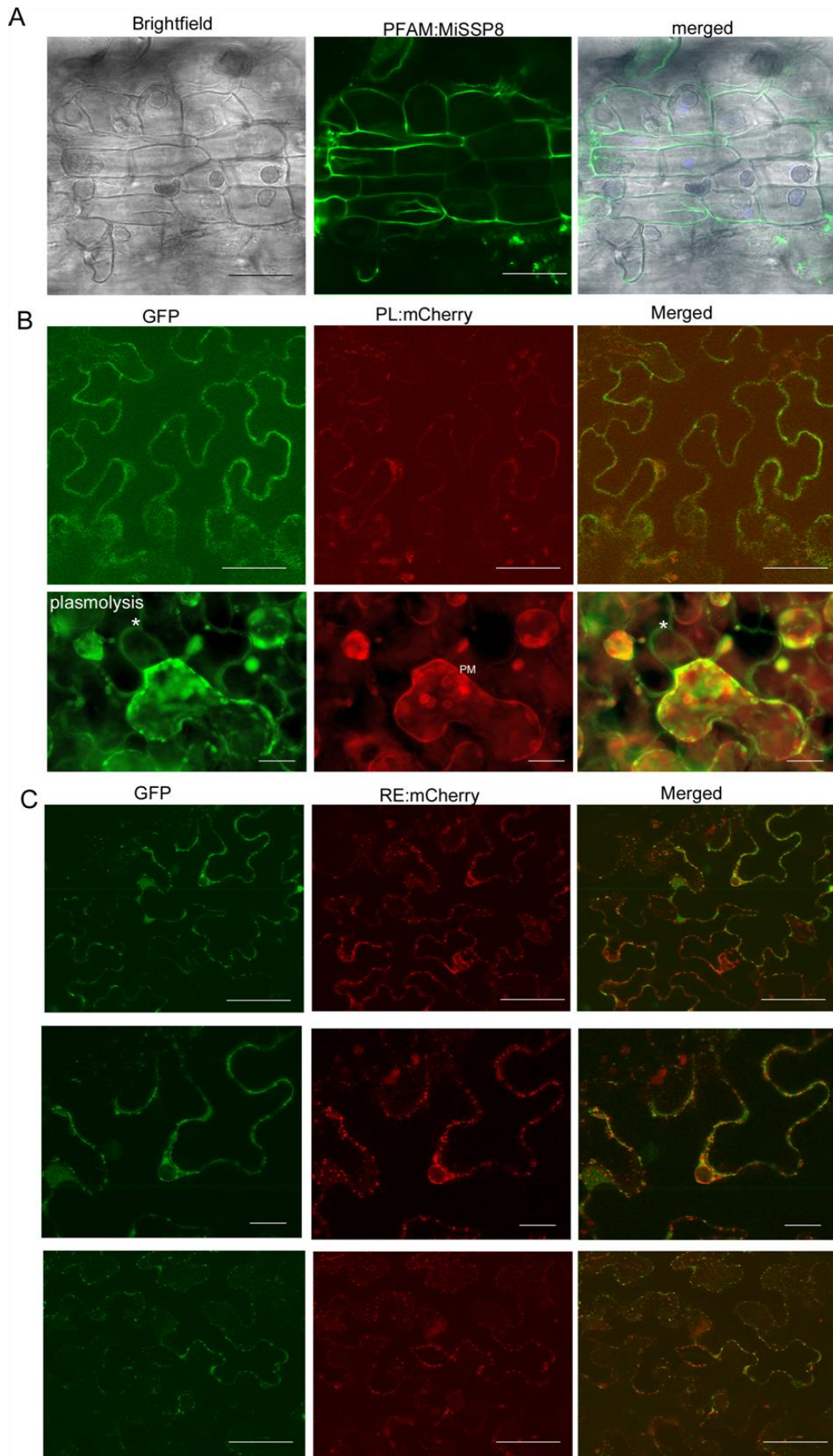


Figure 5. *In planta* localisation of GF-tagged MiSSP8 or MiSSP17 proteins (See legend on the next page).

MiSSP7, MiSSP8 and MiSSP17 are highly conserved proteins

To determine if the MiSSP7, MiSSP8 and MiSSP17 encoding genes are conserved symbiosis effectors, we searched for orthologous in the genomes of 13 different *L. bicolor* strains (Table 1). These strains differ from the reference strain S238N for their geographic localization or derived from the parental dikaryotic strain S238N after meiosis. In addition, we added *Laccaria amethystina* within the analysis to compare polymorphism within the *Laccaria* genus. The symbiosis effector MiSSP7, MiSSP8 and MiSSP17 encoding genes are present in *L. amethystina*, with respectively 82%, 77% and 88% identity. In contrast to the apparent conserved symbiosis genes within *Laccaria* genus, we found a presence/absence polymorphism within the different *L. bicolor* strains (Table S1).

The level of SNP among MiSSP7 orthologous genes is the highest one with a range between 5,80 to 17,87 (Table 2). However, the majority of the mutations correspond to synonymous ones. IN addition, most the polymorphic amino-acid were found within the signal-peptide. The RALG motif found to allow translocation into the plant root cell (Plett *et al.*, 2011) was highly conserved (Fig. 7A).

Multiple alignments of the predicted MiSSP8 amino acid sequences revealed a highly conserved protein with only 4 amino acids over 70 displaying polymorphism. (Fig. 7B), consistent with a very low level of SNP (Table 2) (number of SNP <1). Interestingly, MiSSP8 displayed a repeated motif on its C-terminus DWRR 4 times whereas the *L. amethystina* orthologous gene contained 6 times the motif..

The level of SNP among the MiSSP17 orthologous genes was intermediate (between 0,18 to 2,39 within *L. bicolor* strains) (Table 2). However, most of these mutations are silent as exemplified by the multiple alignments showing highly conserved proteins. The position of the eight cysteine typical of a CFEM domain were found in all MiSSP17-orthologus genes (Fig.7).

To determine the selection pressures underlying sequence diversification in the three symbiosis effector encoding genes, we calculated the ratios of non-synonymous to synonymous substitutions (dN/dS). We found that dS was greater than dN ($w=dN/dS<1$), reflecting a purifying selection called negative (Table 2).

Figure 5. *In planta* localisation of GF-tagged MiSSP8 or MiSSP17 proteins.

(A) Laser-scanning confocal microscopy of poplar roots in contact for 4 hours with FAM-tagged MiSSP8 peptide.

(B) Confocal laser scanning microscopy of *Nicotiana benthamiana* 48 h after *Agrobacterium*-mediated co-deliveray of T-DNAs encoding GFP-tagged native MiSSP8 with T-DNA encoding plasma membrane-mCherry. Plasmolysis of the transformed cells reveal that MiSSP8=GFP co-localize with plasma membrane (PM) as well as remain associated with plant cell wall (*). Bars = 20 μ m

(C) Confocal laser scanning microscopy of *Nicotiana benthamiana* 48 h after *Agrobacterium*-mediated co-deliveray of T-DNAs encoding GFP-tagged native MiSSP17:GFP with T-DNA encoding reticulum endoplasmic-mCherry. Bars = 20 μ m

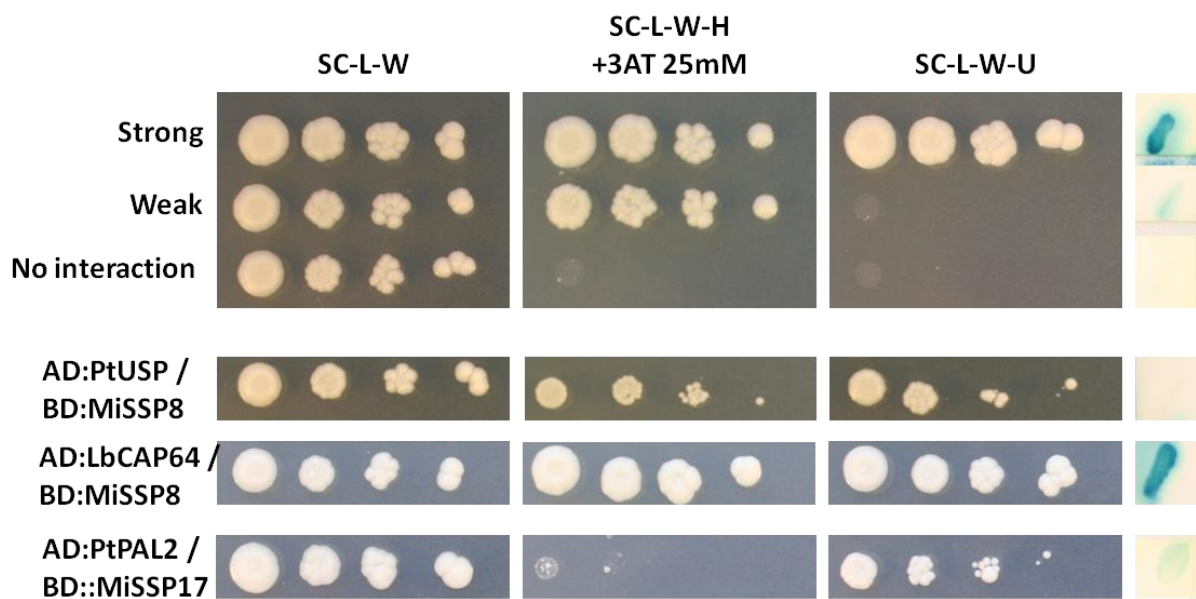


Figure 6. Search for MiSSP8 and MiSSP17-targets using yeast-two hybrid screen.

A yeast two-hybrid screen reveals that MiSSP8 interacts with a *Populus* Universal stress protein and with *Laccaria* CAP64 orthologue and that MiSSP17 interacts with a *Populus* phenyl ammonia lyase protein.

The full length cDNA of MiSSP8 or MiSSP17 were fused to the DNA binding domain of GAL4 (DB) and the cDNA from ectomycorrhiza were fused to the activation domain of GAL4 (AD). Numbers 1 to 3 represent standard controls: 1, strong interaction; 2, weak interaction and 3, no interaction. All yeasts grown on SC-L-W, indicating that they contain the two vectors. The strong interaction control yeast grown on SC-L-W-H + 25mM 3 amino-triazol, on SC-L-W-U and express beta-galactosidase as shown with the blue color of the yeast in presence of X-Gal, whereas the weak interaction control yeast grown only on SC-L-W-H + 3 AT and express a low level of beta-galactosidase.

Discussion:

In this study, we analysed three Mycorrhiza induced small secreted proteins (MiSSPs) of *L. bicolor*. We first show that these MiSSPs are expressed at different phases of the fungal colonization process and that their level of expression as well as their profile of expression is different when *L. bicolor* is colonizing two different host plants. Our results suggest that the arsenal of LbMiSSPs is different depending on the associated plant host, suggesting that *L. bicolor* is able to receive signals from the host and adapts its arsenal to initiate molecular dialogue and symbiosis establishment. Interestingly, effectors of plant pathogenic microbes are expressed and likely thus secreted at different phases of the infection cycle (O'Connell *et al.*, 2012; Kleeman *et al.*, 2012, Hacquard *et al.*, 2012; Haas *et al.*, 2009, Raffaele *et al.*, 2010; Cooke *et al.*, 2012). In addition, gene expression polymorphism is operating on these effector encoding genes from phytopathogenic fungi (Hacquard *et al.*, 2012).

The three MiSSPs genes are predicted to encode secreted proteins according to the signal peptide prediction software SignalP3.0. Our work also validates the secretion of MiSSP8 and MiSSP17 but not MiSSP22 using yeast cells. Interestingly, only the two MiSSPs containing a functional signal peptide are required for ectomycorrhiza formation. We then identify two new symbiosis effectors from *L. bicolor*: MiSSP8 and MiSSP17. The first symbiosis effectors MiSSP7 from *L. bicolor* and SP7 from *Glomus intraradices* were recently characterized (Plett *et al.*, 2011; Klopffholz *et al.*, 2011). Both MiSSP7 and SP7 did not share homologies with other proteins, as MiSSP8. However, MiSSP17 is fungal protein containing CFEM domain. This domain is fungal specific. CFEM proteins can have a role in fungal pathogenesis and biofilm formation as described in *M. oryzae* and *Candida albicans* respectively (Kulkarni *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2006; Klis *et al.*, 2009). In addition, in *Candida* species CFEM proteins localizing within fungal cell walls are required in the acquisition of iron from host proteins (Ding *et al.*, 2011; Sorgo *et al.*, 2013).

The next challenge is the identification of plant targets for MiSSP8 and MiSSP17. We first localize these two proteins *in planta*. Our results indicate that MiSSP8 is a cell-wall associated and plasma membrane protein whereas MiSSP17 localizes within endoplasmic reticulum vesicles. It is well-known that plant pathogenic microbes secrete effectors, which interfere with plant secretion (Nomura *et al.*, 2006; Bozhurt *et al.*, 2011; Schulze *et al.*, 2012).

A

```

                20          40          60
S238N      : MKLIVP↑INLLIAA-LAISPALSSVPE---GEVGLVERGPIENAVFRRVPEPNFFKDLLRALGQASQGGD*HR-- : 68
S238N-H53 : MKLIVP↑INLLIAA-LAISPALSSVPE---GEVGLVERGPIENAVFRRVPEPNFFKDLLRALGQASQGGD*HR-- : 68
S238N-H70 : MKLIVP↑INLLIAA-LAISPALSSVPE---GEVGLVERGPIENAVFRRVPEPNFFKDLLRALGQASQGGD*HR-- : 68
S238N-H82x : MKLIVP↑INLLIAA-LAISPALSSVPE---GEVGLVERGPIENAVFRRVPEPNFFKDLLRALGQASQGGD*HR-- : 68
81306      : MKLSVSNLLIAA-LAISPALSSVPE---GEVGLVERGPIENPLLRVPEPNFFKDLLRALGQASQGGD*HRRA : 70
CBS_594.89 : MKLSVSNLLIAA-LAISPALSSVPE---GEVGLVERGPIENPLLRVPEPNFFKDLLRALGQASQGGD*HRRA : 70
D101      : MKLSVSNLLIAA-LAISPALSSVPE---GEVGLVERGPIENAVFRRVPEPNFFKDLLRALGQASQGGD*HR-- : 69
DR170     : MKLSVSNLLIAA-LAISPALSSVPE---GEVGLVERGPIENAVFRRVPEPNFFKDLLRALGQASQGGD*HR-- : 68
Lacam     : MKLIVP↑INLLIAA-LAISPALSSVPE---GEVGLVERGPIENAVFRRVPEPNFFKDLLRALGQASQGGD*HRRA : 73
                MKL V INLLIAa LaiSPALSSP P      GEVGLVERGPIpN      frRvPEPNfFKDLLRALGQAsQgGD HR
                                     ↑
                                     RxLR-like motif

```

B

```

                20          40          60          80          100
S238N      : MYFHLFACATLM↑LITTAHASPTVINSLDSRKADINDVEARHA-----ADWRRSDWRRSDWRRSDWRRSDS----- : 70
S238N-H53 : MYFHLFACATLM↑LITTAHASPTVINSLDSRKADINDVEARHA-----ADWRRSDWRRSDWRRSDWRRSDS----- : 70
S238N-H70 : MYFHLFACATLM↑LITTAHASPTVINSLDSRKADINDVEARHA-----ADWRRSDWRRSDWRRSDWRRSDS----- : 70
H82xH70   : MYFHLFACATLM↑LITTAHASPTVINSLDSRKADINDVEARHA-----ADWRRSDWRRSDWRRSDWRRSDS----- : 70
81306     : MYFHLFACATLM↑LITTAHASPTVINSLDSRKADINDVEARHA-----ADWRRSDWRRSDWRRSDWRRSDS----- : 70
CBS_594.89 : MYFHLFACATLM↑LITTAHASPTVINSLDSRKADINDVEARHA-----ADWRRSDWRRSDWRRSDWRRSDS----- : 70
Cham3     : MYFHLFACATLM↑LITTAHASPTVINSLDSRKADINDVEARHA-----ADWRRSDWRRSDWRRSDWRRSDS----- : 70
DR170     : MYFHLFACATLM↑LITTAHASPTVINSLDSRKADINDVEARHA-----ADWRRSDWRRSDWRRSDWRRSENGEATIQ : 74
Lacam     : MYFHLFACATLM↑LITTAHASPTVINSLDSRNGDFNCDVEARHAFEGAGQRNQDWRRGTDWRRGTDWRRGTDWRRGTDWRRSD : 102
                MYFhTLFACATLM↑LITTAHASPTVINSLDSRkaDlN DVEARHA                                     aDWRRdsDWRRdsDWRRdsDWRRdsd
                                     ↑

```

C

```

                20          40          60          80          100
S238N      : MCAATTLISL↑LLSIGANAQSSKPAStSSAISATPSiTACILLACVE*SAATANGCAYTN*ASCI*CASa*QFQADAALCLt*QHCTAd*DLkNALALQt*QChSVs : 100
S238N-H53 : MCAATTLISL↑LLSIGANAQSSKPAStSSAISATPSiTACILLACVE*SAATANGCAYTN*ASCI*CASa*QFQADAALCLt*QHCTAd*DLkNALALQt*QChSVs : 100
81306     : MYAAATTLISL↑LLSIGANAQSSKPAStSSAISATPSiTACILLACVE*SAATANGCAYTN*ASCI*CASa*QFQADAALCLt*QHCTAd*DLkNALALQt*QChSVs : 100
CBS_594.89 : MYAAATTLISL↑LLSIGANAQSSKPAStSSAISATPSiTACILLACVE*SAATANGCAYTN*ASCI*CASa*QFQADAALCLt*QHCTAd*DLkNALALQt*QChSVs : 100
D101     : MYAAATTLISL↑LLSIGANAQSSKPAStSSAISATPSiTACILLACVE*SAATANGCAYTN*ASCI*CASa*QFQADAALCLt*QHCTAd*DLkNALALQt*QChSVs : 100
DR170    : MYAAATTLISL↑LLSIGANAQSSKPAStSSAISATPSiTACILLACVE*SAATANGCAYTN*ASCI*CASa*QFQADAALCLt*QHCTAd*DLkNALALQt*QChSVs : 100
S2380    : MYAAATTLISL↑LLSIGANAQSSKPAStSSAISATPSiTACILLACVE*SAATANGCAYTN*ASCI*CASa*QFQADAALCLt*QHCTAd*DLkNALALQt*QChSVs : 100
Lacam    : MYAAATTLISL↑LLSIGANAQSSKPAStSSAISATPSiTACILLACVE*SAATANGCAYTN*ASCI*CASa*QFQADAALCLt*QHCTAd*DLkNALALQt*QChSVs : 100
                MYAAATTLISL↑LLSIGANAQSSKPAStSSAISATPSiTACILLACVE*SAATANGCAYTN*ASCI*CASa*QFQADAALCLt*QHCTAd*DLkNALALQt*QChSVs
                                     ↑

```

Figure 7. Intraspecific and interspecific polymorphisms of MiSSPs proteins.

GeneDoc-edited alignment of MiSSP7 (A), MiSSP8 (B) and MiSSP17 (C) protein sequence of *Laccaria bicolor* strains S238N-H53, S238N-H70, S238N-H82 (homokaryons), S238N-H82xH70, 81306, Cham3, D101, DR170, N203, S2380, CBS_445.79, CBS_594.89 (dikaryons), when available, and *Laccaria amethystina* compared with the sequence in the reference strain S238N. Arrows indicate signal peptide cleavage sites. Asterisk indicate cysteine of the CFEM domain of MiSSP17

However, to date no effector for plant pathogenic microbes have been shown to specifically target reticulum endoplasmic derived vesicles from the host plant. Contrastingly, effectors derived from pathogenic microbes targeted to apoplast are very common, in particular in plant pathogenic fungi (Doehlemann and hemetsberger, 2013) and interfere with plant immunity.

The putative MiSSP17's target is a Phenylalanine ammonia-lyase (PAL), an enzyme conserved in plant families. PAL (EC 4.3.1.5) is the first enzyme in the phenylpropanoid pathway, which convert the amino-acid phenylalanine (Phe) to *trans*-cinnamic acid (*t*-CA) and NH₃ (Raes et al, 2003; Rohde et al, 2004). *t*-CA is a precursor for the biosynthesis of diverse phenolic compounds, such as lignin, lignans, flavonoids, volatile benzenoid esters and benzoylglucosinolates. Within the Salicaceae family, plants synthesize a variety of phenylpropanoid derived secondary metabolites such as derivatives of salicin (phenolic glycosides), a precursor of salicylic acid. Evidences support the involvement of PAL into an alternative way of salicylic acid biosynthesis. For example, loss of PAL activity using the inhibitor the PAL inhibitor 2-aminoindan-2-phosphonic acid (AIP), reduced pathogen-induced SA accumulation in tobacco, cucumber and *Arabidopsis* (Meuwly et al, 1995; Mauch-Mani and Slusarenko, 1996; Pallas et al, 1996). We can thus speculate that MiSSP17 may inhibit PtPAL2 activity whether directly or by interfering with its localization. Indeed, PAL1 isoform, but not PAL2, of *Nicotiana tabacum* localize to microsomes and both green fluorescent protein (GFP) –tagged PALs were partially relocalized to the ER upon C4H overexpression (Achnine *et al.*, 2004). PAL1 localization near the ER membrane was more recently confirmed in *Nicotiana benthamiana* (Bassard *et al.*, 2012), whereas no data are available from *Populus*. Interestingly, fungal effector Cmu1 from the maize pathogen *Ustilago maydis* encode a chorismate mutase that channels chorismate into the phenylpropanoid pathway and limits thereby the biosynthesis of salicylic acid (Djamei *et al.*, 2011). In addition, the same fungus is able to produce a salicylate hydroxylase that degrades SA (Rabe *et al.*, 2013).

Our work also suggests that MiSSP8 could localize to both plasma membrane and cell wall. The MiSSP8 plant target identified using yeast-two hybrid is an universal stress protein (USP). USPs were first discovered in bacteria in which expression were induced in presence of stress agents (Nystrom and Neidhardt, 1992). The six USP from *Escherichia coli* display numerous functions among them cell adhesion, motility and oxidative stress resistance (Nachin *et al.*, 2005).

However, the functions of USP proteins in plant remain largely unknown. A recent paper shows that one USP from wild tomato (*Solanum pennellii*) localizing in both the nuclei and cell membrane is required for drought tolerance together with annexin via an ABA-dependent way (Loukehaich *et al.*, 2012). In addition, plant USP expression may be induced during plant pathogenic microbe infection (Mahomed and van den Berg, 2011) and some may be regulated by ethylene (Sauter *et al.*, 2002). In addition to plant interactor, we found that MiSSP8 is able to interact with an orthologous gene of CAP64 from *Cryptococcus neoformans*. This gene is involved in virulence due to the capsular phenotype of the null mutant (Chang *et al.*, 1996). This phenotype is likely due to the less production of glucuronoxylomannan (polysaccharide) in the mutant (García-Rivera *et al.*, 2004; Grijpstra *et al.*, 2009). Our results suggest that MiSSP8 has a role specifically during fungal colonization of the roots as it is expressed specifically in symbiotic tissues. MiSSP8 could be involved in both polysaccharides export in fungal cells during interaction and regulation of plant defence responses by regulating the USP from *Populus*.

Our results indicate that symbiosis effectors are evolving under purifying selection pressure. This contrasts with the effector genes from plant pathogenic microbes, which evolve under diversifying selection pressure, illustrating the co-evolutionary arms race between host and pathogen (Pedersen *et al.*, 2012; Hacquard *et al.*, 2012; Wicker *et al.*, 2013). MiSSPs are symbiotic effectors essentials for mycorrhizal development. A mutualistic interaction is beneficial for the two partners. Thus, MiSSPs are well-conserved proteins likely to avoid compromising the balance between both partners.

Finally, our findings indicate that small-secreted proteins are a common way of communication between plants and their associated microbes, whatever their ways of life are (from mutualistic to pathogenic). However among all the predicted small secreted proteins which expression is induced during ectomycorrhiza development, only those which are effectively secreted are important for mutualistic interaction to be established. Even if additional experiments are required, our data point to the probable importance for the mutualistic fungus to control plant hormone balance, SA in particular. In addition, all together our data on MiSSP8 suggest that it could be required to control fungal polysaccharide composition and likely control plant defense responses.

Tables:

Table 1. *Laccaria bicolor* strains used in this analysis.

strain ID	Monokaryon/Dicaryon	Geographic origin
<i>Laccaria bicolor</i> S238N	Dikaryon	Champenoux, France
<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H53	Monokaryon	Champenoux, France
<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H70	Monokaryon	Champenoux, France
<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	Monokaryon	Champenoux, France
<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82xH70	Dikaryon	Champenoux, France
<i>Laccaria bicolor</i> S238O	Dikaryon	Oregon, USA
<i>Laccaria bicolor</i> Cham3	Dikaryon	Chammet, France
<i>Laccaria bicolor</i> 81306	Dikaryon	Barbaroux, France
<i>Laccaria bicolor</i> CBS 445.79	Dikaryon	Limoges, France
<i>Laccaria bicolor</i> CBS 594.89	Dikaryon	Wageningen, Netherland
<i>Laccaria bicolor</i> N203	Dikaryon	Saint-Brisson, France
<i>Laccaria bicolor</i> D101	Dikaryon	Quebec
<i>Laccaria bicolor</i> DR170	Dikaryon	Upper Peninsula of Michigan, USA
<i>Laccaria</i> sp A	Dikaryon	Australia
<i>Laccaria</i> sp B clade TM944	Dikaryon	Australia
<i>Laccaria</i> sp B clade TM956	Dikaryon	Australia
<i>Laccaria amethystina</i> LaAM-08-1	Monokaryon	Champenoux, France

Table 2: Intra and interspecific polymorphism of MiSSP7, MiSSP8 and MiSSP17 proteins. Dashes and asterisk indicate respectively data not available and impossible calcul because dS=0.

	MiSSP7			MiSSP8			MiSSP17		
	SNP	Indel	dN/dS	SNP	Indel	dN/dS	SNP	Indel	dN/dS
S238N-H53	0	0	*	0	0	*	0.18	0	*
S238N-H70	0	0	*	0	0	*	-	-	-
S238N-H82	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S238N-H82xH70	0	0	*	0	0	*	-	-	-
S238O	-	-	-	-	-	-	0.92	0	0.56
81306	11.59	2.90	0.28	0.47	0	*	2.39	0	0.83
Cham3	-	-	-	0.47	0	*	-	-	-
D101	8.70	1.45	0.25	-	-	-	0.74	0	1.12
DR170	5.80	0	0.23	0.47	22.54	0.08	1.10	0	0.37
N203	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS-445.79	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS-594.89	11.11	2.90	0.25	0.47	0	*	2.03	0	0.65
Lacam	17.87	7.25	0.21	15.96	45.07	0.27	11.97	1.66	0.85

Supplementary Figures and Tables:

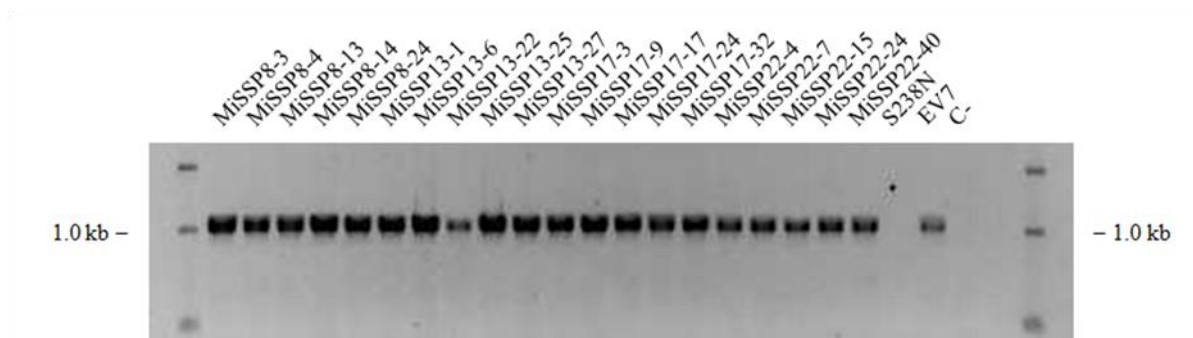


Figure S1. Molecular analysis of missps RNAi lines.

The hygromycin resistance gene was amplified by PCR on genomic DNA to verify its insertion into the genome of missps RNAi lines.

Table S1. Absence or presence of MiSSP's orthologue within *Laccaria* genomes

strain ID	Monokaryon/Dicaryon	MiSSP7	MiSSP8	MiSSP17
<i>Laccaria bicolor</i> S238N	Dikaryon	+	+	+
<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H53	Monokaryon	+	+	+
<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H70	Monokaryon	+	+	-
<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	Monokaryon	-	-	-
<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82xH70	Dikaryon	+	+	+
<i>Laccaria bicolor</i> S238O	Dikaryon	-	-	+
<i>Laccaria bicolor</i> Cham3	Dikaryon	-	+	-
<i>Laccaria bicolor</i> 81306	Dikaryon	+	+	+
<i>Laccaria bicolor</i> CBS 445.79	Dikaryon	-	-	+
<i>Laccaria bicolor</i> CBS 594.89	Dikaryon	+	+	+
<i>Laccaria bicolor</i> N203	Dikaryon	-	-	-
<i>Laccaria bicolor</i> D101	Dikaryon	+	-	+
<i>Laccaria bicolor</i> DR170	Dikaryon	+	+	+
<i>Laccaria sp</i> A	Dikaryon	-	-	-
<i>Laccaria sp</i> B clade TM944	Dikaryon	-	-	-
<i>Laccaria sp</i> B clade TM956	Dikaryon	-	-	-
<i>Laccaria amethystina</i> LaAM-08-1	Monokaryon	+	+	+

Material and Methods

Microorganism and plant material

Saccharomyces cerevisiae strains YTK12 (Jacobs *et al.*, 1997), MaV103 and MaV203 were propagated on YAPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, and 40 mg/L adenine) and cultured at 30°C.

Agrobacterium tumefaciens strains GV3101 and AGL1 were propagated on YEB medium (0.5% beef extract 0.1% yeast extract, 0.5% peptone, 0.5% sucrose, 0.05% MgCl₂) and cultured at 28°C.

The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* strain S238N (Maire P. D. Orton) and RNAi-lines of *L. bicolor* were maintained at 25°C on modified Pachlewski medium P5 + / -150 µg/ml of hygromycine depending on the S238N strain or the RNAi-line tested (Pachlewski and Pachlewskia, 1974; Deveau *et al.*, 2007).

In vitro mycorrhization experiments were performed with the hybrid *Populus tremula x Populus alba* (clone INRA 717-1-B4). Plants were micropropagated *in vitro* and grown on half MS medium (Murashige and Skoog, 1962) in glass culture tubes under a 16 h photoperiod at 24°C in a growth chamber.

Transient expressions in tobacco were performed on six old weeks *Nicotiana Benthamiana* plants. Crops were grown into phytotronic rooms at 20°C with a photoperiod of 16h and a relative humidity of 80%.

For colonization and microarrays experiments, *Laccaria bicolor* inoculum was grown on a substrate of peat moss:vermiculite (3:1) dampened with liquid Pachlewski medium medium (2.7 mM di-ammonium tartrate, 7.3 mM KH₂PO₄ 2.0 mM MgSO₄·7 H₂O 13 mM maltose 110 mM glucose 2.9 µM thiamine-HCl, and 1 mL of a trace-element stock solution Kanieltra medium) for 3 months. Pre-rooted stem cuttings of *Populus trichocarpa* (rooted for 1 week in a solution of: 2.5 mM KNO₃, 0.8 mM KH₂PO₄ 1 mM MgSO₄·7 H₂O 2.3 mM Ca(NO₃)₂·4 H₂O 23 µM H₃BO₃, 4.6 µM MnCl₂·4 H₂O, 0.4 ZnSO₄·7 H₂O, 0.09 µM (NH₄)₂MoO₄, 0.18 µM CuSO₄·5 H₂O 20 µM FeNaEDTA, pH 5.8) or 1 week old seedlings of *Pseudotsuga menziesii* were planted in 1 liter of a 9:1 mixture (v/v) of Terra-Green (a calcined attapulgite clay supplied by Turf-Pro, UK):*L. bicolor* inoculum. Each pot was given 20 mL of a dilute nutrient solution (0.8 mM KNO₃, 0.8 mM Ca(NO₃)₂·4 H₂O, 0.3 mM NaH₂PO₄, 0.3 mM MgSO₄·7 H₂O, and 20 µL trace elements solution Kanieltra per liter of solution) weekly.

To determine the percent of *P. trichocarpa* roots colonized by *L. bicolor* over time, plants were destructively harvested at 2, 4, 6 and 12 weeks after being put into contact with *L. bicolor* and the root system was carefully washed clean of substrate and the top third of the root system, in which most *L. bicolor* mycorrhizal root tips are found, was analyzed for degree of mycorrhization. This was performed by taking 4 random selections from this portion of the root mass, counting 25 lateral roots from each sample and scoring them as mycorrhizal root tips or un-colonized root tips using a Nikon SMZ-2T stereomicroscope (Nikon Instruments Europe B.V., Netherlands, Europe). At least 3 biological replicates (i.e. at least 3 individual plants) per time point were analyzed for mycorrhization potential. The colonization experiment was replicated twice (technical replicate) under climate controlled greenhouse conditions maintaining a 16 hour photoperiod and a temperature of 22 degrees Celsius during the day.

Microarrays analysis

Tissues used for transcriptomic profiling were taken from root systems of *P. trichocarpa* after 2, 4, 6 and 12 weeks post contact with the fungus, and from *P. menziesii* after 2, 4 and 6 weeks of colonization. Plants

were destructively harvested, their roots washed of the substrate and roots observed using a Nikon SMZ-2T stereomicroscope (Nikon Instruments Europe B.V., Netherlands, Europe). For 2 and 4 week samples, only roots that exhibited fungal mycelia attached to the root surface were sampled and frozen immediately in liquid nitrogen. For 6 and 12 week samples, only roots that had a developed fungal mantle were sampled and frozen in liquid nitrogen. Systemic roots harvested from *P. trichocarpa* were defined as fine lateral roots that were in contact with *L. bicolor* but that were not colonized nor had fungal mycelia evident on the root surface. For each timepoint taken, plant host roots grown in the same substrate and with the same nutrient regime but without fungus were harvested to act as a control for transcriptomic analyses. *L. bicolor* free living mycelium grown on a medium containing agar and the nutrient solution used on the plants was used as the control tissue for *L. bicolor*. This control was used as *L. bicolor* grown in the Terra Green substrate could not be harvested in sufficient quantity for RNA extraction and transcriptomic analysis.

Four biological replicates of between 50-100 mg of tissues harvested as described above were used for RNA extraction for each timepoint. Total RNA extraction was performed using the RNeasy kit (Qiagen) as per the manufacturer's instructions with the addition of 25 mg polyethylene glycol 8000/mL RLC buffer to the extraction solution. An on-column DNA digestion step with DNase I (Qiagen) was also included to avoid DNA contamination. RNA quality was verified by Experion HighSens capillary gels (Bio-Rad). As mycorrhizal tissues are very recalcitrant to RNA extraction, quantities of RNA recovered were too low for quantities needed for oligoarray. Therefore we amplified the RNA using the Clontech SMARTer amplification kit according to manufacturers instructions.

Two oligoarrays were used in this study: The 4-plex *Laccaria bicolor* whole genome expression array (GPL14641) and the *Populus trichocarpa* 12-plex whole genome expression array (GPL13485), both manufactured by NimbleGen Systems Limited (Madison, WI). Single dye labeling of samples, hybridization procedures and data acquisition were performed at the NimbleGen facilities (NimbleGen Systems, Reykjavik, Iceland) following their standard protocol. Three or four biological replicates were performed for each condition. Microarray probe intensities were normalized across chips using the ARRAYSTAR software (DNASTAR). Natural log-transformed data were calculated and were subjected to the CyberT statistical framework (<http://cybert.ics.uci.edu/>; Baldi and Long, 2001) using the Standard t-test unpaired two conditions data module. Benjamini & Hochberg multiple-hypothesis testing corrections with False Discovery Rate (FDR) were used. Before transcripts were declared present, the signal-to-noise threshold (signal background) was calculated based on the mean intensity of random probes present on the microarray. Cut-off values for signal intensity (three-times the mean intensity of random probes) were then subtracted from the normalized intensity values. The highest signal intensity values observed on these arrays were ~65,000 arbitrary units. Signals below the cut-off values were assigned a signal intensity value of 1.

Yeast secretion tests

Functional validation of the predicted signal peptide of MiSSPs was conducted with a yeast signal sequence trap assay (Plett *et al.*, 2011). The pSUC2-GW gateway vector, which carries a truncated invertase, SUC2, lacking both its initiation methionine and signal peptide, was used. DNA encoding the predicted MiSSPs plus signal peptide were cloned into pSUC2-GW plasmids using BP / LR technologies from Invitrogen. Then, yeast cells strain YTK12 were transformed with 200 ng of the individual pSUC2-GW/MiSSPs plasmids using

the lithium acetate method, (Gietz and Schiestl, 2007). All transformants were confirmed by PCR with vector-specific primers. Transformants were grown on yeast minimal medium with glucose (SD-W medium: 0.67% Yeast Nitrogen Base without amino acids, 0.075% tryptophan dropout supplement, 2% glucose and 2% agar). To assay for invertase secretion, colonies were grown overnight at 30°C with shaking 200 rpm. Overnight yeast cultures were diluted to a DO = 1 and 20µl of dilution were plated onto YPSA medium containing sucrose and lacking glucose (1% yeast extract, 2% peptone, 2% sucrose, and 1 µg/ mL antimycin A). The YTK12 strain transformed with the pSUC2-GW / SUC2SP vector encoding the invertase with signal peptide and untransformed YTK12 strain were respectively used as positive and negative controls.

Immunofluorescent localization of MISSPs

The peptides LDSRKADLNGDVEARC and DVEARHAADWRRDSD of the MISSP8 sequence (without the signal peptide) as well as the peptides CHSVSVSRSGTASIT and VSSSGVNTSELST of the MiSSP17 were synthesized and used as antigens for the generation of antibodies in rabbits according to the manufacturer's procedures (Eurogentec, Seraing, Belgium). The anti-MISSP8 and MiSSP17 IgG fractions were purified using MAbTrap kit (GE Healthcare) according to the manufacturer's recommendations. Subsequently, IgG-containing fractions were desalted using a HiTrap™ desalting column (GE Healthcare). The concentration of purified IgG from pre-immune serum was determined by Bradford assay using a Bio-Rad protein assay. Final concentration of anti-MISSP8 and MiSSP17 IgG were respectively 1,5 mg/ml and 1.25 mg/ml. For Immunolocalizations longitudinal or transversal sections of free-living mycelium of *L. bicolor*, and ectomycorrhizal root tips from 3-month-old *P. trichocarpa* (cv. 101-74) were fixed for 30 min under vacuum in 4% formaldehyde in PBS buffer (135 mM NaCl, 25 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄, pH 7.5) and then conserved at 4°C. Segments were embedded in agarose 4% and cut into 25 µm longitudinal or transversal sections with a model 1000 Vibratome (Leica). Sections were retrieved with a brush and carefully transferred onto a 48 wells microplate and then were digested in 1% cellulase, 0.01% pectolyase, and 0.1% BSA in PBS buffer for 10 min. After digestion, the segments were washed five times for 5 min each with PBS buffer and then incubated in 1% BSA in PBS for one hour. The BSA was removed and the segments were incubated overnight with purified anti-MISSP8 or MiSSP17 protein rabbit antibodies diluted 1:1,000 in PBS containing 0.5% (w/v) BSA at 4°C. The segments were then washed five times in PBS and incubated in the secondary antibody conjugate, a 1:80 dilution of goat anti-rabbit IgG-AlexaFluor 488 conjugate (Molecular Probes, Invitrogen™, Carlsbad, CA) in PBS for 2 h. After five more washes in PBS, sections were mounted in 80% glycerol (Merck), 20% PBS and viewed by a Bio-Rad Radiance 2100 AGR3Q-BLD Rainbow microscope equipped with X20, X40 and X60. The excitation and emission wavelengths for the Alexa Fluor 488 dye were 500 to 550 nm, respectively. Optical sections were collected at 0.1 to 0.7 mm intervals with Kalman averaging. As a control, sections were incubated with IgG purified from pre-immune serum diluted to the same concentration as anti-MISSP8 or MiSSP17 IgG. Ectomycorrhiza sections were stained with propidium iodide, which stains tanin cells and vacuolar content in red.

Transformation of L. bicolor

Transformation of *L. bicolor* S238N was performed using the RNAi/*Agrobacterium* mediated transformation (AMT) vector for intron hairpin RNA (ihpRNA) expression. Transformation of *L. bicolor* was constructed with the pHg/pSILBAγ vector system (Kempainen and Pardo, 2010) and by using the full length

cDNA sequence of the target gene *MiSSP8* (ID 298667), the cDNA sequence of the target gene *MiSSP17* (ID 332226) comprised between ... bp and ... bp and the cDNA sequence of the target gene *MiSSP22* (ID 327246) comprised between ... bp and ... bp. The plasmid cloning steps were carried out in *E. coli* strain TOP10 (Invitrogen) applying standard molecular methodologies. All the PCR amplification reactions were done with a proof-reading Taq DNA polymerase (Fermentas Life Sciences). The PCR amplicons were cloned by restriction in two steps into the pSILBA γ intronic sequence to form an intron spacer-separated inverted sequence repeat. This ihpRNA expression cassette, transcribed from the *Agaricus bisporus gpdII*-promoter, was further cloned as a full pSILBA γ plasmid into the SacI site present in the T-DNA of pHg. The binary vector pHg carries the hygromycin B resistance cassette and joining of the two plasmids created the RNAi/AMT vector pHg/pS γ MiSSP8, pHg/pS γ MiSSP17 or pHg/pS γ MiSSP22. The pHg/pS γ MiSSP8, pHg/pS γ MiSSP17 and pHg/pS γ MiSSP22 were used for transforming *L. bicolor* dikaryotic strain S238N with *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1 (Kemppainen and Pardo, 2010). The transformed fungal strains were selected with 300 g/ml hygromycin B (Invitrogen) and were later maintained under 150 g/ml hygromycin B selection pressure on modified P5 medium. Five randomly selected pHg/pS γ MiSSP8, pHg/pS γ MiSSP17 and pHg/pS γ MiSSP22 *L. bicolor* transformant strains were used for further molecular and physiological analyses.

In vitro mycorrhization experiments

For *in vitro* mycorrhization tests between *P. tremula* x *P. alba* and *L. bicolor*, we modified an existing sandwich co-culture system initially developed for the *Eucalyptus/Pisolithus* interaction (Chilvers *et al.*, 1986; Burgess *et al.*, 1996). The protocol is described in Felten *et al.* (2009). Briefly, poplar explants were synchronized for rooting for one week on half MS containing 2mg/L IBA and then cultured another three weeks in the absence of hormones on cellophane covered half MS. Rooted plants were arranged together with 10 days old *L. bicolor* mycelium pre-grown on cellophane-covered, sugar reduced Pachlewski medium (Deveau *et al.*, 2007). The contact was realized on sugar reduced Pachlewski medium in square 12x12 plates supplemented with 1g/L MES sodium salt and 1.2% (w/v) agar-agar, pH 5.8. Membranes harbouring the fungus were laid upside down on roots, enabling roots colonization and ECM formation. The bottom part of the plate was covered with a black plastic bag to reduce illumination and plates were maintained vertically at 24°C and under a 16h photoperiod in a growth-chamber. After 4 weeks of incubation, at least 10-20 biological replicates were analyzed for the percent of colonized roots for the *L. bicolor* strain S238N and 5 *L. bicolor missps* RNAi lines. Two independent empty vector transformant *L. bicolor* lines (pSYL7 and pSYL9) were also tested for their ability to colonize roots.

RNA Extraction, cDNA Synthesis, and Quantitative qPCR

Relative quantification of *MiSSP8*, *MiSSP17* and *MiSSP22* transcripts during fungal colonization of *P. tremula* x *P. alba* lateral roots was performed using free-living mycelium as a control. Approximately 100 mg of tissue per biological replicate was frozen in liquid nitrogen and total RNA extracted using the RNeasy kit (Qiagen) as per the manufacturer's instructions with the addition of 20 mg polyethylene glycol 8000/mL RLC buffer to the extraction solution. An on-column DNA digestion step with DNase I (Qiagen) was also included to avoid DNA contamination. RNA quality was verified by Experion HighSens capillary gels (Bio-Rad). Synthesis of cDNA from 100 ng of total RNA was performed using the iScript kit (Bio-Rad) according to manufacturer's

instructions. A Chromo4 Light Cycler Real-time PCR was used for real-time PCR analyses on three biological replicates using the SYBRGreen Supermix following the manufacturer's instructions (Bio-Rad). Fold changes in gene expression between mycorrhizal and free-living mycelium were based on ΔC_t calculations. The data were normalized with one reference gene in each experiment, chosen due to its stable expression during the mycorrhization process as determined by microarray analysis. A Student's one tailed independent T-test was used to determine the significance of the results obtained ($p < 0.05$).

Peptide Application Experiments

Poplar roots were exposed to a fluorescently tagged synthetic version of the MiSSP8 protein produced by Pi Proteomics (Huntsville, Alabama). Young roots of live 717-1B4 plants [grown in the absence of light in liquid MS medium supplemented with 5 mM 6-(γ,γ -dimethylallylamino) purine and 100 nM 1-naphthaleneacetic acid] were acclimated to new (hormoneless) MS medium for 16 hr prior to the addition of MiSSP8 peptide to a final concentration of 4 nM. Rooted plants were incubated in this solution for 2 hr in the light at 24°C. Plant nuclei were stained with DAPI for 20 min. Living roots were visualized immediately.

Transient Expression of GFP fusions in tobacco leaves

Subcellular localizations of MiSSPs were analyzed *in planta* using pMDC vectors developed by Curtis *et al.* (2003) and transient expression by agroinfiltration in tobacco leaves. When necessary, the main cellular compartments were labelled using vectors developed by Nelson *et al.*, (2007). *Agrobacterium* infiltration was carried out using the protocols described by Moffett (2011). Briefly, the transformed *Agrobacterium* GV3010 strain grow overnight at 28°C in 5 mL of YEB medium supplemented with Rifampicine (100 μ g/ml), Gentamycine (10 μ g/ml) and Kanamycine (50 μ g/ml). After overnight growth, pellet *Agrobacterium* cultures by spinning at 4,000 rpm for 15 minutes and resuspend the pellet in an equal volume of infiltration buffer (10mM MgCl₂, 10mM MES, pH5.6, 200 μ M Acetosyringone). The bacteria were placed for at least 2h at 28°C, under gentle shaking. The OD₆₀₀ were adjusted at 0,1-0,2 and *Nicotiana* leaves infiltrated with a syringe. When co-expression of two proteins, a mix of equal proportions of both *Agrobacterium* was prepared. Three biological repetitions were performed. Agroinfiltrated tobaccos were incubated 24 to 48h at room temperature. Small fragments (0.5-1cm²) of leaves were excised from the infiltrated area and placed under vacuum. They were mounted on slides with water or 60% glycerol and analysed with confocal or apotome microscope. Plasmolysis of the cells is achieved using 2-4% NaCl solution .

cDNA libraries construction

Ectomycorrhiza (ECM) cDNA libraries construction was performed as reported in Plett *et al.*, (2011). Briefly, total RNAs were extracted from *L. bicolor* mycorrhiza root tips during a time course of symbiosis development with the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), using the RLC buffer, containing 20 mg ml⁻¹ of PEG 8000, and applying DNaseI treatment on column. ECM entry cDNA library was constructed with the CloneMiner cDNA Library Construction Kit (Invitrogen), starting from 500 ng of purified Total RNAs. Entry cDNA library was then transferred to the yeast-expressible pDEST_32 vector using the Gateway system (supplied with the ProQuest_ Two-Hybrid System kit, Invitrogen).

Yeast two hybrid screen

Yeast Two Hybrid assays were performed as reported in Plett *et al.*, (2011) with the two haploid yeast strains MaV103 and MaV203 which share the same genotype but have different mating-type allowing mating experiments. MaV103 is *MATa* while MaV203 is *MATα*. Briefly, yeast strains MaV103 and MaV203 harboring Gal4-dependent *LacZ*, *HIS3* and *URA3* reporter genes were respectively transformed with the pDEST32 / MiSSP vector (Bait) and the pDEST_22 ECM cDNA library (Prey). After an overnight culture at 30°C and 200 rpm of the Bait and Prey strains, 30 OD₆₀₀ of “bait strain” and 20 OD₆₀₀ of “prey strain” were mixed together and mated as described by Soellick and Uhrig (2001) and Plett *et al.*, (2011). The resulting diploid zygotes were plated on selective medium (SD-L-W-H: 0.67% Yeast Nitrogen Base without amino acids, 0.075% leucine, tryptophan, histidine dropout supplement, 2% glucose and 2% agar) containing 25 mM 3-amino-1,2,4-triazole (3AT) and incubated for 5-7 days at 30°C. Then, single colonies were screened and analyzed for reporter gene expression. For *HIS3* and *URA3* reporter assays, interaction strength was classified as none (-), weak (+), medium (++) or strong (+++), based on visual inspection of colony size using the positive control as a reference. For the *LacZ* (β-Galactosidase) reporter assay, clones were classified based on color development as no interaction (-, white), weak (+, green), medium (++, light-blue), and strong (+++, dark-blue). Cumulative scores from the three assays were used to evaluate interaction strength: clones with score values $\geq ++$ in at least two assays and $\geq +$ in the remaining assay were considered as putative strong interaction. Positive clones were then sequenced, and the resulting sequences were used as queries for a BLASTX search against the *L. bicolor* and *Populus trichocarpa* proteomes at the NCBI. When available, a gene model was assigned to each sequence (identity > 95%).

Sequence alignment and phylogenetic analysis

Predicted cDNA sequences of *MiSSPs* from *L. bicolor* strain S238N were aligned using blastn alignment program, with genomes of a broad selection of other *L. bicolor* strains on MycorWeb (<http://mycor.nancy.inra.fr/IMGC/LaccariaPangenome/>) and genome of *L. amethystina* at the JGI genome portal (<http://genome.jgi-psf.org/pages/blast.jsf?db=Lacam1>). The aligned sequences were exported to the MEGA5 program (Tamura *et al.*, 2011) and a Maximum Likelihood phylogenetic tree was generated using protein pairwise distances with bootstrap resampling of 500 times. All pairwise values of nonsynonymous substitutions per nonsynonymous site (dN) and synonymous substitutions per synonymous site (dS) were calculated using MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). The ratio dN/dS provides an estimate of the evolutionary rate of amino acid substitutions (Miyata and Yasunaga, 1980; Felsenstein, 1985). Protein sequence alignments were performed using GeneDoc program.

References:

- Achnine L, Blancaflor EB, Rasmussen S, Dixon RA: Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 2004, 16(11):3098-109.
- Bassard JE, Mutterer J, Duval F, Werck-Reichhart D: A novel method for monitoring the localization of cytochromes P450 and other endoplasmic reticulum membrane associated proteins: a tool for investigating the formation of metabolons. *FEBS Journal* 2012, 279(9):1576-83.
- Bozkurt TO, Schornack S, Win J, Shindo T, Ilyas M, Oliva R, Cano LM, Jones AM, Huitema E, van der Hoorn RA, Kamoun S : Phytophthora infestans effector AVRblb2 prevents secretion of a plant immune protease at the haustorial interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2011, 108(51):20832-20837.
- Bozkurt TO, Schornack S, Banfield MJ, Kamoun S: Oomycetes, effectors, and all that jazz. *Current Opinion in Plant Biology* 2012, 15(4):483-492.
- Burgess T, Dell B, Malajczuk N: In vitro synthesis of Pisolithus-Eucalyptus ectomycorrhizae: synchronization of lateral tip emergence and ectomycorrhizal development. *Mycorrhiza* 1996, 6:189-196.
- Chang YC, Penoyer LA, Kwon-Chung KJ: The second capsule gene of cryptococcus neoformans, CAP64, is essential for virulence. *Infection and immunity* 1996, 64(6):1977-83.
- Chalot M, Plassard C: Ectomycorrhiza and nitrogen provision to the host tree. In: Polacco JC, Todd CD (eds). *Ecological aspects of nitrogen metabolism in plants*. Wiley, Hoboken, NJ; 2011.
- Chilvers GA, Douglass PA, Lapeyrie F: A paper-sandwich technique for rapid synthesis of ectomycorrhizas. *New Phytologist* 1986, 103:397-402.
- Cooke DE, Cano LM, Raffaele S, Bain RA, Cooke LR, Etherington GJ, Deahl KL, Farrer RA, Gilroy EM, Goss EM, Grünwald NJ, Hein I, MacLean D, McNicol JW, Randall E, Oliva RF, Pel MA, Shaw DS, Squires JN, Taylor MC, Vleeshouwers VG, Birch PR, Lees AK, Kamoun S: Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine pathogen. *PLoS Pathogens* 2012, 8(10):e1002940
- Curtis MD, Grossniklaus U: A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiology* 2003, 133(2):462-9.
- Deveau A, Palin B, Delaruelle C, Peter M, Kohler A, Pierrat JC, Sarniguet A, Garbaye J, Martin F, and Frey-Klett P: 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 Phytologist* 2007, 175:743-755.
- Ding C, Vidanes GM, Maguire SL, Guida A, Synnott JM, Andes DR, Butler G: Conserved and divergent roles of Bcr1 and CFEM proteins in *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. *PLoS One* 2011, 6(12):e28151.
- Djamei A, Schipper K, Rabe F, Ghosh A, Vincon V, Kahnt J, Osorio S, Tohge T, Fernie AR, Feussner I, Feussner K, Meinicke P, Stierhof YD, Schwarz H, Macek B, Mann M, Kahmann R. Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* 2011, 478:395-398.
- Doehlemann G, Hemetsberger C : Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. *New Phytologist* 2013, 198(4):1001-1016.
- Felsenstein J: Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985, 39:783-791.
- Felten J, Kohler A, Morin E, Bhalerao RP, Palme K, Martin F, Ditengou FA, Legué V: The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates lateral root formation in poplar and *Arabidopsis* through auxin transport and signaling. *Plant Physiology* 2009, 151(4):1991-2005.
- Feng F, Zhou JM: Plant-bacterial pathogen interactions mediated by type III effectors. *Current Opinion in Plant Biology* 2012, 15(4):469-476.
- García-Rivera J, Chang YC, Kwon-Chung KJ, Casadevall A: Cryptococcus neoformans CAP59 (or Cap59p) is involved in the extracellular trafficking of capsular glucuronoxylomannan. *Eukaryotic Cell*, 2004, 3(2):385-92.
- Gietz RD, Schiestl RH : High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols* 2007, 2(1):31-4.

- Gogala N: Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi. *Experientia* 1991, 47:331-340.
- Graham JH and Linderman RG: Ethylene production by ectomycorrhizal fungi, *Fusarium oxysporum* f. sp. pini, and by aseptically synthesized ectomycorrhizae and *Fusarium*-infected Douglas-fir roots. *Canadian Journal of Microbiology* 1980, 26:1340-1347.
- Grijpstra J, Tefsen B, van Die I, de Cock H: The *Cryptococcus neoformans* cap10 and cap59 mutant strains, affected in glucuronoxylomannan synthesis, differentially activate human dendritic cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2009, 57(2):142-50.
- Grijpstra J, Gerwig GJ, Wösten H, Kamerling JP, de Cock H: Production of extracellular polysaccharides by CAP mutants of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* 2009, 8(8):1165-73.
- Haas BJ, Kamoun S, Zody MC, Jiang RH, Handsaker RE, Cano LM, Grabherr M, Kodira CD, Raffaele S, Torto-Alalibo T, Bozkurt TO, Ah-Fong AM, Alvarado L, Anderson VL, Armstrong MR, Avrova A, Baxter L, Beynon J, Boevink PC, Bollmann SR, Bos JI, Bulone V, Cai G, Cakir C, Carrington JC, Chawner M, Conti L, Costanzo S, Ewan R, Fahlgren N, Fischbach MA, Fugelstad J, Gilroy EM, Gnerre S, Green PJ, Grenville-Briggs LJ, Griffith J, Grünwald NJ, Horn K, Horner NR, Hu CH, Huitema E, Jeong DH, Jones AM, Jones JD, Jones RW, Karlsson EK, Kunjeti SG, Lamour K, Liu Z, Ma L, Maclean D, Chibucos MC, McDonald H, McWalters J, Meijer HJ, Morgan W, Morris PF, Munro CA, O'Neill K, Ospina-Giraldo M, Pinzón A, Pritchard L, Ramsahoye B, Ren Q, Restrepo S, Roy S, Sadanandom A, Savidor A, Schornack S, Schwartz DC, Schumann UD, Schwessinger B, Seyer L, Sharpe T, Silvar C, Song J, Studholme DJ, Sykes S, Thines M, van de Vondervoort PJ, Phuntumart V, Wawra S, Weide R, Win J, Young C, Zhou S, Fry W, Meyers BC, van West P, Ristaino J, Govers F, Birch PR, Whisson SC, Judelson HS, Nussbaum C: Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* 2009, 461(7262):393-8.
- Hacquard S, Joly DL, Lin YC, Tisserant E, Feau N, Delaruelle C, Legué V, Kohler A, Tanguay P, Petre B, Frey P, Van de Peer Y, Rouzé P, Martin F, Hamelin RC, Duplessis S: A comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populina* (poplar leaf rust). *Molecular Plant-Microbe Interaction* 2012, 25(3):279-93.
- Harley JL and Harley EL: A check-list of mycorrhiza in the British flora. *New phytologist* 1987, 105:1-102.
- Ho I: Enzyme activity and phytohormone production of a mycorrhizal fungus, *Laccaria laccata*. *Canadian Journal of Forest Research* 1987, 17:855-858.
- Ho I: Comparison of eight *Pisolithus tinctorius* isolates for growth rate, enzyme activity, and phytohormone production. *Canadian Journal of Forest Research* 1987, 17:31-35.
- Horan DP and Chilvers GA: Chemotropism-the key to ectomycorrhiza formation. *New Phytologist* 1990, 116:297-301.
- Jacobs KA, Collins-Racie LA, Colbert M, Duckett M, Golden-Fleet M, Kelleher K, Kriz R, LaVallie ER, Merberg D, Spaulding V, Stover J, Williamson MJ, McCoy JM: A genetic selection for isolating cDNAs encoding secreted proteins. *Gene* 1997, 198(1-2):289-96.
- Karabaghli-Degron C, Sotta B, Bonnet M, Gay G, Le Tacon F: The auxin transport inhibitor 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) inhibits the stimulation of in vitro lateral root formation and the colonization of the tap-root cortex of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *New Phytologist* 1998, 140:723-733.
- Kemppainen M, Duplessis S, Martin F, Pardo AG: RNA silencing in the model mycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*: gene knock-down of nitrate reductase results in inhibition of symbiosis with *Populus*. *Environmental Microbiology* 2009, 11(7):1878-1896.
- Kemppainen MJ, Pardo AG: pHg/pSILBA γ vector system for efficient gene silencing in homobasidiomycetes: optimization of ihpRNA - triggering in the mycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *Microbial Biotechnology*, 2010, 3(2):178-200.
- Klein RD, Gu Q, Goddard A, Rosenthal A: Selection for genes encoding secreted proteins and receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 1996, 93:7108-7113.
- Kleemann J, Rincon-Rivera LJ, Takahara H, Neumann U, Ver Loren van Themaat E, van der Does HC, Hacquard S, Stüber K, Will I, Schmalenbach W, Schmelzer E, O'Connell RJ: Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS Pathogens* 2012, 8(4):e1002643.

- Klis FM, Sosinska GJ, de Groot PW, Brul S: Covalently linked cell wall proteins of *Candida albicans* and their role in fitness and virulence. *FEMS Yeast Research* 2009, 9(7):1013-1028.
- Kloppholz S, Kuhn H, Requena N: A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Current Biology* 2011, 21:1204-1209.
- Kulkarni RD, Thon MR, Pan H, Dean RA : Novel G-protein-coupled receptor-like proteins in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Genome Biology* 2005, 6(3):R24.
- Lagrange H, Jay-Allemand C, Lapeyrie F: Rutin, the phenolglycoside from *Eucalyptus* root exudates stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. *New Phytologist* 2001, 150:349-355.
- Leake JR, Donnelly DP, Saunders EM, Boddy L, Read DJ: Rates and quantities of carbon flux to ectomycorrhizal mycelium following ¹⁴C pulse labeling of *Pinus sylvestris* seedlings: effects of litter patches and interaction with a wood-decomposer fungus. *Tree Physiology* 2001, 21(2-3):71-82.
- Loukehaich R, Wang T, Ouyang B, Ziaf K, Li H, Zhang J, Lu Y, Ye Z: SpUSP, an annexin-interacting universal stress protein, enhances drought tolerance in tomato. *Journal Experimental of Botany* 2012, 63(15):5593-606.
- Martin F, Duplessis S, Ditengou F, Lagrange H, Voiblet C, Lapeyrie, F : Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes. *New Phytologist* 2001, 151:145-154.
- Martin F, Aerts A, Ahrén D, Brun A, Danchin EG, Duchaussoy F, Gibon J, Kohler A, Lindquist E, Pereda V, Salamov A, Shapiro HJ, Wuyts J, Blaudez D, Buée M, Brokstein P, Canbäck B, Cohen D, Courty PE, Coutinho PM, Delaruelle C, Detter JC, Deveau A, DiFazio S, Duplessis S, Fraissinet-Tachet L, Lucic E, Frey-Klett P, Fourrey C, Feussner I, Gay G, Grimwood J, Hoegger PJ, Jain P, Kilaru S, Labbé J, Lin YC, Legué V, Le Tacon F, Marmeisse R, Melayah D, Montanini B, Muratet M, Nehls U, Niculita-Hirzel H, Oudot-Le Secq MP, Peter M, Quesneville H, Rajashekar B, Reich M, Rouhier N, Schmutz J, Yin T, Chalot M, Henrissat B, Kües U, Lucas S, Van de Peer Y, Podila GK, Polle A, Pukkila PJ, Richardson PM, Rouzé P, Sanders IR, Stajich JE, Tunlid A, Tuskan G, Grigoriev IV: The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* 2008, 452:88-92.
- Mauch-Mani B, Slusarenko AJ: Production of Salicylic Acid Precursors Is a Major Function of Phenylalanine Ammonia-Lyase in the Resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* 1996; 8(2):203-212.
- Meuwly P, Molders W, Buchala A, Metraux JP: Local and Systemic Biosynthesis of Salicylic Acid in Infected Cucumber Plants. *Plant Physiology* 1995, 109(3):1107-1114.
- Miersch O, Bohlmann H, Wasternack C: Jasmonates and related compounds from *Fusarium oxysporum*. *Phytochemistry* 1999, 50:517-523.
- Miyata T, Yasunaga T: Molecular evolution of mRNA: a method for estimating evolutionary rates of synonymous and amino acid substitutions from homologous nucleotide sequences and its application. *Journal of Molecular Evolution* 1980, 16(1):23-36.
- Moffett P: Fragment complementation and co-immunoprecipitation assays for understanding R protein structure and function. *Methods Molecular Biology* 2011, 712:9-20.
- Murashige M and Skoog F: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 1962, 15:473-497.
- Nachin L, Nannmark U, Nyström T: Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion, and motility. *Journal of Bacteriology* 2005, 187(18):6265-72.
- Nehls U, Goehringer F, Wittulsky S, Dietz S: Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review. *Plant Biology* 2010, 12:292-301.
- Nelson BK, Cai X, Nebenführ A: A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant Journal* 2007, 51(6):1126-1136.
- Nomura K, Debroy S, Lee YH, Pumplin N, Jones J, He SY : A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science* 2006, 313(5784):220-3.
- Nyström T, Neidhardt FC: Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 1992, 6(21):3187-98.
- O'Connell RJ, Thon MR, Hacquard S, Amyotte SG, Kleemann J, Torres MF, Damm U, Buiate EA, Epstein L, Alkan N, Altmüller J, Alvarado-Balderrama L, Bauser CA, Becker C, Birren BW, Chen Z, Choi J, Crouch JA, Duvick JP, Farman MA, Gan P, Heiman D, Henrissat B, Howard RJ, Kabbage M, Koch C, Kracher B, Kubo Y,

- Law AD, Lebrun MH, Lee YH, Miyara I, Moore N, Neumann U, Nordström K, Panaccione DG, Panstruga R, Place M, Proctor RH, Prusky D, Rech G, Reinhardt R, Rollins JA, Rounsley S, Scharl CL, Schwartz DC, Shenoy N, Shirasu K, Sikhakolli UR, Stüber K, Sukno SA, Sweigard JA, Takano Y, Takahara H, Trail F, van der Does HC, Voll LM, Will I, Young S, Zeng Q, Zhang J, Zhou S, Dickman MB, Schulze-Lefert P, Ver Loren van Themaat E, Ma LJ, Vaillancourt LJ: Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics* 2012, 44(9):1060-5.
- Pallas JA, Paiva NL, Lamb C, Dixon RA: Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. *The Plant Journal* 1996, 10(2):281-293.
- Paschlewski R and Pachlewskia: Studies on symbiotic properties of mycorrhizal fungi of pin (*Pinus sylvestris* L.) with the aid of the method of mycorrhizal synthesis in pure culture on agar. (Translated into English by Royal Dzieciolowski). Warsaw, Poland: Forest Research Institute; 1974.
- Pedersen C, Ver Loren van Themaat E, McGuffin LJ, Abbott JC, Burgis TA, Barton G, Bindschedler LV, Lu X, Maekawa T, Wessling R, Cramer R, Thordal-Christensen H, Panstruga R, Spanu PD : Structure and evolution of barley powdery mildew effector candidates. *BMC Genomics* 2012, 13:694.
- Pérez A, Pedrós B, Murgui A, Casanova M, López-Ribot JL, Martínez JP : Biofilm formation by *Candida albicans* mutants for genes coding fungal proteins exhibiting the eight-cysteine-containing CFEM domain. *FEMS Yeast Research* 2006, 6(7):1074-1084.
- Plett JM, Kempainen M, Kale SD, Kohler A, Legué V, Brun A, Tyler BM, Pardo AG, Martin F: A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Current Biology* 2011, 21:1197-1203.
- Plett JM, Montanini B, Kohler A, Ottonello S, Martin F: Tapping genomics to unravel ectomycorrhizal symbiosis. *Methods in Molecular Biology* 2011, 722:249-281.
- Plett JM, Daguette Y, Wittulski S, Deveau A, Melton SJ, Kohler A, Morrell-Falvey J, Brun A, Veneault-Fourrey C, Martin F: The Effector Protein MiSSP7 of the Mutualistic Fungus *Laccaria bicolor* Interacts with *Populus* JAZ Proteins. Unpublished data.
- Rabe F, Ajami-Rashidi Z, Doehlemann G, Kahmann R, Djamei A: Degradation of the plant defence hormone salicylic acid by the biotrophic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology* 2013, 89(1):179-88.
- Raes J, Rohde A, Christensen JH, Van de Peer Y, Boerjan W: Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 2003, 133(3):1051-71.
- Raffaele S, Win J, Cano LM, Kamoun S: Analyses of genome architecture and gene expression reveal novel candidate virulence factors in the secretome of *Phytophthora infestans*. *BMC Genomics* 2010, 11:637.
- Rafiqi M, Ellis JG, Ludowici VA, Harham AR, Dodds PN : Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions. *Current opinion in plant biology* 2012, 15(4):477-482.
- Reddy SM, Hitchin S, Melayah D, Pandey AK, Raffier C, Henderson J, Marmeisse R, Gay G: The auxin-inducible GH3 homologue Pp-GH3.16 is downregulated in *Pinus pinaster* root systems on ectomycorrhizal symbiosis establishment. *New Phytologist* 2006, 170:391-400.
- Rincon A, Gerard J, Dexheimer J, Le Tacon F : Effect of an auxin transport inhibitor on aggregation and attachment processes during ectomycorrhiza formation between *Laccaria bicolor* S238N and *Picea abies*. *Canadian Journal of Botany* 2001, 79:1152-1160.
- Rincon A, Priha O, Sotta B, Bonnet M, Le Tacon F: Comparative effects of auxin transport inhibitors on rhizogenesis and mycorrhizal establishment of spruce seedlings inoculated with *Laccaria bicolor*. *Tree Physiology* 2003, 23:785-791
- Rohde A, Morreel K, Ralph J, Goeminne G, Hostyn V, De Rycke R, Kushnir S, Van Doorselaere J, Joseleau JP, Vuylsteke M, Van Driessche G, Van Beeumen J, Messens E, Boerjan W: Molecular phenotyping of the *pal1* and *pal2* mutants of *Arabidopsis thaliana* reveals far-reaching consequences on phenylpropanoid, amino acid, and carbohydrate metabolism. *Plant Cell* 2004; 16(10):2749-71.
- Rupp LA, DeVries HE, Mudge KW: Effect of aminocyclopropane carboxylic acid and aminoethoxyvinylglycine on ethylene production by ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany* 1989, 67:483-485.
- Sauter M, Rzewuski G, Marwedel T, Lorbiecke R: The novel ethylene-regulated gene *OsUsp1* from rice encodes a member of a plant protein family related to prokaryotic universal stress proteins. *Journal of Experimental Botany* 2002, 53:2325-2331.

- Schulze S, Kay S, Büttner D, Egler M, Eschen-Lippold L, Hause G, Krüger A, Lee J, Müller O, Scheel D, Szczesny R, Thieme F, Bonas U : Analysis of new type III effectors from *Xanthomonas* uncovers XopB and XopS as suppressors of plant immunity. *New Phytologist* 2012, 195(4):894-911.
- Smith SE, Read DJ. In *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd edition. London, UK: Academic Press; 2008.
- Soellick TR, Uhrig JF : Development of an optimized interaction-mating protocol for large-scale yeast two-hybrid analyses. *Genome Biology* 2001, 2(12):RESEARCH0052.
- Sorgo AG, Brul S, de Koster CG, de Koning LJ, Klis FM: Iron restriction-induced adaptations in the wall proteome of *Candida albicans*. *Microbiology* 2013.
- Splivallo R, Fischer U, Gobel C, Feussner I, Karlovsky P: Truffles Regulate Plant Root Morphogenesis via the Production of Auxin and Ethylene. *Plant Physiology* 2009, 150:2018-2029.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 2011, 28(10):2731-9.
- Tisserant E, Kohler A, Dozolme-Seddas P, Balestrini R, Benabdellah K, Colard A, Croll D, Da Silva C, Gomez SK, Koul R, Ferrol N, Fiorilli V, Formey D, Franken P, Helber N, Hijri M, Lanfranco L, Lindquist E, Liu Y, Malbreil M, Morin E, Poulain J, Shapiro H, van Tuinen D, Waschke A, Azcón-Aguilar C, Bécard G, Bonfante P, Harrison MJ, Küster H, Lammers P, Paszkowski U, Requena N, Rensing SA, Roux C, Sanders IR, Shachar-Hill Y, Tuskan G, Young JP, Gianinazzi-Pearson V, Martin F: The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New phytologist* 2012, 193(3):755-769.
- Wang B and Qiu YL. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* . 2006. 16: 299–363
- Wicker T, Oberhaensli S, Parlange F, Buchmann JP, Shatalina M, Roffler S, Ben-David R, Doležel J, Simková H, Schulze-Lefert P, Spanu PD, Bruggmann R, Amselem J, Quesneville H, Ver Loren van Themaat E, Paape T, Shimizu KK, Keller B : The wheat powdery mildew genome shows the unique evolution of an obligate biotroph. *Nature Genetics* 2013, 45(9):1092-1096.
- Wilcox HE: In *Plant roots: the Hidden Half*. Edited by Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U. Marcel Dekker. New-York, USA: *Mycorrhizae*; 1991, 731-765.
- Win J, Chaparro-Garcia A, Belhaj K, Saunders DG, Yoshida K, Dong S, Schornack S, Zipfel C, Robatzek S, Hogenhout SA, Kamoun S: Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 2012, 77:235-47.
- Zamioudis C, Pieterse CM: Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 2012, 25(2):139-150.

Acknowledgments

We would like to thank Theophile Kazmierczak, Adeline Becquer for technical support during their master degree. This work was supported by Lorraine University, INRA, the Region Lorraine Research Council and by the Plant-Microbe Interfaces Scientific Focus Area project at Oak Ridge National Laboratory (ORNL) sponsored by Office of Biological and Environmental Research at the United States Department of Energy Office of Science. ORNL is managed by UT-Battelle, LLC, under contract DE-AC05-00OR22725 for the United States Department of Energy. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript

**Chapitre IV : Analyse globale des facteurs de transcription
du champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor***

Chapitre IV : Analyse globale des facteurs de transcription du champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor*

Les champignons ectomycorhiziens peuvent vivre en association avec les racines des plantes en tant que symbiotes ou dans le sol comme saprotrophes facultatifs. Leur cycle de vie se compose de trois principaux stades de développement: le mycélium en culture pure (FLM, Free Living Mycelium), l'ectomycorhize (ECM) et les carpophores (FB, Fruiting body) (Smith et Read, 2008). L'analyse de puces à ADN réalisées sur des ECM de *Paxillus involutus-Betula pendula*, *Pisolithus microcarpus-Eucalyptus globulus*, montrent que la transition d'une étape à une autre peut s'expliquer par l'expression différentielle des gènes entre les différents stades de développement, ce qui suggère une reprogrammation génétique (Johansson *et al.*, 2004; Duplessis *et al.*, 2005; Le Queré *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2008; Larsen *et al.*, 2011). Par exemple, comparé au FLM, les stades précoces du développement symbiotique sont caractérisés par une surexpression des gènes impliqués dans l'adhésion et le remodelage de la paroi cellulaire tandis que les stades plus tardifs sont caractérisés par une surexpression des gènes impliqués dans le métabolisme du carbone, des acides aminés et de l'azote ainsi que dans la respiration mitochondriale (Duplessis *et al.*, 2005; Le Queré *et al.*, 2005, Deveau *et al.*, 2008; Larsen *et al.*, 2011). Les facteurs de transcription (TFs) sont les maîtres d'œuvre de l'expression génétique et contribuent très probablement à ces changements et à la spécialisation des tissus. Leur identification chez les champignons ectomycorhiziens constitue une étape décisive dans la compréhension des reprogrammations génétiques qui s'opèrent au cours de la formation des ECM et des FBs. A ce jour, une seule analyse globale des TFs d'un champignon mycorhizien a été réalisée. Il s'agit de l'étude menée par Montanini et ses collaborateurs en 2011 sur le génome de *T. melanosporum*. Elle a montré que chez la truffe, le passage d'un stade à un autre du développement est étroitement lié à la surexpression de certains TFs, ce qui suggère la spécialisation fonctionnelle de certains TFs pour certaines étapes du développement.

L'objectif premier de ce projet était de dresser une liste exhaustive des TFs de *L. bicolor* et d'étudier leur expression au cours du développement symbiotique et dans les fructifications. Pour ce faire nous avons utilisé une méthode bioinformatique précédemment décrite par Wilson *et al.*, (2008), basée sur l'analyse manuelle d'un set de protéines possédant des domaines PFAM et Superfamily.

Le profil d'expression de chaque TF a ensuite été analysé dans l'ECM mature de différentes plantes hôtes (*Populus trichocarpa*, *Populus deltoïdes*, *Pseudotsuga menziesii* (Pin Douglas)), au cours d'une cinétique de développement et dans les carpophores. Cela nous a permis d'identifier un panel de TFs très fortement régulés dans l'ECM et / ou les FBs. L'annotation des TFs de *L. bicolor* a été rendue difficile par le faible nombre de TFs caractérisés chez les basidiomycètes et de faibles similitudes avec les TFs caractérisés d'ascomycètes. Toutefois, certains des TFs les plus régulés dans l'ECM de peuplier (*P. trichocarpa* et *P. deltoïdes*) et du pin Douglas présentent des similitudes avec des TFs impliqués dans le maintien de l'intégrité cellulaire, le métabolisme du carbone, de l'azote mais également celui du fer et du soufre. Dans un second temps, des banques d'ADNc d'ECM, de racines et de FLM / FB ont été analysées à l'aide du système simple hybride en levure afin d'identifier des TFs capables d'activer la transcription de gènes rapporteurs. Bien que les rendements aient été nettement inférieurs à ceux obtenus pour des ascomycètes tels que *S. cerevisiae* ou *T. melanosporum*, 6 % des TFs de *L. bicolor* prédits *in silico* ont été validés. Un certain nombre de TFs de peuplier appartenant à des familles dont les représentants sont connus pour réguler le développement ou les réactions de défense de la plante a également été validé. De plus, cette méthode a permis l'identification de protéines fongiques prédites sécrétées, de 250 à 400 acides aminés, possédant un motif de localisation nucléaire et une activité transcriptionnelle : les STAPs (Secreted Transcriptional Activator Proteins). Ces protéines pourraient être une nouvelle classe d'effecteurs qui, associés aux MiSSPs, favoriseraient le développement symbiotique ou contrôlèrent les microorganismes de la rhizosphère.

Les résultats obtenus au cours de cette analyse ont été rassemblés et discutés dans le manuscrit intitulé « **Genome-wide transcriptome profiling and functional analysis of the transcription factors from *Laccaria bicolor*** », soumis dans la revue **PloS One**.

Title: Genome-wide transcriptome profiling and functional analysis of the transcription factors from *Laccaria bicolor*.

Authors: Y. Daguerre^{1*}, E. Levati^{2*}, E. Tisserant¹, E. Morin¹, J. Plett¹, A. Kohler¹, B. Montanini², S. Ottonello², C. Veneault-Fourrey¹, F. Martin¹, A. Brun¹.

* Authors contributed equally to this work.

Affiliations:

¹ INRA, UMR 1136, INRA-Université de Lorraine, Interactions Arbres/Microorganismes, Laboratoire d'Excellence ARBRE, 54280 Champenoux, France.

² Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare, Università degli Studi di Parma, Viale G.P. Usberti 23/A, 43100 Parma, Italy.

Abstract

During symbiosis development the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* experiences striking transcriptomic reprogramming. Transcription factors (TFs) likely play a key role in driving this differential gene expression. Here, we annotated the TFs from *L. bicolor* and investigate their differential expression in poplar and Douglas fir ectomycorrhizas. We showed that several *L. bicolor* TFs display sequence similarities to known TFs involved in cell wall integrity, carbon, nitrogen, iron and sulfur metabolism in fungi. In addition, besides the functional validation of 6% of the predicted TFs, yeast-based assay allowed the identification of Secreted Transcriptional Activator Proteins (STAPs) that may form part of a new class of effector proteins used to promote symbiosis development or/and control other rhizospheric microorganisms.

Keywords

Transcription factors, symbiosis, secreted proteins, transcriptional activator trap assay, yeast, transcriptome, ectomycorrhiza development

Introduction

Ectomycorrhizae are mutualistic associations between plant roots and rhizospheric ectomycorrhizal fungi in which the plant provides the fungus with photosynthetic sugars and the fungal symbiont provides nitrogen, phosphorus and sulfate mineral elements not easily bioavailable to the plant or present in very low concentrations within forest soils (Martin and Tunlid, 2009; Smith and Read, 2008). Thus, mycorrhizae are crucial for the growth and health of the trees in forest ecosystems. The ability to form mutualistic relationships with ectomycorrhizal fungi is restricted to approximately 8000 plant species, but the ecological and economical importance of this grouping of plants is amplified by their widespread occupancy of terrestrial ecosystems (Read and Perez-Moreno, 2003; Brundrett, 2002). The life cycle of ectomycorrhizal fungi is comprised of three main developmental stages: free living mycelia (FLM) that prospect the soil for nutrients and receptive host roots, the symbiotic tissues called ectomycorrhizal (ECM) root tips which are formed from an intimate association between plant and fungal cells and the reproductive stage which involves the production of a fruiting body (FB) (Smith and Read, 2008). ECM root tips are characterized by the presence of three structural components: a mantle of aggregated hyphae which encloses the root, a network of hyphae (called the Hartig net) which penetrate between the epidermal and cortical cells, and a web of extraradical hyphae which forms an essential connection between the colonized root and soil hyphae prospecting for nutrients and with the hyphae forming the fruiting body (Massicotte et al, 1986; 1987a,b, 1989, 1990; Peterson and Bonfante, 1994; Smith and Read, 2008).

Microarrays analysis performed on the mycorrhizal *Paxillus involutus-Betula pendula*, *Pisolithus microcarpus-Eucalyptus globulus* and *Laccaria bicolor-Populus tremuloides* associations showed that the developmental transition from FLM to ECM or FB involve a succession of coordinated changes in transcript profiles (Johansson et al, 2004; Duplessis et al, 2005; Le Queré et al, 2005; Wright et al, 2005; Martin et al, 2008; Larsen et al., 2011). For example, the earlier stages of symbiotic development are characterized by the up-regulation of genes in the fungal symbiont involved in cell wall adhesion and remodeling, whereas later stages are characterized by the up-regulation of genes involved in carbon and nitrogen metabolism, as well as in mitochondrial respiration (Duplessis et al, 2005; LeQueré et al, 2005, Deveau et al, 2008; Larsen et al., 2011). Contact with the fungus also leads to transcriptomic as well as physiological restructuring of the plant host.

For example, the root system in contact with ectomycorrhizal hyphae display an increased number of lateral roots and root tips undergoing colonization display arrested tip growth (Burgess et al., 1995; Felten et al, 2009, 2010). ECM ontogenesis also leads to alterations in the host plant defense. In contrast to pathogenic fungi, where host colonization typically leads to a strong host defense response, mycorrhizal fungi are able to colonize their hosts while inducing only a punctual defense reaction. Plant genes involved in defense responses are up-regulated during mantle and Hartig net development but they are repressed at later stages of ECM development (Duplessis et al, 2005; LeQuéré et al, 2005). Therefore, formation of symbiotic root tips is responsible for significant genetic reprogramming in both partners.

Transcription factors are thought to be key drivers of transcriptomic changes during mutualistic symbiosis (Martin and Hilbert, 1991). TF proteins consist of at least one DNA-binding domain (DBD) that binds to sequence-specific DNA elements in the promoter region of target genes and an activation domain (AD) that interacts with (and recruits) the transcription machinery. TF are classified into several families based on conserved folds and structures within their DBDs. ADs, conversely, do not show such conservation making them less easily classified (Stegmaier et al., 2004). To date, only one genome-wide analysis of TFs has been published studying an ectomycorrhizal fungus (Montanini *et al.*, 2011). This study, which considered the interaction between the ascomycete *Tuber melanosporum* and hazelnut (*Corylus avellana*), highlighted TFs associated with the regulation of root cell wall remodeling and fatty acid metabolism. In particular, two *XlnR* orthologues of the activator of genes encoding cellulose/hemicellulose degrading enzymes showed a dramatic up-regulation in ECM (Montanini *et al.*, 2011).

The aim of this study was to further our understanding of TFs coordinated by mutualistic interactions by characterizing the repertoire of TFs encoded by the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* and to identify TFs that exhibited a differential expression during ECM and FB stages of development. To corroborate, and extend, *in silico* TF predictions, a series of Transcriptional Activator Trap (TAT) assays (Titz et al, 2006; Montanini et al, 2011), were performed using three different cDNA libraries (ECM, FLM/FB and Root).

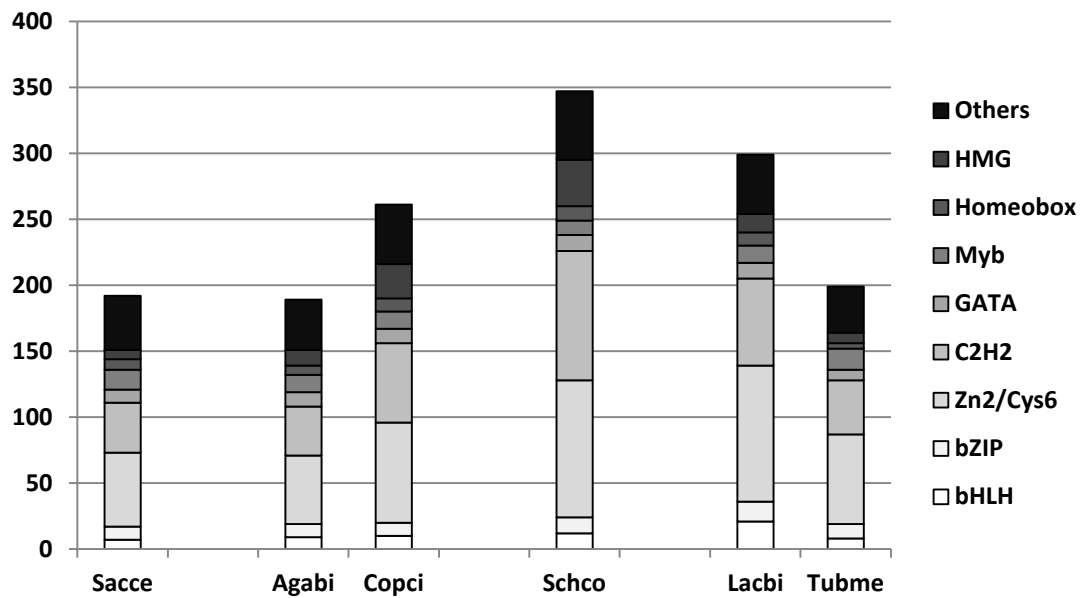


Figure 1: Total number of *Laccaria bicolor* (Lacbi) transcription factors (TFs) among different DBD family and comparison with the TF repertoire of other fungi. *S. cerevisiae*, Sacce; *A. bisporus var. bisporus*, Agabi; *C. cinerea*, Copci; *S. commune*, Schco; *T. melanosporum*, Tubme.

Results

Transcription factors predicted in the Laccaria bicolor genome

299 predicted TF-encoding genes were identified in the *L. bicolor* genome V2.0 by using the Joint Genome Institute gene prediction pipeline (<http://genome.jgi-psf.org/pages/search-for-genes.jsf?organism=Lacbi2>) and were categorized according to their DNA binding domain (Table S1). 2 additional TF-encoding genes without DBD were also identified for a total of 301 TFs (Table S1). The TF repertoire of *L. bicolor* was compared to the ones of the ascomycete model yeast *Saccharomyces cerevisiae*, three other saprotrophic basidiomycetes *Agaricus bisporus*, *Coprinopsis cinerea*, and *Schizophyllum commune*, and the ectomycorrhizal ascomycete *T. melanosporum* (Fig.1 and Fig.S1).

In these fungal genomes, TF distribution between known major families was highly similar. The two prevalent families encoded within these genomes were the C2H2 Zinc finger (PF00096, SSF57667) and the Zn₂/Cys₆ Zn cluster (PF00172, SSF57701) (Fig.1 and Fig.S1) which are known to be involved in the regulation of a wide range of metabolic and developmental mechanisms. Percentage of TFs per family was also highly similar when compared to the genome of the other fungus despite the fact that these fungi were phylogenetically distant from *L. bicolor* (Fig.1 and Fig.S1). Among the 301 predicted TF, 67.1% of the coding sequences were corroborated by Expressed Sequence Tag (EST). However, sequences were sometimes slightly different because of the addition of intron or exon. In some case, different splicing forms were observed but needed confirmation. 12% of the predicted TF had no EST. For the last 20.9%, EST fragments available did not allow the validation of the prediction.

BLASTP of the 301 TFs from *L. bicolor* against the non-redundant database at NCBI identified only 96 putative orthologues of known TFs (Table 1 and Table S1.1). As most of the functionally characterized TFs belong to ascomycetous fungi, which are phylogenetically distant from *L. bicolor*, this may explain why only a limited number of putative orthologues were identified. 38.9% of the predicted TF displayed no similarity with functionally characterized TFs. Among them, some were lineage specific, 12 belonging to the Zn₂/Cys₆ Zn cluster family, 2 to the C2H2 Zinc finger family, 1 to the bZIP family and 1 to the NF-X1 family (Table S1.2).

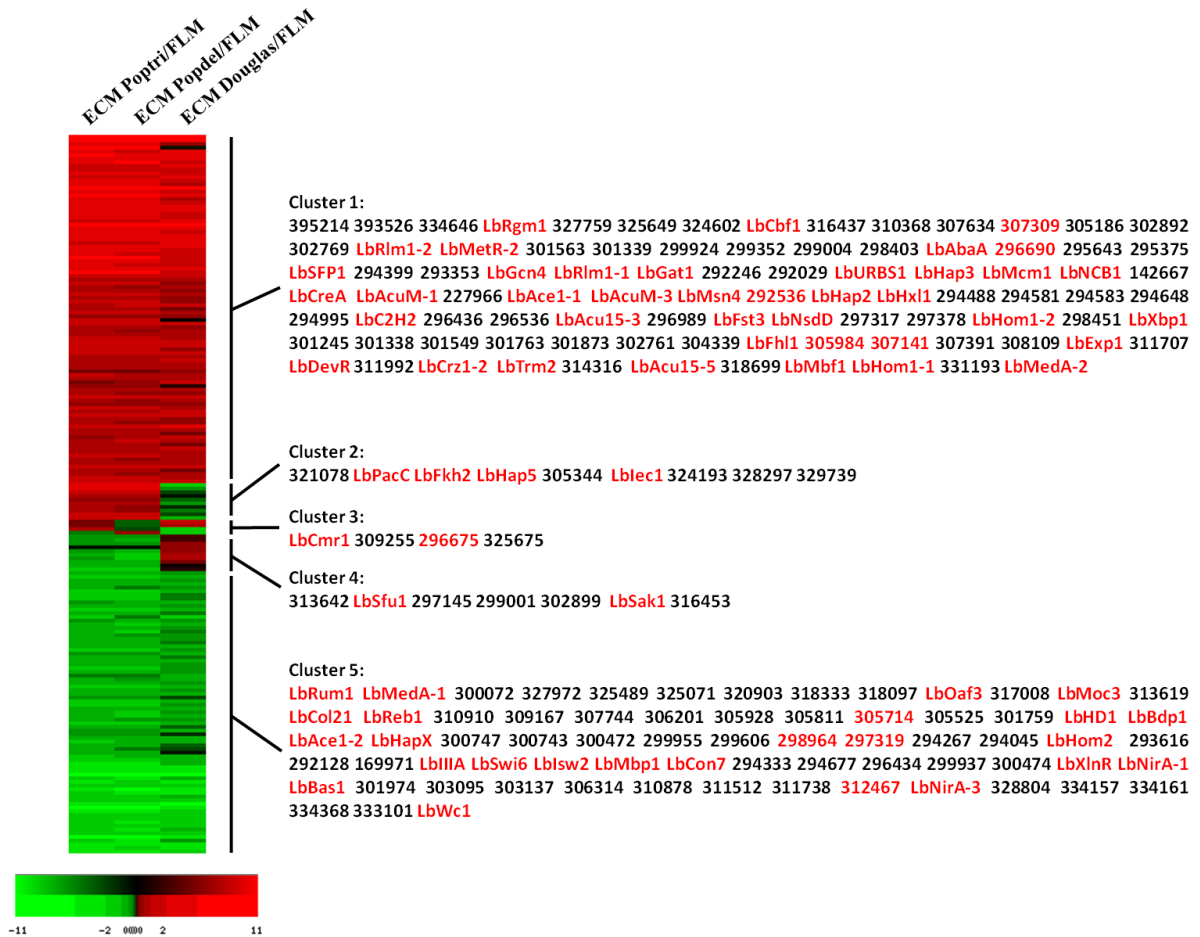


Figure 2 : Hierarchical clustering of microarray data of transcription factors significantly regulated more than 2.5x ($p\text{-value} \leq 0.05$) during the colonization of *P. trichocarpa*, *P. deltoïdes* and *Pseudotsuga menziesii* roots by *L. bicolor*. Red = TFs preferentially up-regulated during ECM development. Green = TFs preferentially down-regulated during ECM development. Black = TFs not regulated during ECM development.

Expression patterns of TFs during ECM development

The comparison of transcript profiles of *L. bicolor* FLM, ECM and FB identified several TFs with a differential expression during ECM and/or FB development. Some TFs were regulated in ECM and/or in FB (Table 2, Table 3, Table S2 and Table S3), while others were highly expressed in ECM although not significantly regulated (Table 4). To investigate whether the host species impacted TF expression upon ECM development, the expression of TFs was followed in ECM of *P. trichocarpa*, *P. deltoïdes* and Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) (Table S4 and Table S5). Figure 2 shows a clustering performed with *L. bicolor* TFs significantly regulated in at least one of the three interactions. Except for a small number of TFs that showed host-specific expression (Figure 2), the vast majority of TFs exhibited expression profiles that were very similar in all symbiotic tissues considered. Such results suggest that a common set of TFs is required for *L. bicolor* ECM formation and functioning and that the host species has a limited impact on the fungal TF expression.

In order to identify *L. bicolor* TFs preferentially expressed at the early stage, the late stage or throughout the formation of ectomycorrhiza either on *P. trichocarpa* or Douglas fir, a time-course of ECM development at 2, 4, 6 and 12 weeks was performed and TF gene expression analyzed. Figures 3 and 4 show expression profiles of TFs significantly up- or down-regulated (≥ 2.5 -fold, p -value ≤ 0.05) at least at one point during the ECM development (Figures 3 and 4). Four distinct expression patterns were observed with Douglas fir (Figures 4). Clusters 1 and 4 correspond to TFs that were up- or down-regulated, respectively, throughout the ECM development, suggesting a putative role during the entire course of development. Cluster 2 represents TFs up-regulated during the earlier stage of development, suggesting a role in the initial genetic reprogramming steps. Cluster 3 represents TFs up-regulated during the later stage of ECM development. They are likely involved in ECM functioning and nutrient exchange. In poplar, despite the increased number of clusters, a similar expression profile was identified: the majority of TFs were either up- or down-regulated during the throughout the time course, while some TFs were specifically up-regulated during one stage of the ECM development (Figure 3).

We distinguished TFs preferentially up- or down-regulated at each point analyzed during the colonization process. In general, TFs significantly regulated in poplar ECM were also significantly regulated in developing Douglas fir ECM. Nevertheless, some TFs displayed expression patterns specific to either Poplar or Douglas fir ECM (Figures 3 and 4).

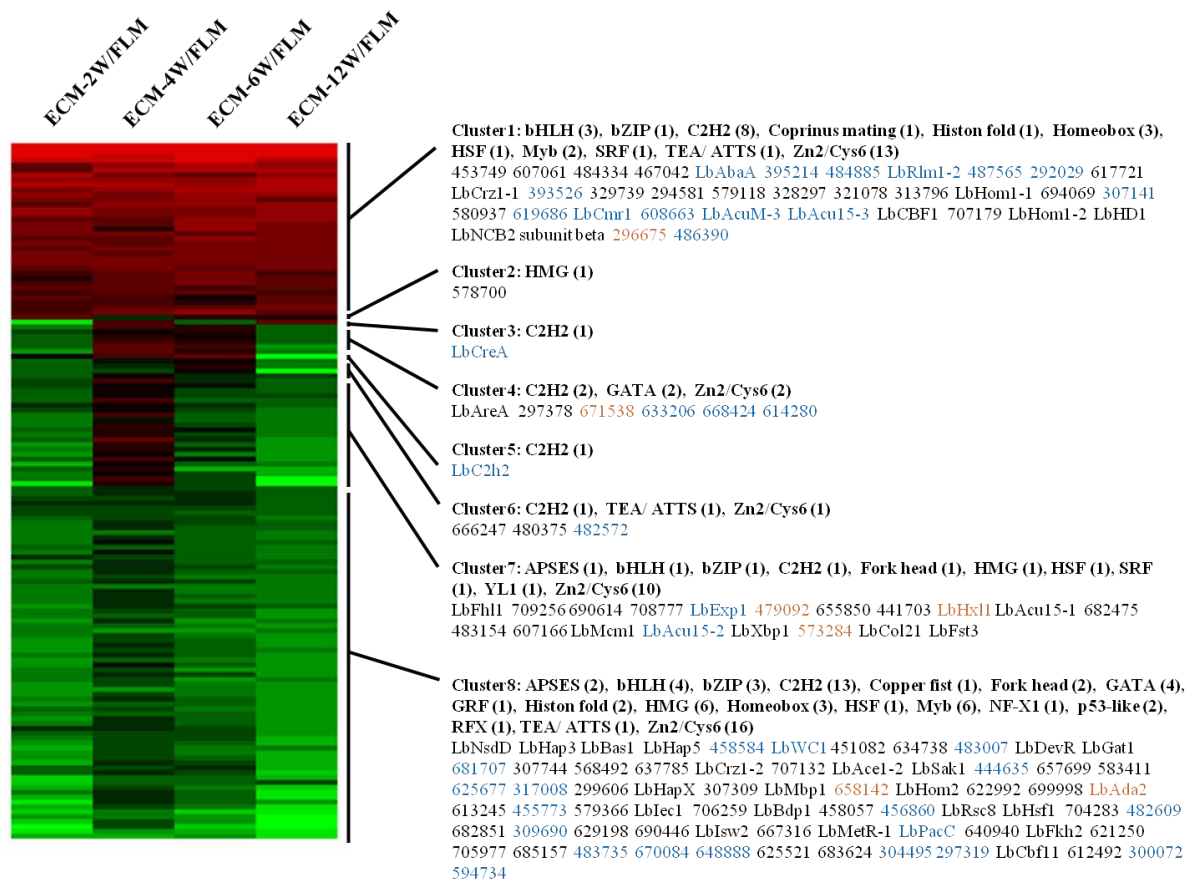


Figure 3 : Hierarchical clustering of microarray data of transcription factors significantly regulated more than 2.5x ($p\text{-value} \leq 0.05$) during the colonization of Poplar roots by *L. bicolor*. Red = TFs preferentially up-regulated during ECM development. Green = TFs preferentially down-regulated during ECM development. Black = TFs not regulated during ECM development. Blue = TFs common to Poplar and Douglas ECM and “similarly” regulated. Orange = TFs whose regulation is different in Poplar and Douglas ECM.

Among the TFs up-regulated early in Douglas fir ECM development, three had no homology with known TFs (Lb303095, Lb333101, Lb445505) and a further two had low similarities with known High Mobility Group (HMG, Lb658142, Lb481594) TFs (Figure 4, TableS1). One of the latter genes has been annotated as a Sox protein involved in eukaryotic cell development.

Analysis of the time course showed that most of TFs up-regulated during symbiosis encoded proteins belonging to the family of Zn2/Cys6 Zn cluster and C2H2 Zn finger. To assess whether it was dependent of the host and whether it was a specificity of ECM-forming fungi, we compared our results with transcriptomic data obtained with *T. melanosporum*. As shown in Figure 5, the proportion of up-regulated TFs (from 10% to 23%) compared to the total number of annotated TFs was depending on the host and the symbionts. Up-regulated TFs mainly belonged to the Zn2/Cys6 Zn cluster- and C2H2 Zn finger families (between 54% and 70%) (Figure5). Some of these TFs could have been recruited to specifically regulate ECM ontogenesis. However, differentially-expressed TFs were not exclusively Zn cluster and Zn finger TFs (Table 2).

Functional screening and validation of L. bicolor and poplar transcriptional activators in yeast

To functionally validate the predicted TFs, and to uncover potentially new transcriptional activators, our *in silico* analysis was coupled to the transcriptional activator trap (TAT) assay, a heterologous gene transactivation screen in yeast. To this end, three distinct, full length cDNA libraries were prepared from (i) a mixture of FLM and FB RNA (FLM/FB library), (ii) *L. bicolor*/*P. trichocarpa* ECM RNA (ECM library) and (iii) non-mycorrhizal *P. trichocarpa* root RNA (Root library). The RNA used as a template for each library was a mixture extracted from tissues at different life stages (FLM/FB library) and different stages of symbiosis development (ECM library). In this screen, each cDNA library was transferred into the pDEST32 yeast expression vector. Transformants bearing an in-frame fusion between the plasmid encoded GAL4-DBD and a *L. bicolor* or *P. trichocarpa* transcriptional activator domain were positively selected via reporter gene transactivation. About 1.7, 2, and 0.8 million colonies were screened for Laccaria FLM/FB, ECM, and Root library, respectively. A total of 596 sequences (196 from the FLM/FB library, 213 from the ECM library, and 187 from the Root library) activated the expression of the three reporter genes and were retained for further analysis.

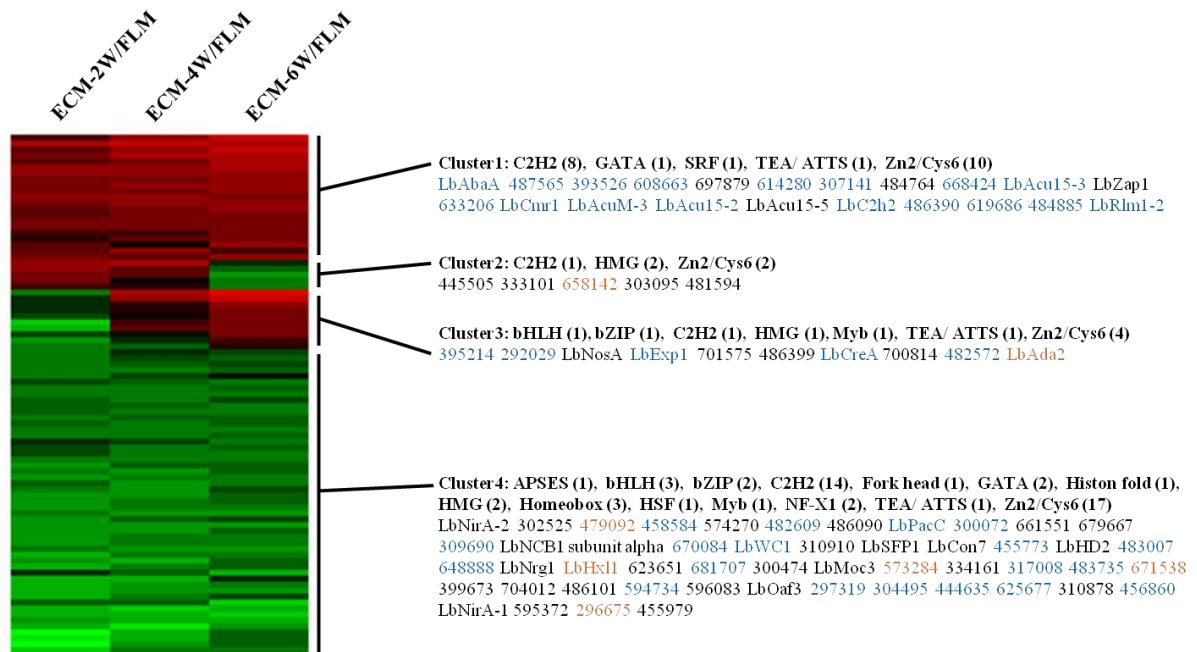


Figure 4 : Hierarchical clustering of microarray data of transcription factors significantly regulated more than 2.5x ($p\text{-value} \leq 0.05$) during the colonization of Douglas fir roots by *L. bicolor*. Red = TFs preferentially up-regulated during ECM development. Green = TFs preferentially down-regulated during ECM development. Black = TFs not regulated during ECM development. Blue = TFs common to Poplar and Douglas ECM and “similarly” regulated. Orange = TFs whose regulation is different in Poplar and Douglas ECM.

They were organized into 83 contigs and 137 singletons for a total of 220 unisequences (Figure 6). One hundred and forty unisequences were of plant origin: 61 of them contained a recognizable DBD and matched with *in silico* predicted TFs and five further sequences contained putative a nucleic acid binding domain. As expected, a number of positive clones retrieved from the TAT screen of the ECM library (a total of 80 unisequences) were plant proteins (Figure 6): 43 sequences showed a recognizable DBD and 32 of them shared a significant sequence similarity with plant transcriptional activators involved in plant–pathogen interactions (Figure 7) (Stracke et al., 2001; Shi & Shi, 2004; Olsen et al., 2005). Of the 80 unisequences from *L. bicolor*, 18 contained a recognizable DBD and matched with *in silico* predicted TFs and other 5 displayed a putative nucleic acid binding domain. The remaining 131 TAT-positive sequences lacked a recognizable DBD and were collectively designated as ‘unconventional transcriptional activators’ (see the section ‘Unconventional transcriptional activators’).

Among the functionally validated *L. bicolor* TFs, some displayed similarities with Prf1 (Lb482609, Lb640940, Lb648888) involved in pheromone signaling and filamentous growth in *Ustilago maydis* (Hartmann et al., 1996), Pcc1 (Lb386478), the regulator of both A and B developmental pathways in *Coprinopsis cinerea* (Brown and Casselton, 2001), Ste12 (Lb393192), a regulatory protein of *Cryptococcus neoformans* (Chang et al., 2004) and Yap1 (Lb665554), a regulator of oxidative stress tolerance in *Cochliobolus heterostrophus* (Lev et al., 2005) (Table 5). Proteins having weak similarities with Gcn4 (Lb293242), which controls amino acid biosynthetic genes in response to amino acid starvation in *Candida albicans* (Tripathi et al., 2002), AbaA (Lb298274), a regulatory protein of conidiophore development in *Aspergillus nidulans* (Andrianopoulos et al., 1994), Met31 (Lb633206), the regulator of the methionine biosynthetic genes and Rfg1 (Lb458057), controlling filamentous growth and virulence in *C. albicans* (Kadosh et al., 2001) were also identified (Table 4). This was accompanied by the identification of 61 *bona fide* plant TFs belonging mainly to the ERF, Myb, NAC, WRKY, Dof and EINL TFs families (Table 6).

Unconventional transcriptional activators

Besides the validation of some *in silico* identified *Laccaria* TFs, the TAT screen also allowed to identify 57 putative transcriptional activators which lack a recognizable DBD (Table 4).

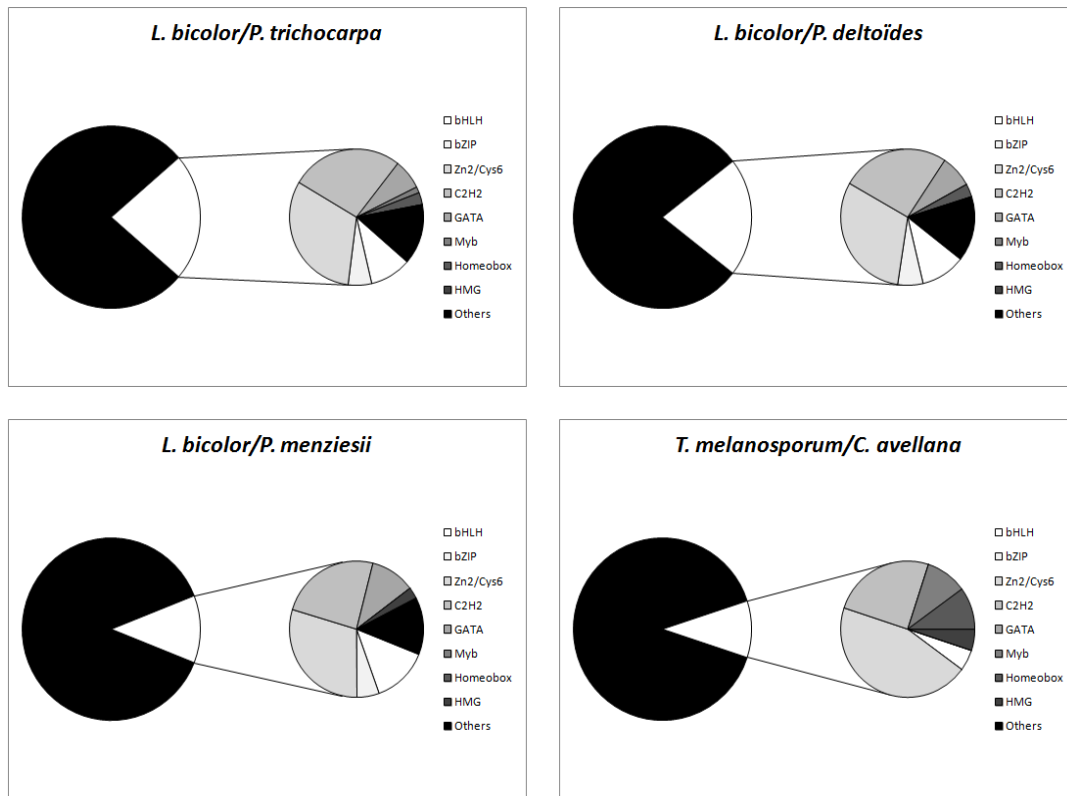


Figure 5: Distribution of the families of transcription factors regulated more than 2.5X with a $p\text{-value} \leq 0.05$ (Light blue) compared with the total number of TFs in the genome (Dark blue). Transcriptomic analyses were performed on ECM root tips from the association *L. bicolor/Populus trichocarpa*, *L. bicolor/Populus deltoïdes*, *L. bicolor/Pseudotsuga menziesii* and *Tuber melanosporum/Corylus avellana*.

Among them, nine sequences have similarities to proteins with nuclear or nuclear/cytoplasm localization, and for which a direct or indirect function in transcriptional regulation has been established: the endocytotic protein Ede1 -a moonlighting protein with a mixed nuclear/cytoplasmic localization- and its interactor Rsp5 -a putative ubiquitin protein ligase-, the 60S acidic ribosomal protein P1, and two kinases, plus pure-nuclear proteins: Rec8 and Rad21, components of the cohesin complex which is required for sister chromatid cohesion; Rad57, that is involved in recombinational repair of double-strand breaks in DNA during vegetative growth and meiosis; and Nop6, that has a role in the ribosome biogenesis.

Thirty-nine other proteins are predicted intracellular, not nuclear, proteins without a demonstrated role in transcription: enzymes, mitochondrial and peroxisomal proteins, plus 19 conserved hypothetical proteins. The remaining nine proteins identified in the TAT screen are *L. bicolor* secreted proteins, four of which contained a nuclear localization signal (NLS). We have named proteins belonging to this last group Secreted Transcriptional Activator Proteins (STAPs) (Table 7).

STAPs could play an important role in the instauration of symbiosis. Proteins Lb391051 and Lb659547 displayed one (Lb293293) and two (Lb487613 and Lb659555) paralogues respectively within the *L. bicolor* genome. No conserved domain was identified in STAPs, nevertheless, some STAPs contained a LL motif and/or a coiled coil region. Expression levels of the STAPs was high in ECM root tips (Table 7).

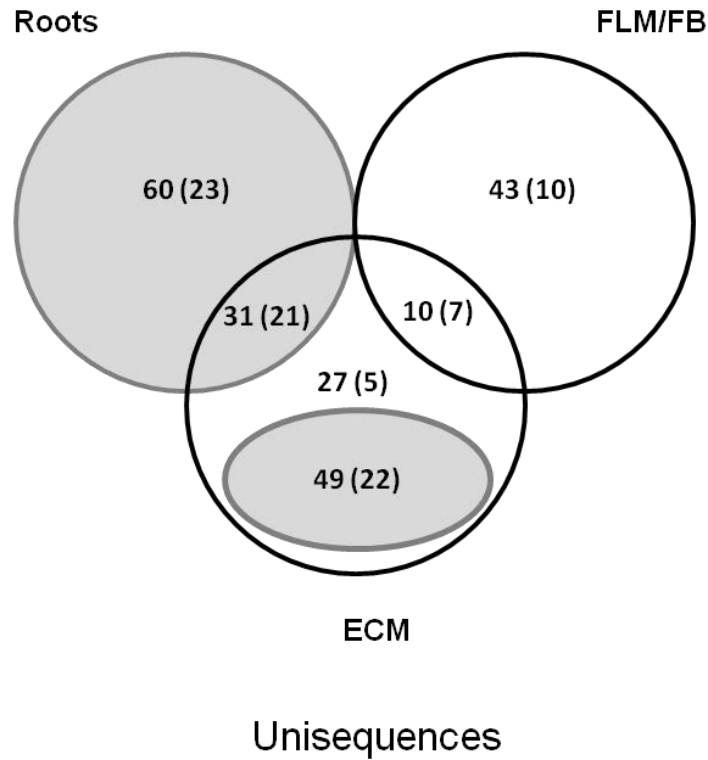


Figure 6: Venn diagram representation of the number of unisequences isolated from the transcriptional activator trap (TAT) screening of the free-living mycelium/fruitletting body (FLM/FB), roots and ectomycorrhiza (ECM) libraries. The number of DNA-binding domain (DBD)-containing clones are shown between brackets. Sequences of plant origin retrieved from the screening of the Roots and ECM library are shown on a gray background.

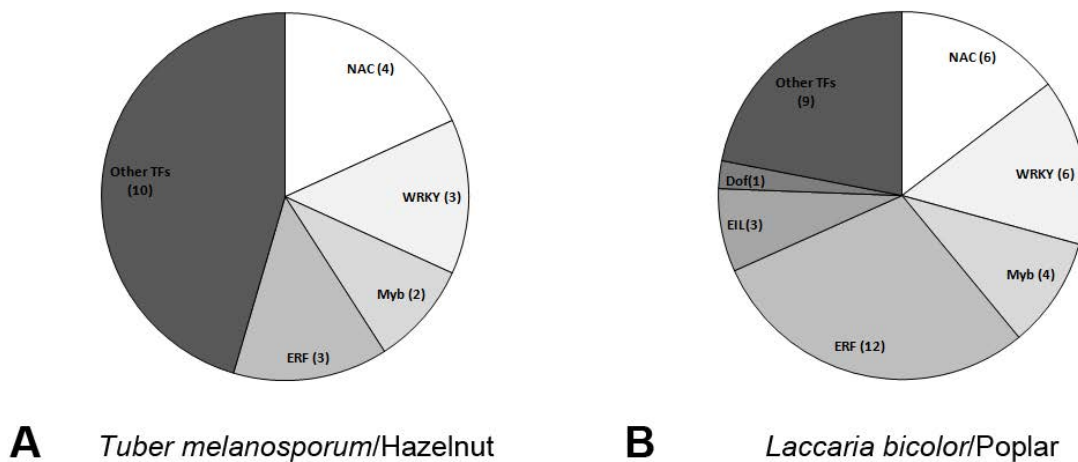


Figure 7: Comparison between *Tuber melanosporum* (A) and *Laccaria bicolor* (B) for the DNA-binding domain (DBD)-containing transcription factors (TFs) of the plant mycorrhizal partner retrieved from the transcriptional activator trap (TAT) screening of the ectomycorrhiza (ECM) library. TFs known to be involved in plant-microbe interactions pathogen defense (Stracke *et al.*, 2001; Shi & Shi, 2004; Olsen *et al.*, 2005) are emphasized.

Discussion

In the present study, 301 genes coding for putative TFs were identified in the genome of the ectomycorrhizal basidiomycete *L. bicolor* and their expression in FLM, ECM and FB was characterized.

Amongst the mechanisms involved in the ectomycorrhizal symbiosis development, the differentiation of the symbiotic interface comprising cell wall polysaccharides from the colonizing hyphae and the host plant apoplastic space is crucial (Duddridge and Read, 1984c; Nylund 1987). In addition, the regulation of enzymes involved in cell wall remodeling is likely tightly controlled. In *L. bicolor*, two TFs displaying similarities with ACE1, a repressor of the expression of plant cell wall degrading enzymes, were identified (Lb247901, E-value= 1^E-59 and Lb622364, E-value= 4^E-38 ; Table S1). The ACE1 homologue, Lb247901, is up-regulated in ECM (Ratio ECM/FLM = 2.7; Table S2). The only TF displaying a low similarity with the *XlnR* gene (Lb593632, E-value= 3^E-10 ; Table S1), an activator of plant cell wall-degrading enzymes, belonged to the twenty most highly repressed genes (Ratio ECM/FLM = 0.02; Table 2 and Table S2). In contrast, *T. melanosporum* has two TFs similar to *XlnR* which are both highly up-regulated in ECM (Ratio ECM/FLM > 10) (Montanini et al, 2011). In addition, there are striking differences in the arsenal of secreted degradative enzymes (tyrosinases, lipases and laccases) expressed by the two symbionts upon symbiosis development, suggesting that *T. melanosporum* is more aggressive towards its host-plant than *L. bicolor* (Martin et al, 2010).

During the ectomycorrhizal development, transcriptomic studies have shown that plant defense reactions occur upon early contact with the fungus and then, are repressed at later stages of the fungal colonization (Duplessis et al, 2005; Le Queré et al, 2005; Sebastiana et al, 2009). This contrasts with pathogenic interactions, where defense reactions are continuously triggered. These responses include the generation of reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion (O_2^-) and hydroxyl radicals (OH^-). ROS production during root colonization by ECM fungi probably depends on the compatibility of the symbiotic partners involved (Gafur et al., 2004). Baptista et al. (2007) and Duplessis et al. (2005) showed that induction of genes involved in ROS production are observed during ECM formation.

Interestingly, two of the most highly up-regulated TFs in *L. bicolor* ECM displayed similarities with RlmA (Lb293207, E-value= 5^E-15 and Lb302141, E-value= 5^E-17 ; Table S1), a TF known to be involved in maintaining cell wall integrity in response to stress (Ratio ECM/FLM = 79 and 114, respectively; Table 2 and Table S2). These RlmA-like TFs could be involved in protecting fungal cell walls against ROS damages or in the fungal cell wall remodeling that take place during formation of the interfacial matrix. In *T. melanosporum*, TmelRlmA and TmelMrgA, another TF involved in maintaining cell wall integrity, are highly expressed but not regulated in ECM which can suggest post-translational regulation or difference of basal resistance to oxidative stress between these two ECM fungi (Montanini et al, 2010).

In ECM plant, up to 30% of the photosynthesis products are transferred to the fungal partner in colonized root tips. The present analysis showed that ECM development in *L. bicolor* is associated with the up-regulation of a set of TFs displaying similarities with regulators of carbon metabolism (Table 1 and Table S2). This is in accordance with previous studies performed on *Paxillus involutus-Betula pendula* and *Pisolithus microcarpus-Eucalyptus globulus* (Johansson et al, 2004; Duplessis et al, 2005; Le Queré et al, 2005; Wright et al, 2005). Interestingly, one of the most highly up-regulated genes in *L. bicolor* ECM displayed similarities with Rgm1 (Lb708164, E-value= 1^E-22 ; Table S1), a TF involved in monosaccharide catabolism and aldehyde metabolism (Ratio ECM/FLM=509; Table 2 and Table S2). Therefore this TF could be a master regulator of monosaccharide assimilation and storage in *L. bicolor*, essential to the establishment and the maintenance of carbon fluxes in ECM. Such data differ from *T. melanosporum* where carbon metabolism is mainly up-regulated during FB development (Montanini et al, 2011).

Nitrogen metabolism also plays an important role in ECM and FB development. However, two of the positive regulator of nitrogen assimilation orthologues are repressed in *L. bicolor* ECMs (Lb312485, E-value= 9^E-32 and Lb325474, E-value= 6^E-23 ; Table S1, Table 2 and Table S2). Among TFs up-regulated in ECM, one displayed low similarities with Gcn4 (Lb293242, E-value= 6^E-8 ; Table S1), a transcriptional activator of amino acid biosynthetic genes in response to amino acid starvation (Ratio ECM/FLM=8 ; Table S2). Its ability to activate transcription was corroborated by TAT assay (Table 5). Therefore, Gcn4-like TF may be a master regulator of nitrogen fluxes and nutrition in ECM. Mansouri-Bauly et al. (2006) showed that *L. bicolor* increases sulfate supply to the plant by extended sulfate uptake.

This is in agreement with our expression data showing a strong up-regulation of TF involved in sulfur metabolism in *L. bicolor* ECM and FB. TFs displaying similarities with CBF1 (Lb706529, 9^E-30 ; Table S1) and MetR (Lb490310, 3^E-16 ; Table S1) were among the most highly up-regulated in ECM (Ratio ECM/FLM=53 and 19 respectively ; Table 2 and Table S2). Such data contrast with *T. melanosporum* where sulfur metabolism is mainly regulated in FBs (Martin et al, 2010, Montanini et al, 2011). Interestingly, among the twenty most highly up-regulated TFs, one displayed similarities with URBS1 (Lb709764, E-value= 7^E-39 ; Table S1), a TF involved in siderophore biosynthesis (Ratio ECM/FLM=786 ; Table 2 and Table S2). Therefore, co-regulation of sulfur metabolism and iron uptake may be involved in sustaining respiration which is particularly important during ECM development.

Among TFs from *L. bicolor* displaying similarities with TFs involved in FB development, some are up-regulated in both FB and ECM while others are only regulated in ECM (Table S1 and Table S2). These data suggest that these TFs are involved in general processes required for both ECM and FB development such as hyphal aggregation. Furthermore, previous studies have shown that TFs are not always involved in only one process and can play different roles. That is why their involvement in ECM formation is not to be excluded and will be interesting to study. Interestingly, many of the most highly up-regulated TFs in FBs were also up-regulated in ECM (Table 3). Contrasting with *L. bicolor*, among all TFs regulating sexual development identified in *T. melanosporum*, none are found differentially up-regulated more than two fold in truffles (Montanini et al, 2011).

To corroborate the *in silico* TFs predictions, we used the yeast assay based on the activation of transcription of reporter genes. This method was already used for the ectomycorrhizal fungus *T. melanosporum* (Montanini et al., 2011) and for yeast (Titz et al, 2006). The TAT screen allowed the functional validation of only 6% of the *in silico* predicted TFs and the *de novo* identification of two DBD-containing transcription activators (Lb457991 and Lb700637) which were set apart in the *in silico* analysis (Table 5). This proportion is significantly lower than in *T. melanosporum* (20%; Montanini et al., 2011) and yeast (40%, Titz et al., 2006). This could be explained by the lack of specific regulatory elements in the TFs sequences of the taxonomically divergent *L. bicolor* (Titz et al, 2006). TFs with a confirmed transcriptional activity were generally highly expressed in the FLM, ECM or FBs. Increasing the number of clones tested may allowed the identification of additional TFs. In addition to fungal TFs, the TAT screen allowed the functional validation of 61 *in silico* predicted TFs from poplar (Table 6).

Many of them belonged to the ERF, Myb, NAC, WRKY or EINL families of plant TFs. Some of their members are known to be involved in defense reactions during plant-microbe interactions (Stracke et al., 2001; Shi and Shi, 2004; Olsen et al., 2005). In addition, transcript profiling showed that these poplar TFs were up-regulated in ECM (data not shown), suggesting that poplar root tips reacted to fungal colonization by the mutualistic symbiont (Fig. 7). Therefore, TFs exclusively retrieved in the ECM cDNA library, could play an important role in the symbiotic development and allow us to better understand the interaction between the two partners.

The TAT screening allowed the isolation of protein without a DNA binding site. Among these we isolated the endocytotic protein Ede1, homologous to the human protein Eps15. Eps15 is a moonlighting protein with a mixed nuclear/cytoplasmic localization: in the cytoplasm it is involved in intracellular trafficking, while in the nucleus has been demonstrated to have a role as transcriptional activator (Van Bergen En Henegouwen, 2009). Interestingly in this screening we also found Rsp5, homologue to the human ubiquitin-protein ligase Nedd4, which was found to interact with and to ubiquitinate Eps15. The Nedd4 gene, indeed, encodes a NLS and also ubiquitinates other nuclear proteins, such as Rpb1, the largest subunit of RNA polymerase II (Cholbinski et al, 2011). Remarkably, both Ede1 and Nedd4 were also identified as unconventional activators in *T. melanosporum* (Montanini et al, 2011). One ribosomal protein, the 60S acidic ribosomal protein P1, was also identified in this screening. Ribosomal proteins, indeed, have been demonstrated to possess extra-ribosomal activities, and they can also directly control gene-specific transcription (Lindström et al, 2009; Bhavsar et al, 2010). In *Schizosaccharomyces pombe* some ribosomal proteins are present at many transcription sites, their recruitment is selective, and generally associated with tRNA genes loci (De et al, 2011). Similar results have been obtained in *S. cerevisiae*, where some ribosomal proteins exert a positive modulatory effect on the RNA Polymerase III-dependent expression of tRNA and 5S rRNA genes (Dieci et al, 2009). Another protein, the kinase Ime2, in *S. cerevisiae* is involved in meiosis and has a role in activating the transcription factor Ndt80, whereas in the filamentous fungus *Neurospora crassa* Ime2 genetically interacts with the transcription factor Vib1 and plays a role in cell death during heterokaryon incompatibility (Sopko et al, 2002; Hutchison et al, 2012).

However within this group of proteins it is possible that we isolated false positive clones (i.e. cytoplasmic proteins that function as transcriptional activator when artificially forced into the nucleus by vector-borne NLS), but also candidate moonlighting protein.

In fact there are an increasing number of protein that could have multiple and different role in more than one cellular compartment. There are experimental evidence in eukaryotes that a metabolic enzyme have a role in regulation of gene-specific transcription (Hall et al, 2004) and a kinase can directly bind DNA and act as a transcriptional repressor (Hu et al, 2009).

Of great interest are the Secreted Transcriptional Activator Proteins (STAPs) with a nuclear localization signal we identified, because they could play an important role in the instauration of symbiosis. STAPs are reminiscent of the TAL (Transcription activator-like) effectors which are proteins secreted by pathogenic *Xanthomonas* via their type III secretion system during plant infection (Szurek *et al.*, 2001 ; Heuer *et al.*, 2007). Such nucleus targeted proteins bind promoter sequences in host plants and activate expression of genes to promote bacterial development. However, *L. bicolor* STAPs lack the DNA binding domains found in bacterial TAL effectors, suggesting that STAPs may interact with another protein activating the transcription of targeted genes. In particular Lb659547, isolated in 8 TAT independent positive clones, contained a LL motif, that suggests a translocation by endocytosis (Bonifacino et al, 2003), and a coiled coil region, that may be involved in protein-protein interaction (Wang et al, 2012). Upon ectomycorrhiza development, *L. bicolor* induces a large set of mycorrhiza-induced small secreted proteins (MiSSPs) (Martin et al., 2008). Recently, Plett et al. (2011) have demonstrated that the most symbiosis-upregulated secreted effector MiSSP7 is required for the establishment of mutualism, being secreted by the fungus, imported through endocytosis into the plant cells and it is targeted to the plant nucleus where it alters the transcriptome of the plant cell (Plett et al, 2011). Similarly, the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* secretes SP7 protein, that is able to enter the plant cell and localize in the cell nucleus where it interacts with the pathogenesis-related transcription factor ERF19 attenuating immune defense responses in plant (Kloppholz et al, 2011). Indeed, the expression levels of the STAPs was high in ECM root tips (Table 7). No orthologues of STAPs were indentified in other mycorrhizal and non-mycorrhizal fungi except for *L. amethystina* (<http://genome.jgi-psf.org/Lacam1/Lacam1.home.html>) which is phylogenetically close to *L. bicolor*. These data suggest that STAPs are clade-specific and that they play a role in the interaction between ECM fungi and their host plants.

In agreement with the dramatic genetic reprogramming taking place during symbiosis development (Duplessis et al., 2005; Le Queré et al., 2005; Deveau et al., 2008; Larsen et al., 2011), the present study identified a large number of *L. bicolor* TFs highly regulated during ECM and FB development.

However, the most highly regulated TFs in ECM and FBs have no homology, or very low similarities, with known TFs and their function remain elusive (Table 2, Table 3, Table S2). Large scale RNA silencing of these differentially-expressed TFs (Kemppainen et al., 2009) is underway to characterize their function in symbiosis.

Conclusions

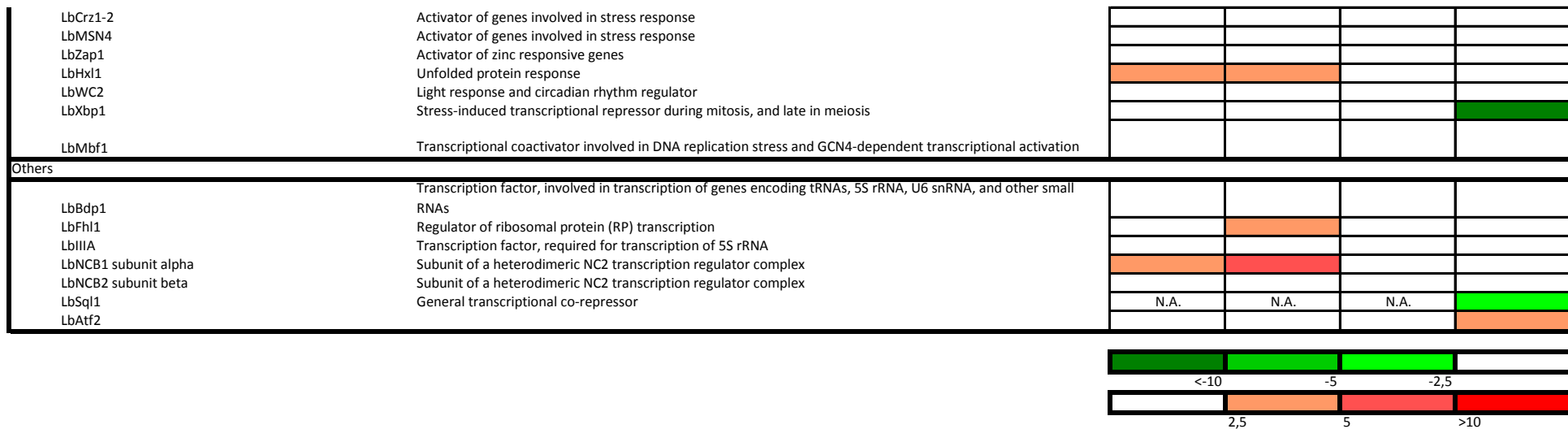
The TAT screening also allowed the isolation of protein without a DNA binding site. These components, especially those without a prior record of nuclear localization and activity, represent a significant outcome of this work. Although a relatively high rate of false-positives may be expected due to the presence of a vector-borne NLS, the occurrence of moonlighting proteins capable of functioning both in the cytoplasm and in the nucleus is in line with recent findings in yeast and other organisms. This points to the existence of an as yet largely unexplored set of “hard to predict” transcriptional regulators, as the new class of NLS-bearing, secreted proteins, so-called STAPs (Tables 5 and 7). STAPs were not up-regulated during ECM development and their constitutive high expression may reflect a role in controlling competing rhizospheric microbes. Therefore, STAPs could be a new class of effectors secreted by *L. bicolor* to control the host plant gene expression during ECM development.

Tables:

Table 1: DNA-binding domain (DBD)-containing *Laccaria bicolor* transcription factors. In bold are indicated TFs retrieved from the transcriptional activator trap screen. N.A.=data Non Available.

Functional classes and gene names ^a	Putative gene product function ^b	ratio P.tricho ECM/FLM	ratio P. delto ECM/FLM	ratio Douglas fir ECM/FLM	ratio FB/FLM
Cell wall					
LbXInR	Activator of plant cell wall-degrading enzymes				
LbACE-1	Repressor of plant cell wall-degrading enzymes				
LbACE-2	Repressor of plant cell wall-degrading enzymes				
LbRIm1-1	Maintenance of cell wall integrity				
LbRIm1-2	Maintenance of cell wall integrity				
Development					
Sexual development and fruiting body formation					
LbSte12α	Regulator of fruiting body development	N.A.	N.A.	N.A.	
LbMcm1	Regulator of pheromone response				
LbNosA	Number of sexual spores, regulator of sexual development				
LbHD1	Mating-type protein				
LbHD2	Mating-type protein				
LbHom1-1	Regulator of fruiting body development; Involved in mushroom tissue formation				
LbHom1-2	Regulator of fruiting body development; Involved in mushroom tissue formation				
LbHom2	Regulator of fruiting body development; Regulation of the formation of the auto-inhibitor and of dikaryon-specific hydrophobins				
LbC2h2	Regulator of fruiting body development; Involved in primordia formation				
LbFst3	Negative regulator of fruiting body development; Inhibits the formation of clusters of mushrooms				
LbNsdD	Regulator of sexual development				
LbExp1	Regulator of the final phase of fruiting-body morphogenesis				
LbFst4	Positive regulator of fruiting body development; Involves in the switch between the vegetative and the reproductive phase and in aggregate formation				
LbBri1	Regulator of fruiting body development; Regulation of the formation of the auto-inhibitor and of dikaryon-specific hydrophobins				
LbGat1	Regulator of fruiting body development; Involved in mushroom tissue formation				N.A.
LbISW2	Subunit of ATP-dependent Isw2p-Itc1p chromatin remodeling complex required for repression of a-specific genes, early meiotic genes during mitotic growth, and INO1				
LbItc1	Subunit of ATP-dependent Isw2p-Itc1p chromatin remodeling complex required for repression of a-specific genes, early meiotic genes during mitotic growth, and INO1				
LbPcc1	Regulator of sexual development	N.A.	N.A.	N.A.	
LbPriB	Primordia formation, Regulator of sexual development				
LbSnf5	Regulator of sexual development				
LbCDC5	Regulator of sexual development				
LbMoc3	Regulator of sexual development, ascus formation, and stress response				
LbPrf1	Regulator of pheromone signalling, filamentous growth and pathogenic development				
LbRum1	Repressor for genes regulated by the b mating type locus, involved in spore development				
Asexual development and basal hyphal growth					
LbCol21	Colonial, regulator of hyphal growth				
LbDevR	Required for conidiophore development				
LbAbaA	Regulator of conidiation				
LbCon7	Cell morphology regulator				
LbReb1	Regulator of growth				
LbRsc8	Component of the RSC chromatin remodeling complex essential for viability and mitotic growth				
LbSnt2	Regulator of conidiation, hyphal growth and septation				
Others					
LbADA2	All development altered, regulator of basal hyphal growth and asexual and sexual development				
Cell cycle					

LbSwi6	MBF complex, regulator of cell cycle				
LbMbp1	MBF complex, regulator of cell cycle				
LbFkh2	Regulator of cell cycle				
LbSak1	Positive regulator of cyclic AMP-dependent protein kinase-mediated exit from the mitotic cell cycle				
LbCbf11	Regulator of cell adhesion and cell and nuclear division				
LbSFP1	Regulator of ribosomal protein, biogenesis genes, response to nutrients, stress and DNA-damage, G2/M transitions during mitotic cell cycle and cell size				
Metabolism					
Carbon					
LbCreA	Major carbon catabolite repression protein				
LbNrg1	Carbon catabolite repression				
LbAcu15-1	Activates transcription of genes required for acetate utilization				
LbAcu15-2	Activates transcription of genes required for acetate utilization				
LbAcu15-3	Activates transcription of genes required for acetate utilization				
LbAcu15-4	Activates transcription of genes required for acetate utilization				
LbAcu15-5	Activates transcription of genes required for acetate utilization	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
LbAcuk	Positive regulator of gluconeogenesis				
LbAcuM-1	Positive regulator of gluconeogenesis				
LbAcuM-2	Positive regulator of gluconeogenesis	N.A.	N.A.	N.A.	
LbAcuM-3	Positive regulator of gluconeogenesis				N.A.
LbRgm1	Positive regulator of monosaccharide catabolism and aldehyde metabolism			N.A.	
LbCmr1	Regulator of melanin biosynthesis				
LbTrm2	Regulator of methanol-inducible gene expression				
Nitrogen					
LbAreA	Major, positively acting, nitrogen regulatory protein				
LbNirA-1	Pathway specific, positively acting nitrate regulatory protein				
LbNirA-2	Pathway specific, positively acting nitrate regulatory protein				
LbNirA-3	Pathway specific, positively acting nitrate regulatory protein				
LbNirA-4	Pathway specific, positively acting nitrate regulatory protein				
LbGcn4	Positive regulator of the transcriptional response to amino acid starvation				
LbBAS1	Transcription factor, involved in regulating basal and induced expression of genes of the purine and histidine biosynthesis pathways; also involved in regulation of meiotic recombination at specific genes				
Sulfur					
LbCBF1	Activator of sulfur metabolism; centromere binding protein				
LbMetR-1	Activator of sulfur metabolism				
LbMetR-2	Activator of sulfur metabolism				
Lipid					
LbOaf3	Negative regulator of fatty acid metabolism				
Others					
LbHap2	CCAAT binding complex, subunit B				
LbHap3	CCAAT binding complex, subunit C				
LbHap5	CCAAT binding complex, subunit E				
LbHapX	CCAAT binding complex, subunit X; iron-responsive factor				
LbUrbs1	Negative Regulator of siderophore biosynthesis genes				
LbSfu1	Negative Regulator of Iron Uptake				
Lblec1	Subunit of the Ino80 complex, involved in nucleotide metabolism and phosphate metabolism				
Stress and stimuli response					
LbAsg1	Regulator of stress response and drug resistance	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
LbHsf1	Heat shock transcription factor				
LbYap1	Regulator of oxidative stress tolerance				
LbSkn7	Response to osmotic and oxidative stress	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
LbPacC	Activator of alkaline-induced genes; repressor of acid-induced genes				
LbCrz1-1	Activator of genes involved in stress response				



^a*L. bicolor* DNA binding domain-containing transcription factors were grouped into major functional classes based on homology with functionally characterized TFs from other fungi; gene names were derived from those of the corresponding homologs (see Supporting Information Table S1 for further sequence information).

^bSpecific putative function of *L. bicolor* TFs as deduced from the known function of their characterized homologs.

Table 2: Top 20 genes most highly up- and down-regulated in 3 month old greenhouse ECM roots of *P. trichocarpa* as compared to FLM gene expression. Fold change in gene expression of ECM roots of *P. deltoides* and Douglas fir were also shown. Genes were considered to be significantly regulated if $p < 0.05$. In bold are indicated TFs retrieved from the transcriptional activator trap screen.

Protein ID version1	Protein ID version2	TF name	Family	BlastP description	BlastP E.value	Species	FLM	ratio <i>P. tricho</i> ECM/FLM	P value <i>P. tricho</i> ECM/FLM	ratio <i>P. delto</i> ECM/FLM	P value <i>P. delto</i> ECM/FLM	ratio Douglas fir ECM/FLM	P value Douglas fir ECM/FLM
302892	614278		GATA	NsdD	2,00E-12	Aspergillus fumiga	2	1031,1	0,002	897,5	0,002	59,5	0,020
170124	709764	LbURBS1	GATA	Urbs1	7,00E-39	Ustilago maydis	1	785,8	0,001	1446,8	0,001	4,9	0,714
333777	708164	LbRgm1	C2H2	Rgm1	1,00E-22	Saccharomyces ce	1	509,2	0,002	797,4	0,000	1,0	1,000
293207	293207	LbRlm1-1	MAD-box	Mig1	5,00E-15	Magnaporthe gris	34	114,1	0,016	96,0	0,016	7,3	0,155
298274	298274	LbAbaA	TEA/ATTS	AbaA	1,00E-09	Aspergillus nidula	232	104,6	0,004	87,7	0,003	73,0	0,015
302141	302141	LbRlm1-2	MAD-box	RlmA	5,00E-17	Aspergillus nidular	99	78,7	0,001	70,5	0,000	19,2	0,006
325649	687441		bHLH	Hypothetical prote	3,00E-61	Agaricus bisporus	8	58,5	0,019	43,3	0,023	13,9	1,000
318917	706529	LbCBF1	bHLH	CBF1	9,00E-30	Candida albicans	93	53,5	0,001	58,0	0,000	3,6	0,014
324602	487565		C2H2	predicted protein	1,00E-07	Laccaria bicolor S2	44	43,8	0,012	29,0	0,002	55,1	0,012
321078	321078		Homeobox	hypothetical prote	3,00E-82	Agaricus bisporus	34	40,2	0,001	35,1	0,001	0,3	0,233
301563	301563		C2H2	SteA	1,00E-14	Aspergillus nidular	93	34,8	0,009	44,4	0,008	2,8	1,000
301339	700814		bHLH	hypothetical prote	2,00E-98	Coprinopsis cinere	957	32,6	0,001	22,3	0,001	10,0	0,007
294399	663232		bHLH	hypothetical prote	2,00E-77	Fomitopsis pinicol	257	31,5	0,005	40,1	0,003	14,1	0,021
334646	619686		C2H2	Hypothetical prote	1,00E-81	Agaricus bisporus	244	24,7	0,006	32,4	0,003	1,6	0,284
321741	467042		C2H2	predicted protein	1,00E-12	Laccaria bicolor S2	61	20,0	0,123	31,2	0,057	53,5	0,061
150048	607061		HSF	HSF1	2,00E-25	Saccharomyces ce	24	19,7	0,072	30,4	0,052	4,1	1,000
301720	490310	LbMetR-2	bZIP	MetR	3,00E-16	Aspergillus nidular	199	19,3	0,005	14,1	0,003	2,3	0,107
296988	668161	LbNosA	Zn2Cys6	NosA	2,00E-17	Aspergillus nidular	2318	18,9	0,001	16,6	0,001	20,0	0,005
150072	150072	LbCrz1-1	C2H2	Crz1	3,00E-40	Cryptococcus neo	60	18,4	0,094	21,5	0,074	5,3	0,260
299004	704012		C2H2	Rst2	3,00E-05	Schizosaccharomy	1605	16,7	0,001	12,3	0,001	4,9	0,057
303137	444686		Zn2Cys6	predicted protein	0,0	Laccaria bicolor S2	3015	0,0	0,000	0,0	0,000	0,0	0,096
334157	595757		Zn2Cys6	WD40-containing	6,00E-41	Laccaria bicolor S2	361	0,0	0,013	0,0	0,013	0,1	0,052
294677	444635		C2H2	hypothetical prote	3,00E-10	Coprinopsis cinere	44595	0,0	0,002	0,0	0,004	0,0	0,004
300503	593632	LbXlnR	Zn2Cys6	XlnR	3,00E-10	Aspergillus aculea	453	0,0	0,031	0,0	0,001	0,1	0,017
333101	333101		Zn2Cys6	predicted protein	2,00E-107	Laccaria bicolor S2	1170	0,0	0,018	0,2	0,024	0,1	0,052
303095	303095		Zn2Cys6	predicted protein	4,00E-174	Laccaria bicolor S2	4748	0,0	0,002	0,1	0,057	0,0	0,008
334368	445505		C2H2		5132		5132	0,0	0,004	0,0	0,002	0,0	0,061
294333	658142		HMG	MAT1-2-1	3,00E-07	Penicillium marne	25770	0,0	0,003	0,0	0,004	0,1	0,020
292045	292045	LbCon7	C2H2	Con7	8,00E-30	Magnaporthe gris	4615	0,1	0,002	0,1	0,009	0,1	0,251
306314	643886		C2H2	predicted protein	2,00E-68	Laccaria bicolor S2	14062	0,1	0,010	0,1	0,002	0,2	0,034
191754	709955	LbMbp1	APSES	Res2	4,00E-103	Schizosaccharomy	7576	0,1	0,008	0,1	0,018	0,4	0,037
299937	579366		Zn2Cys6	predicted protein	0,0	Laccaria bicolor S2	13313	0,1	0,021	0,2	0,024	0,0	0,005
168843	387518	LbWC1		Photoreceptor A	1,00E-151	Lentinula edodes	9639,39	0,1	0,012	0,1	0,010	0,2	0,012
311512	311512		C2H2	hypothetical prote	3,00E-44	Coprinopsis cinere	16309	0,1	0,001	0,2	0,002	0,3	0,038
317073	317073	LbNirA-3	Zn2Cys6	Nit-4	3,00E-31	Neurospora crassa	3307	0,1	0,003	0,1	0,001	0,5	0,283
328804	661551		Zn2Cys6		383		383	0,1	0,189	0,2	0,103	0,3	0,032
311738	481594		HMG	Rox1	1,00E-09	Saccharomyces ce	9965	0,2	0,008	0,1	0,002	0,2	0,057
301157	301157	LbNirA-1	Zn2Cys6	NirA	2,00E-30	Emericella nidular	4651	0,2	0,050	0,1	0,004	0,1	0,020
310878	310878		C2H2	Con1	4,00E-05	Magnaporthe gris	349	0,2	0,196	0,1	0,166	0,2	0,004
334161	334161		C2H2	predicted protein	0,0	Laccaria bicolor S2	1284	0,2	0,060	0,1	0,014	0,7	0,571

Table 3: Top 20 genes most highly up- and down-regulated in FB of *L. bicolor* as compared to FLM gene expression. Fold change in gene expression of ECM roots of *P. trichocarpa* were also shown. Genes were considered to be significantly regulated if $p < 0.05$. In bold are indicated TFs retrieved from the transcriptional activator trap screen.

Protein ID version1	Protein ID version2	TF name	Family	BlastP description	BlastP E.value	Species	FLM	ratio FB/FLM	P value FB/FLM	ratio <i>P. tricho</i> ECM/FLM	P value <i>P. tricho</i> ECM/FLM	
302141	302141	LbRim1-2	MAD-box	RlmA	5,00E-17	Aspergillus nidulans		18	61,4	0,010	81,0	0,000
295376	393526		Zn2Cys6	Acu-15	2,00E-07	Neurospora crassa		353	23,0	0,000	33,6	0,000
299831	580937		Zn2Cys6	predicted protein	3,00E-54	Laccaria bicolor S23		119	19,8	0,000	2,1	0,190
298274	298274	LbAbaA	TEA/ATTS	AbaA	1,00E-09	Aspergillus nidulans		1332	11,6	0,000	25,2	0,000
301339	700814		bHLH	hypothetical protein	2,00E-98	Coprinopsis cinerea		1233	11,3	0,000	13,8	0,000
294399	663232		bHLH	hypothetical protein	2,00E-77	Fomitopsis pinicola F		581	11,2	0,000	3,6	0,000
327759	486390		Zn2Cys6	predicted protein	8,00E-60	Laccaria bicolor S23		1087	10,4	0,000	9,2	0,000
313151	484764		C2H2	FibC	7,00E-11	Aspergillus nidulans		1660	10,1	0,000	2,4	0,200
168394	483117	LbMedA-2		MedA	2,00E-44	Aspergillus nidulans		716	9,4	0,000	6,8	0,000
292029	292029		Zn2Cys6	hypothetical protein	0.0	Coprinopsis cinerea		2304	8,1	0,000	12,9	0,000
307141	307141		Zn2Cys6	Acu-15	1,00E-28	Neurospora crassa		739	7,6	0,000	7,2	0,000
299924	701575		Zn2Cys6	Fst4	5,00E-62	Schizophyllum com		3207	7,1	0,000	7,5	0,000
296988	668161	LbNosA	Zn2Cys6	NosA	2,00E-17	Aspergillus nidulans		2928	6,8	0,000	17,5	0,000
307309	307309		Zn2Cys6	Fst3	1,00E-125	Schizophyllum com		3556	6,8	0,000	5,0	0,000
298403	486399		Zn2Cys6	CtnR	5,00E-12	Monascus purpureu		353	6,4	0,000	6,3	0,000
302769	697312		Zn2Cys6	Fst4	2,00E-83	Schizophyllum com		3694	6,2	0,000	6,2	0,000
299004	704012		C2H2	Rst2	3,00E-05	Schizosaccharomyce		1063	5,7	0,000	3,7	0,000
294995	705820		C2H2	predicted protein	2,00E-168	Laccaria bicolor S23		1407	5,0	0,000	3,5	0,000
301720	490310	LbMetR-2	bZIP	MetR	3,00E-16	Aspergillus nidulans		247	4,5	0,000	4,6	0,090
301873	705977		C2H2	predicted protein	2,00E-168	Laccaria bicolor S23		1481	4,4	0,000	4,2	0,000
312467	640940		HMG	Prf1	2,00E-20	Ustilago maydis		8819	0,0	0,000	0,1	0,000
294677	444635		C2H2	hypothetical protein	3,00E-10	Coprinopsis cinerea		16740	0,0	0,000	0,1	0,000
332342	399673		Homeobox	hypothetical protein	1,00E-78	Coprinopsis cinerea		4406	0,0	0,000	0,5	0,040
305525	486945		Forkhead	Fkh2	3,00E-12	Schizosaccharomyce		7782	0,1	0,000	0,2	0,000
294333	658142		HMG	MAT1-2-1	3,00E-07	Penicillium marneffe		24306	0,1	0,000	0,1	0,000
299086	442607	LbXbp1	APSES	Xbp1	8,00E-13	Saccharomyces cere		13139	0,1	0,000	1,2	0,600
169971	458057		HMG	Rfg1	1,00E-08	Candida albicans		40807	0,1	0,000	0,8	0,080
315220	315220	LbAcu15-2	Zn2Cys6	Acu-15	5,00E-39	Neurospora crassa		5248	0,1	0,000	0,5	0,020
292045	292045	LbCon7	C2H2	Con7	8,00E-30	Magnaporthe grisea		6046	0,1	0,000	0,1	0,000
311512	311512		C2H2	hypothetical protein	3,00E-44	Coprinopsis cinerea		20320	0,1	0,000	0,2	0,000
317073	317073	LbNirA-3	Zn2Cys6	Nit-4	3,00E-31	Neurospora crassa		7928	0,1	0,000	0,2	0,000
311738	481594		HMG	Rox1	1,00E-09	Saccharomyces cere		10045	0,1	0,000	0,1	0,000
298964	482609		HMG	Prf1	3,00E-20	Ustilago maydis		19778	0,1	0,000	0,4	0,000
296675	296675		Myb	Bas1	4,00E-13	Saccharomyces cere		2720	0,2	0,000	0,4	0,020
166037	694007	LbSwi6	APSES	Swi6	4,00E-96	Magnaporthe oryzae		10560	0,2	0,000	0,3	0,000
296536	621250		C2H2	Prz1	2,00E-12	Schizosaccharomyce		10073	0,2	0,000	1,8	0,030
191754	709955	LbMbp1	APSES	Res2	4,00E-103	Schizosaccharomyce		9028	0,2	0,000	0,3	0,000
334368	445505		C2H2					4253	0,2	0,000	0,1	0,000
310368	595372		Zn2Cys6	hypothetical protein	2,00E-174	Moniliophthora rore		2525	0,2	0,000	1,4	0,210
310368	595386		Zn2Cys6	hypothetical protein	0.0	Moniliophthora rore		2525	0,2	0,000	1,4	0,210

Table 4: Top 20 genes most highly expressed but not regulated in ECM of *L. bicolor*. In bold are indicated TFs retrieved from the transcriptional activator trap screen.

Protein ID version1	Protein ID version2	Family	BlastP Description	BlastP E.value	Species	FLM	ratio <i>P. tricho</i> ECM/FLM	P value <i>P. tricho</i> ECM/FLM	ratio <i>P. delto</i> ECM/FLM	P value <i>P. delto</i> ECM/FLM	ratio Douglas fir ECM/FLM	P value Douglas fir ECM/FLM
301245	655850	bHLH	hypothetical protein CC1G_00475	6,00E-116	<i>Coprinopsis cinerea</i>	29732	1,7	0,012	1,6	0,003	1,6	0,028
319718	636228	HLH type 3	Mbf1p	9,00E-44	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25887	1,9	0,002	2,0	0,000	1,2	0,314
301763	699998	C2H2	Rst2	2,00E-09	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	26587	1,6	0,004	1,6	0,003	1,5	0,012
313869	476130	bZIP	Cys-3	2,00E-18	<i>Neurospora crassa</i>	42392	0,9	0,654	0,9	0,320	1,1	0,804
324193	451082	C2H2	Met32	1,00E-07	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21735	1,8	0,022	1,5	0,070	0,8	0,304
308109	637785	Zn2Cys6	hypothetical protein SCHCODRAFT_233850	1,00E-46	<i>Schizophyllum commune</i>	14549	2,4	0,003	2,3	0,003	1,2	0,537
296378	707132	bZIP	hypothetical protein SERLA73DRAFT_159500	2,00E-137	<i>Serpula lacrymans</i>	35363	0,9	0,846	0,9	0,824	1,1	0,855
293031	459853	Histon fold	Hap2	1,00E-30	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19902	1,6	0,029	1,7	0,002	1,4	0,024
169971	458057	HMG	Rfg1	1,00E-08	<i>Candida albicans</i>	51526	0,6	0,010	0,6	0,018	0,9	0,703
301549	479092	C2H2	Rpn4	2,00E-07	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16503	1,7	0,015	1,6	0,007	2,0	0,036
292149	654679	Zn2Cys6	Acu-15	2,00E-41	<i>Neurospora crassa</i>	21947	1,3	0,141	1,0	0,979	1,1	0,683
296989	629646	Zn2Cys6	car80	9,00E-10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11150	2,2	0,012	2,2	0,005	2,2	0,077
291812	681707	C2H2	hypothetical protein CC1G_00609	2,00E-104	<i>Coprinopsis cinerea</i>	24346	1,0	0,819	1,1	0,192	0,9	0,721
227966	667316	GATA	Gzf3	9,00E-13	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10667	2,1	0,008	2,0	0,026	1,4	0,810
291829	681767	C2H2	Msn4	1,00E-15	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12137	1,8	0,011	2,1	0,008	1,3	0,233
301023	666027	Homeobox	hypothetical protein CC1G_01752	7,00E-60	<i>Coprinopsis cinerea</i>	19345	1,1	0,244	1,1	0,068	1,1	0,933
190760	190760	Myb	Rsc8	6,00E-97	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15546	1,3	0,151	1,3	0,069	0,6	0,069
150219	476882	Forkhead	Fkh2	6,00E-19	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9510	2,2	0,005	2,2	0,019	1,0	1,000
311799	481652	RFX	Sak1	1,00E-20	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	35027	0,6	0,011	0,6	0,010	1,0	1,000
313784	636734	C2H2	Crz1	3,00E-40	<i>Cryptococcus neoformans</i>	10653	1,9	0,012	1,9	0,005	1,9	0,046

Table 5: List of DNA binding domain containing or lacking proteins from *L. bicolor* retrieved from the transcriptional activator trap screen.

Proteins with binding domain to nucleic acids											
Clone ID	Protein ID	Total	FLM	ECM	BlastP results			Conserved domains (IPR)		Description	
					Acc number	Description	Organism	Score	e-value		
Transcription factors (specific DNA binding domain)											
Contig05	293242	69	59	10	BAC55240.1	C-Gcn4	Candida maltosa	55,5	6,00E-08	IPR011616	bZIP
ECM-L2_G03	298274	1	0	1	XP_658026.1	regulatory protein abaA	Aspergillus nidulans	59,7	1,00E-09	IPR000818	TEA/ATTS
ECM-L1_F11	307744	1	0	1	EGN92622.1	hypothetical protein SERLA73DRAFT_172732	Serpula lacrymans	797	0.0	IPR014778	Myb
Contig62	386478	7	7	0	XP_001830477.1	PCC1	Coprinopsis cinerea	122	2,00E-30	IPR000910	HMG1/HMG2
Contig41	393192	3	3	0	AAC01955.1	STE12alpha	Cryptococcus neoformans	225	1,00E-60	IPR013087	C2H2
ECM-L1_A03	457991	1	0	1	XP_002910064.1	NWD2	Coprinopsis cinerea	234	2,00E-61	IPR000253	Forkhead
Contig40	458057	16	15	1	AAK15315.1	Rfg1	Candida albicans	65.9	1,00E-08	IPR000910	HMG1/HMG2
Contig65	481652	4	3	1	NP_594086.1	Sak1	Schizosaccharomyces pombe	95.5	1,00E-20	IPR003150	RFX
FLM-L2_D07	482609	1	1	0	AAC32736.1	Prf1	Ustilago maydis	93.6	3,00E-20	IPR000910	HMG1/HMG2
FLM-L2_D05	486090	1	1	0	NP_009349.3	Oaf1	Saccharomyces cerevisiae	50.8	1,00E-06	IPR001138	Zn2Cys6
Contig46	628355	2	1	1	XP_003034563.1	Fst4	Schizophyllum commune	236	6,00E-66	IPR007219	Transcription factor, fungi
FLM-L2_A08	633206	1	1	0	NP_015287.1	Met31	Saccharomyces cerevisiae	46.6	2,00E-06	IPR013087	C2H2
Contig43	640940	4	3	1	AAC32736.1	Prf1	Ustilago maydis	93.2	2,00E-20	IPR000910	HMG1/HMG2
Contig38	648888	9	6	3	AAC32736.1	Prf1	Ustilago maydis	88.2	2,00E-18	IPR000910	HMG1/HMG2
ECM-L1_H01	656449	1	0	1	XP_001833298.1	hypothetical protein CC1G_04277	Coprinopsis cinerea	434	5,00E-145	IPR000818	TEA/ATTS
Contig75	665554	2	2	0	AAS64313.1	Chap1	Cochliobolus heterostrophus	92.8	5,00E-17	IPR011616	bZIP
Contig07	682475	2	2	0	XP_963640.2	Vad-5	Neurospora crassa	88.6	4,00E-18	IPR001138	Zn2Cys6
Contig42	700637	21	16	5	EGO20236.1	hypothetical protein	Serpula lacrymans	564	0	IPR000433	ZZ Zinc finger
Protein with aspecific nucleic acid binding domain											
Contig39	585018	2	2	0	XP_001836279.2	hypothetical protein	Coprinopsis cinerea	439	3,00E-129	IPR001606	ARID/BRIGHT DNA-binding domain
Contig45	699941	2	2	0	XP_001828564.2	hypothetical protein	Coprinopsis cinerea	697	0	IPR019787	Zinc finger, PHD-finger
FLM-L1_B12	640654	1	1	0	XP_003507462.1	hypothetical protein	Coprinopsis cinerea	202	7,00E-51	IPR018957	Zinc finger, C3HC4 RING-type
ECM-L1_E11	705628	1	0	1	XP_002172787.1	cps3	Schizosaccharomyces japonicus	95,5	1,00E-17	IPR000571	Zinc finger, CCCH-type
Proteins without DBDs											
Clone ID	Protein ID	Total	FLM	ECM	BlastP results			Conserved domains (IPR)		Description	
					Acc number	Description	Organism	Score	e-value		
Nuclear proteins and unconventional activators											
ECM-L2_D08	468224	1	0	1	XP_001828858.2	Rad21 protein	Coprinopsis cinerea	475	2,00E-158	IPR006909	Rad21/Rec8-like protein, C-terminal, eukaryotic
FLM-L2_D02	700143	1	1	0	XP_001828708.2	CMGC/RCK/MAK protein kinase	Coprinopsis cinerea	1117	0	IPR017442	Serine/threonine-protein kinase-like domain
FLM-L2_F09	610588	1	1	0	BAG24499.1	rad57	Coprinopsis cinerea	424	7,00E-143	IPR013632	DNA recombination and repair protein Rad51, C-terminal
Contig72	636246	2	0	2	CCA72600.1	related to EDE1 protein involved in endocytosis	Piriformospora indica	572	1,00E-179	IPR000449	Ubiquitin-associated/translation elongation factor EF1B, N-terminal
ECM-L1_B01	698517	1	0	1	XP_002472728.1	60S acidic ribosomal protein P1	Postia placenta	125	7,00E-36	IPR001813	Ribosomal protein 60S
ECM-L2_D05	685195	1	0	1	NP_595780.1	ribosome biogenesis protein Nop6	Schizosaccharomyces pombe	83,6	3,00E-14		
ECM-L2_E05	626440	1	0	1	NP_587684.1	hypothetical protein	Coprinopsis cinerea	337	3,00E-103	IPR019350	RNA polymerase I-specific transcription initiation factor RRN6-like

Putative unconventional activators with intracellular localization

Contig70	459401	3	0	3	XP_001833620.2	ubiquitin-protein ligase	Coprinopsis cinerea	1461	0	IPR000008	C2 calcium-dependent membrane targeting
Contig03	190404	3	0	3	XP_001880663.1	aspartic peptidase A1	Laccaria bicolor	944	0	IPR001461	Peptidase A1
FLM-L3_C01	299583	1	1	0	XP_001836340.2	TKL/TKL-ccin protein kinase	Coprinopsis cinerea	327	6,00E-95	IPR017442	Serine/threonine-protein kinase-like domain
ECM-L3_B06	324430	1	0	1	XP_001877591.1	copper transporter	Laccaria bicolor	1432	0	IPR007274	Ctr copper transporter
ECM-L3_A03	327303	1	0	1	XP_001274183.1	mitochondrial GTPase (YlqF)	Aspergillus clavatus	130	7,00E-32	IPR023179	GTP-binding protein, orthogonal bundle domain
Contig01	444552	4	4	0	XP_001835217.1	peroxin19	Coprinopsis cinerea	279	6,00E-89	IPR006708	Pex19 protein
ECM-L3_D03	521043	1	0	1	CCA67049.1	related to PDR16-involved in lipid biosynthes	Piriformospora indica	330	7,00E-111	IPR001251	Cellular retinaldehyde-binding/triple function, C-terminal
Contig09	583617	8	8	0	CCA71746.1	related to proteophosphoglycan ppg4	Piriformospora indica	106	2,00E-20		
ECM-L2_F10	608638	1	0	1	XP_001831367.1	gamma-adaptin	Coprinopsis cinerea	1390	0	IPR002553	Clathrin/coatomer adaptor, adaptin-like, N-terminal
FLM-L2_E09	671307	1	1	0	XP_001830051.1	peroxisomal targeting signal 1 receptor	Coprinopsis cinerea	771	0	IPR001440	Tetratricopeptide TPR-1
FLM-L2_D03	695354	1	1	0	XP_001840019.1	mitochondrial carrier protein	Coprinopsis cinerea	476	1,00E-169	IPR018108	Mitochondrial substrate/solute carrier
ECM-L2_E11	703237	1	0	1	XP_002911229.1	rho GDP-dissociation inhibitor	Coprinopsis cinerea	330	6,00E-114	IPR000406	RHO protein GDP dissociation inhibitor
FLM-L2_A07	707485	1	1	0	XP_002910841.1	guanine nucleotide exchange factor Vps9	Coprinopsis cinerea	937	0	IPR003123	Vacuolar sorting protein 9
FLM-L1_F07	192523	1	1	0	XP_001877048.1	tubulin alpha	Laccaria bicolor	932	0	IPR003008	Tubulin/FtsZ, GTPase domain
Contig36	294384	5	5	0	XP_568826.1	tubulin binding protein	Cryptococcus neoformans	286	5,00E-75		
Contig27	451329	2	0	2	CCA68518.1	related to 40S ribosomal protein	Piriformospora indica	444	9,00E-134	IPR000938	Cytoskeleton-associated protein, Gly-rich domain
Contig10	509577	2	1	1	XP_001882083.1	predicted protein	Laccaria bicolor	2773	0		
FLM-L2_F03	656382	1	1	0	XP_001875331.1	predicted protein	Laccaria bicolor	600	0		
ECM-L1_B05	311818	1	0	1	XP_003037815.1	hypothetical protein SCHCODRAFT_102409	Schizophyllum commune	55,6	5,00E-06		
FLM-L2_F11	321043	1	1	0	XP_001829416.1	hypothetical protein CC1G_00595	Coprinopsis cinerea	480	4,00E-156		
ECM-L2_D01	325350	1	0	1	P_001837732.1	hypothetical protein CC1G_06938	Coprinopsis cinerea	151	4,00E-34		
FLM-L2_H02	390988	1	1	0	XP_001841219.1	hypothetical protein CC1G_11382	Coprinopsis cinerea	72,8	2,00E-13		
FLM-L1_C04	439929	1	1	0	EGO18585.1	hypothetical protein	Serpula lacrymans	228	7,00E-63		
Contig32	459061	3	0	3	XP_003026161.1	hypothetical protein	Schizophyllum commune	61.6	7,00E-07		
FLM-L3_F02	546684	1	1	0	EGO29111.1	hypothetical protein	Serpula lacrymans	174	3,00E-50		
Contig54	549772	5	4	1	XP_001833470.2	hypothetical protein CC1G_05170	Coprinopsis cinerea	410	1,00E-123		
Contig76	576504	5	5	0	XP_001828840.2	hypothetical protein	Coprinopsis cinerea	210	8,00E-59		
Contig37	604174	2	2	0	XP_001834463.1	hypothetical protein CC1G_02199	Coprinopsis cinerea	541	3,00E-169		
FLM-L1_G10	634434	1	1	0	XP_001831375.1	hypothetical protein CC1G_00922	Coprinopsis cinerea	373	4,00E-117		
FLM-L2_E07	686252	1	1	0	XP_001836432.2	hypothetical protein CC1G_07079	Coprinopsis cinerea	258	1,00E-71		
ECM-L1_B02	693899	1	0	1	EGO22612.1	hypothetical protein	Serpula lacrymans	336	1,00E-105		
FLM-L1_E04	708222	1	1	0	XP_003036324.1	expressed protein	Schizophyllum commune	87	3,00E-15		
Contig68	708574	2	0	2	XP_001833764.1	hypothetical protein	Coprinopsis cinerea	330	5,00E-104		
Contig24	613652	2	2	0	XP_001830379.1	hypothetical protein	Coprinopsis cinerea	180	2,00E-43		
Contig78	680010	5	5	0	XP_002476516.1	predicted protein	Postia placenta	114	2,00E-24		
Secreted protein											
FLM-L2_D04	243371	1	1	0	XP_002912138.1	aconitate hydratase	Coprinopsis cinerea	1244	0	IPR000573	Aconitase A/isopropylmalate dehydratase small subunit, swivel
FLM-L2_B06	300643	1	1	0	CCA73543.1	related to meiotic recombination protein rec8	Piriformospora indica	122	1,00E-26	IPR006910	Rad21/Rec8-like protein, N-terminal
ECM-L1_H02	394934	1	0	1	ZP_01463678.1	sphingolipid ceramide N-deacylase	Stigmatella aurantiaca	62,4	2,00E-08		
ECM-L3_B04	622202	1	0	1	XP_001828856.1	hypothetical protein CC1G_03650	Coprinopsis cinerea	662	0.0		
Contig44	643792	3	3	0	XP_001836617.1	hypothetical protein CC1G_06204	Coprinopsis cinerea	414	3,00E-128		
FLM-L2_H04	656953	1	1	0	XP_001837070.1	vacuole protein	Coprinopsis cinerea	579	0		
FLM-L3_H05	658920	1	1	0	XP_001830283.1	hypothetical protein CC1G_01919	Coprinopsis cinerea	124	6,00E-30		

FLM-L2_G08	660445	1	1	0	XP_001835021.1	hypothetical protein CC1G_09912	Coprinopsis cinerea	221	1,00E-69	IPR018499	Tetraspanin
FLM-L1_G04	688063	1	1	0	XP_001835466.2	hypothetical protein CC1G_05428	Coprinopsis cinerea	160	2,00E-42		
ECM-L3_C02	688275	1	0	1	XP_001835642.2	hypothetical protein CC1G_03424	Coprinopsis cinerea	118	5,00E-27	IPR016021	MIF4-like, type 1/2/3
Contig58	693322	4	0	4	XP_001830639.2	hypothetical protein CC1G_06905	Coprinopsis cinerea	1292	0	IPR003864	Domain of unknown function DUF221
Secreted proteins with nuclear localization signal											
FLM-L1_A04	304792	1	1	0	XP_001840014.1	hypothetical protein CC1G_10398	Coprinopsis cinerea	60,1	9,00E-08		
FLM-L1_F01	391051	1	1	0	XP_001840014.1	hypothetical protein	Coprinopsis cinerea	60,5	2,00E-07		
FLM-L1_D07	455116	1	1	0	XP_001884865.1	predicted protein	Laccaria bicolor	664	0		
Contig64	659547	8	7	1	AAD01986.1	ras related protein	Laccaria bicolor	200	2,00E-61		
FLM-L2_E08	659644	1	1	0	XP_001839900.1	elongation factor 3	Coprinopsis cinerea	1819	0	IPR015688	Elongation Factor 3

Table 6: List of DNA binding domain containing or lacking proteins from *P. trichocarpa* retrieved from the transcriptional activator trap screen.

Proteins with DBD											
Clone ID	Protein ID	Total	ECM	ROOT	BlastP results			Conserved domains (IPR)		Description	
					Acc number	Description	Organism	Score	e-value		
<i>Transcription factors (specific DNA binding domain)</i>											
Contig04	EEE79228.1	23	10	13	XP_002304249.1	AP2/ERF domain-containing transcription factor	Populus trichocarpa	780	0	IPR001471	Pathogenesis-related transcriptional factor/ERF, DNA-binding
Contig06	EEE98009.1	4	1	3	ACV92010.1	WRKY transcription factor 8	Populus tomentosa	502	4,00E-180	IPR003657	DNA-binding WRKY
Contig08	EEE84254.1	3	1	2	XP_002518861.1	transcription factor, putative	Ricinus communis	1397	0	IPR003035	Plant regulator RWP-RK
Contig11	EEE76957.1	46	17	29	XP_002328610.1	type-b response regulator	Populus trichocarpa	1390	0	IPR014778	Myb, DNA-binding
Contig14	ABK95942.1	3	0	3	XP_003632476.1	homeobox-leucine zipper protein	Vitis vinifera	429	5,00E-149	IPR001356	Homeobox
Contig15	EEE86796.1	2	2	0	XP_002312841.1	ethylene-insensitive 3a	Populus trichocarpa	1316	0	IPR023278	Ethylene insensitive 3-like protein, DNA-binding domain
Contig16	EEF07892.1	2	1	1	AAS00054.1	CONSTANS-like protein CO1	Populus deltoides	700	0	IPR000315	Zinc finger, B-box
Contig18	EEE86158.1	2	2	0	XP_002524697.1	r2r3-myb transcription factor	Ricinus communis	426	3,00E-147	IPR014778	Myb, DNA-binding
Contig19	EEF06004.1	3	3	0	ACF77118.1	CBF4a	Populus hopeiensis	464	1,00E-165	IPR001471	Pathogenesis-related transcriptional factor/ERF, DNA-binding
Contig20	EEE80315.1	2	2	0	XP_002301042.1	AP2/ERF domain-containing transcription factor	Populus trichocarpa	669	0	IPR001471	Pathogenesis-related transcriptional factor/ERF, DNA-binding
Contig22	EEE91138.1	2	2	0	XP_002310688.1	NAC domain protein	Populus trichocarpa	640	0	IPR003441	No apical meristem (NAM) protein
Contig25	EEF10469.1	12	7	5	XP_002331217.1	AP2/ERF domain-containing transcription factor	Populus trichocarpa	774	0	IPR001471	Pathogenesis-related transcriptional factor/ERF, DNA-binding
Contig26	EEE87407.1	6	3	3	XP_002531120.1	r2r3-myb transcription factor	Ricinus communis	372	9,00E-130	IPR014778	Myb, DNA-binding
Contig28	EEE88823.1	4	2	2	XP_002311456.1	AP2/ERF domain-containing transcription factor	Populus trichocarpa	640	0	IPR001471	Pathogenesis-related transcriptional factor/ERF, DNA-binding
Contig29	EEF01509.1	3	3	0	XP_002315338.1	NAC domain protein	Populus trichocarpa	1137	0	IPR003441	No apical meristem (NAM) protein
Contig30	EEF01571.1	2	2	0	XP_002315400.1	ethylene-insensitive 3c	Populus trichocarpa	1263	0	IPR023278	Ethylene insensitive 3-like protein, DNA-binding domain
Contig31	EEE94191.1	3	3	0	XP_002307195.1	NAC domain protein	Populus trichocarpa	639	0	IPR003441	No apical meristem (NAM) protein
Contig34	EEE95079.1	2	2	0	XP_002319156.1	AP2/ERF domain-containing transcription factor	Populus trichocarpa	562	0	IPR001471	Pathogenesis-related transcriptional factor/ERF, DNA-binding
Contig35	EEE82872.1	5	3	2	XP_002298067.1	AP2/ERF domain-containing transcription factor	Populus trichocarpa	473	1,00E-169	IPR001471	Pathogenesis-related transcriptional factor/ERF, DNA-binding
Contig47	EEE93727.1	7	2	5	XP_002306731.1	NAC domain protein	Populus trichocarpa	1192	0	IPR003441	No apical meristem (NAM) protein
Contig48	EEE98473.1	2	1	1	XP_002511920.1	WRKY transcription factor	Ricinus communis	398	6,00E-137	IPR003657	DNA-binding WRKY
Contig49	EEF03501.1	8	3	5	ADW65758.1	CONSTANS-like protein	Gossypium hirsutum	467	7,00E-164	IPR000315	Zinc finger, B-box
Contig51	EEE81423.1	3	1	2	XP_002302150.1	NAC domain protein	Populus trichocarpa	1276	0	IPR003441	No apical meristem (NAM) protein

Contig55	ABO48363.1	4	2	2	XP_002318846.1	AP2/ERF domain-containing transcription factor	Populus trichocarpa	395	3,00E-139	IPR001471	Pathogenesis-related transcriptional factor/ERF, DNA-binding
Contig56	EEE90737.1	2	0	2	ADL36694.1	GATA domain class transcription factor	Malus x domestica	308	2,00E-101	IPR000679	Zinc finger, GATA-type
Contig57	EEF05436.1	11	6	5	XP_002528697.1	WRKY transcription factor	Ricinus communis	300	1,00E-98	IPR003657	DNA-binding WRKY
Contig61	ABK96202.1	4	1	3	XP_002266803.1	transcription factor VIP1-like	Vitis vinifera	390	2,00E-133	IPR011700	Basic leucine zipper
Contig63	EEE86241.1	3	1	2	ACV92010.1	WRKY transcription factor 8	Populus tomentosa	438	9,00E-155	IPR003657	DNA-binding WRKY
Contig66	EEE88259.1	2	0	2	XP_002274709.1	RING finger and CHY zinc finger domain-containing protein	Vitis vinifera	483	9,00E-172	IPR008913	Zinc finger, CHY-type
Contig67	EEF02378.1	10	1	9	BAG15872.1	transcription factor	Bruguiera gymnorhiza	880	0	IPR000571	Zinc finger, CCCH-type
Contig69	EEE91024.1	2	1	1	XP_002310574.1	AP2/ERF domain-containing transcription factor	Populus trichocarpa	775	0	IPR001471	Pathogenesis-related transcriptional factor/ERF, DNA-binding
Contig73	EEF02542.1	2	1	1	XP_002534043.1	GATA transcription factor	Ricinus communis	434	1,00E-150	IPR000679	Zinc finger, GATA-type
Contig74	EEE79528.1	2	1	1	XP_003525349.1	probable WRKY transcription factor	Glycine max	402	6,00E-138	IPR003657	DNA-binding WRKY
Contig79	EEE89104.1	2	0	2	XP_002515013.1	r2r3-myb transcription factor	Ricinus communis	233	1,00E-77	IPR014778	Myb, DNA-binding
Contig80	EEE91291.1	2	0	2	XP_002533810.1	nuclear receptor binding set domain containing protein 1, nsd	Ricinus communis	1258	0	IPR003121	SWIB/MDM2 domain
Contig81	EEF03056.1	2	0	2	XP_002533687.1	zinc finger protein	Ricinus communis	471	2,00E-164	IPR000315	Zinc finger, B-box
Contig82	EEE75252.1	2	2	0	NP_566998.1	Forkhead-associated (FHA) domain	Arabidopsis thaliana	215	1,00E-59	IPR000253	Forkhead-associated (FHA) domain
ECM-L1_A05	EEE89350.1	1	1	0	XP_002311983.1	NAC domain protein	Populus trichocarpa	1177	0	IPR003441	No apical meristem (NAM) protein
ECM-L1_C02	EEF05376.1	1	1	0	XP_002323615.1	AP2/ERF domain-containing transcription factor	Populus trichocarpa	972	0	IPR001471	Pathogenesis-related transcriptional factor/ERF, DNA-binding
ECM-L1_D10	EEF05234.1	1	1	0	XP_002519505.1	DNA binding protein	Ricinus communis	983	0	IPR014778	Myb, DNA-binding
ECM-L1_E05	EEE85331.1	1	1	0	XP_002300526.1	AP2/ERF domain-containing transcription factor	Populus trichocarpa	699	0	IPR001471	Pathogenesis-related transcriptional factor/ERF, DNA-binding
ECM-L1_E09	EEE73663.1	1	1	0	XP_002326913.1	f-box family protein	Populus trichocarpa	537	0	IPR003851	Zinc finger, Dof-type
ECM-L2_B02	EEE95882.1	1	1	0	XP_003544908.1	probable WRKY transcription factor	Glycine max	707	0	IPR003657	DNA-binding WRKY
ECM-L2_C12	EEE91967.1	1	1	0	XP_002308444.1	transcription factor E2F	Populus trichocarpa	875	0	IPR011991	Winged helix-turn-helix transcription repressor DNA-binding
ECM-L2_F01	EEE94487.1	1	1	0	XP_002266803.1	transcription factor VIP1-like	Vitis vinifera	332	1,00E-110	IPR011700	Basic leucine zipper
ECM-L3_B05	EEE73492.1	1	1	0	XP_002332559.1	AP2/ERF domain-containing transcription factor	Populus trichocarpa	707	0	IPR001471	Pathogenesis-related transcriptional factor/ERF, DNA-binding
ECM-L3_G04	EEE75978.1	1	1	0	XP_002328098.1	ethylene-insensitive 3b	Populus trichocarpa	1293	0	IPR023278	Ethylene insensitive 3-like protein, DNA-binding domain
ROOT-L1_A03	EEE90395.1	1	0	1	XP_002309945.1	NAC domain protein	Populus trichocarpa	638	0	IPR003441	No apical meristem (NAM) protein
ROOT-L1_C05	EEE75174.1	1	0	1	NP_201474.1	C2H2-like zinc finger protein	Arabidopsis thaliana	518	0	IPR013087	Zinc finger, C2H2-type/integrase, DNA-binding
ROOT-L1_E05	EEE89658.1	1	0	1	XP_002512054.1	LIGULELESS1 protein, putative	Ricinus communis	239	5,00E-74	IPR004333	Transcription factor, SBP-box
ROOT-L1_G09	EEF04673.1	1	0	1	XP_003535147.1	transcription factor GAMYB-like	Glycine max	347	7,00E-117	IPR014778	Myb, DNA-binding
ROOT-L2_A07	EEE84988.1	1	0	1	XP_003593218.1	Methyl binding domain protein	Medicago truncatula	479	6,00E-155	IPR016177	DNA-binding, integrase-type
ROOT-L2_C07	EEF07237.1	1	0	1	XP_002334238.1	AP2/ERF domain-containing transcription factor	Populus trichocarpa	559	0	IPR001471	Pathogenesis-related transcriptional factor/ERF, DNA-binding
ROOT-L2_C09	EEE94386.1	1	0	1	XP_002307390.1	AP2/ERF domain-containing transcription factor	Populus trichocarpa	514	0	IPR001471	Pathogenesis-related transcriptional factor/ERF, DNA-binding

ROOT-L2_D09	EEE80763.1	1	0	1	XP_002301490.1	AP2/ERF domain-containing transcription factor	Populus trichocarpa	692	0	IPR001471	Pathogenesis-related transcriptional factor/ERF, DNA-binding
ROOT-L2_E07	EEE93218.1	1	0	1	ADW65758.1	CONSTANS-like protein	Gossypium hirsutum	473	5,00E-166	IPR000315	Zinc finger, B-box
ROOT-L2_E11	EEE87189.1	1	0	1	XP_002313234.1	GRAS family transcription factor	Populus trichocarpa	1113	0	IPR005202	Transcription factor GRAS
ROOT-L2_H05	EEE87556.1	1	0	1	XP_002313601.1	NAC domain protein, IPR003441	Populus trichocarpa	647	0	IPR003441	No apical meristem (NAM) protein
ROOT-L3_B12	EEE84260.1	1	0	1	XP_003604938.1	Auxin response factor	Medicago truncatula	776	0	IPR015300	DNA-binding pseudobarrel domain
ROOT-L3_E12	EEE89594.1	1	0	1	AAV85474.1	myb family transcription factor-related protein	Populus tomentosa	598	0	IPR014778	Myb, DNA-binding
ROOT-L3_G11	EEE97067.1	1	0	1	XP_002318847.1	AP2/ERF domain-containing transcription factor	Populus trichocarpa	558	0	IPR001471	Pathogenesis-related transcriptional factor/ERF, DNA-binding
Protein with aspecific nucleic acid binding domain											
ECM-L1_E02	EEE87990.1	1	1	0	XP_002279202.2	zinc finger CCCH domain-containing protein	Vitis vinifera	1000	0		
ECM-L2_F03	EEE96778.1	1	1	0	XP_002511999.1	RNA binding protein	Ricinus communis	1238	0	IPR000061	SWAP/Surp
ROOT-L2_D04	EEF07685.1	1	0	1	XP_002268751.1	pumilio homolog 5	Vitis vinifera	840	0	IPR001313	Pumilio RNA-binding repeat
ROOT-L1_F10	EEE82908.1	1	0	1	BAF46306.1	ataxin-2 related protein	Ipomoea nil	493	4,00E-167	IPR009604	LsmAD domain
ROOT-L2_E05	EEE81416.1	1	0	1	XP_002279792.2	protein MEI2-like 2-like	Vitis vinifera	1198	0	IPR000504	RNA recognition motif domain

Proteins without DBDs

Clone ID	Protein ID	Total	ECM	ROOT	BlastP results				Conserved domains (IPR)		Description
					Acc number	Description	Organism	Score	e-value		
Nuclear proteins and unconventional activators											
Contig52	EEE93901.1	2	0	2	XP_002280700.1	protein LTV1 homolog	Vitis vinifera	506	3,00E-173		
Contig59	EEE76923.1	9	7	2	XP_002275593.1	importin subunit alpha-1	Vitis vinifera	1004	0	IPR000225	Armadillo
Contig60	EEF12521.1	2	0	2	XP_003595566.1	CTD small phosphatase-like protein	Medicago truncatula	533	0	IPR004274	NLI interacting factor
ECM-L1_G09	EEE89572.1	1	1	0	XP_002514774.1	cohesin subunit rad21	Ricinus communis	1264	0	IPR006909	Rad21/Rec8-like protein, C-terminal, eukaryotic
ECM-L2_D07	EEE93110.1	1	1	0	XP_002532142.1	transcription elongation factor s-II	Ricinus communis	781	0	IPR003618	Transcription elongation factor S-II, central domain
ROOT-L1_E11	EEF03397.1	1	0	1	XP_002532142.1	transcription elongation factor s-II	Ricinus communis	663	0	IPR003618	Transcription elongation factor S-II, central domain
ECM-L2_H11	EEE97057.1	1	1	0	XP_002510837.1	Transcriptional corepressor SEUSS	Ricinus communis	1018	0	IPR002691	LIM binding protein
ROOT-L1_C04	EEE85351.1	1	0	1	NP_565199.1	DNA topoisomerase 2-associated protein PAT1	Arabidopsis thaliana	800	0		
ROOT-L1_G07	EEE97843.1	1	0	1	XP_002521404.1	DNA repair helicase rad5,16,	Ricinus communis	91,3	1,00E-18		
Putative unconventional activators with intracellular localization											
Contig02	EEE87673.1	5	1	4	XP_002533858.1	26S proteasome non-atpase regulatory subunit	Ricinus communis	563	0	IPR003903	Ubiquitin interacting motif
Contig12	EEF00732.1	6	1	5	XP_002514982.1	3'-N-debenzoyl-2'-deoxytaxol N-benzoyltransferase	Ricinus communis	533	0	IPR003480	Transferase
Contig23	EEE82379.1	2	1	1	NP_179621.1	RPM1 interacting protein 13	Arabidopsis thaliana	88,2	6,00E-16		
Contig71	ABJ91226.1	3	1	2	ABJ91226.1	CBL-interacting protein kinase 19	Populus trichocarpa	1077	0	IPR004041	NAF domain
Contig77	EEE94413.1	2	2	0	XP_002513820.1	Oxysterol-binding protein	Ricinus communis	622	0	IPR000648	Oxysterol-binding protein
Contig50	EEE87430.1	2	0	2	NP_180260.1	Ubiquitin-associated/translation elongation factor EF1B	Arabidopsis thaliana	505	3,00E-169	IPR015940	Ubiquitin-associated/translation elongation factor EF1B, N-terminal, eukaryote
Contig21	EEE74078.1	3	3	0	NP_193405.1	60S ribosomal protein L15-1	Arabidopsis thaliana	349	2,00E-124	IPR000439	Ribosomal protein L15e

Contig17	EEE83981.1	2	1	1	NP_196773.1	Ubiquitin-associated/translation elongation factor EF1B	Arabidopsis thaliana	268	4,00E-85	IPR000449	Ubiquitin-associated/translation elongation factor EF1B, N-terminal
Contig83	EEF01760.1	2	1	1	XP_002528348.1	o-linked n-acetylglucosamine transferase	Ricinus communis	286	8,00E-93	IPR011990	Tetratricopeptide-like helical
Contig33	EEF03568.1	2	1	1	AAF34804.1	CDK-activating kinase	Euphorbia esula	699	0	IPR017442	Serine/threonine-protein kinase-like domain
ROOT-L2_G05	EEF08981.1	1	0	1	XP_003630417.1	Serine/threonine protein kinase	Medicago truncatula	626	0	IPR017442	Serine/threonine-protein kinase-like domain
ROOT-L1_F06	EEE88471.1	1	0	1	XP_002284945.1	E3 SUMO-protein ligase SIZ1	Vitis vinifera	767	0	IPR003034	DNA-binding SAP
ECM-L1_H10	EEF08751.1	1	1	0	XP_002283831.2	26S protease regulatory subunit 6A homolog A	Vitis vinifera	840	0	IPR003959	ATPase, AAA-type, core
ECM-L2_B04	EEF09851.1	1	1	0	XP_002271062.1	E3 ubiquitin-protein ligase RING1-like	Vitis vinifera	140	4,00E-38	IPR018957	Zinc finger, C3HC4 RING-type
ECM-L1_B08	EEE92166.1	1	1	0	XP_002888582.1	proteasome maturation factor UMP1 family	Arabidopsis lyrata	192	1,00E-61	IPR008012	Proteasome maturation factor UMP1
ROOT-L1_D06	EEE82009.1	1	0	1	XP_002523135.1	kinesin heavy chain	Ricinus communis	1737	0	IPR001715	Calponin homology domain
ECM-L1_A04	EEF08518.1	1	1	0	XP_002533958.1	SGT1 protein, putative	Ricinus communis	587	0	IPR010770	SGT1
ECM-L1_B04	EEE78543.1	1	1	0	XP_002509715.1	ara4-interacting protein	Ricinus communis	746	0	IPR001012	UBX
ECM-L1_G10	EEE85783.1	1	1	0	XP_002513634.1	NADH dehydrogenase	Ricinus communis	292	2,00E-100	IPR006806	ETC complex I subunit
ECM-L2_A05	EEF09223.1	1	1	0	NP_200436.1	protein hapless 8	Arabidopsis thaliana	195	3,00E-51		
ECM-L2_B06	EEE89827.1	1	1	0	XP_002525994.1	Polcalcine Jun	Ricinus communis	246	6,00E-82	IPR018248	EF-hand
ECM-L2_B07	EEE71915.1	1	1	0	XP_002326245.1	serine/threonine protein kinase 1, CTR1	Populus trichocarpa	1697	0	IPR001245	Serine-threonine/tyrosine-protein kinase
ECM-L2_C01	EEF08435.1	1	1	0	XP_002330269.1	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase	Populus trichocarpa	759	0	IPR005123	Oxoglutarate/iron-dependent oxvgenase
ECM-L2_C08	EEE84929.1	1	1	0	XP_002893466.1	GYF domain-containing protein	Arabidopsis thaliana	131	8,00E-28	IPR003169	GYF
ECM-L2_C11	EEE83163.1	1	1	0	NP_563791.1	putative protein phosphatase 2C 4	Arabidopsis thaliana	948	0	IPR001932	Protein phosphatase 2C-like
ECM-L2_D11	EEE81740.1	1	1	0	XP_002511206.1	Polcalcine	Ricinus communis	194	1,00E-62	IPR018248	EF-hand
ECM-L2_G05	EEE91516.1	1	1	0	XP_002275793.1	ganglioside-induced differentiation-associated-protein 2	Vitis vinifera	421	1,00E-148	IPR001251	Cellular retinaldehyde-binding/triple function, C-terminal
ECM-L2_G07	EEE94137.1	1	1	0	XP_002533887.1	organic anion transporter, putative	Ricinus communis	617	0	IPR004853	Domain of unknown function DUF250
ECM-L3_C03	EEE81936.1	1	1	0	NP_569023.1	GTP binding protein	Arabidopsis thaliana	419	1,00E-145	IPR001806	Small GTPase superfamily
ECM-L3_D02	EEE84489.1	1	1	0	NP_201222.1	dentin sialophosphoprotein-like protein	Arabidopsis thaliana	317	8,00E-99		
ROOT-L1_A10	ABK92631.1	1	0	1	ABK92631.1	ATP binding protein	Ricinus communis	132	8,00E-35		
ROOT-L1_B01	EEF04671.1	1	0	1	XP_002322910.1	aquaporin, MIP family, TIP subfamily	Populus trichocarpa	494	3,00E-177	IPR000425	Major intrinsic protein
ROOT-L1_C07	EEE96543.1	1	0	1	NP_177487.2	protein kinase domain-containing protein	Arabidopsis thaliana	1385	0	IPR017442	Serine/threonine-protein kinase-like domain
ROOT-L1_D10	EEF11126.1	1	0	1	XP_002529225.1	Cysteine protease ATG4B, putative	Ricinus communis	685	0	IPR005078	Peptidase C54
ROOT-L1_E08	EEF01913.1	1	0	1	ACN76468.1	CBL-interacting protein kinase 10	Populus euphratica	790	0	IPR004041	NAF domain
ROOT-L1_E09	EEE94689.1	1	0	1	XP_002510470.1	vacuolar proton atpase, putative	Ricinus communis	1395	0	IPR002490	ATPase, VO/A0 complex, 116kDa subunit
ROOT-L1_E10	EEE96727.1	1	0	1	NP_188412.2	protein kinase family protein	Arabidopsis thaliana	1645	0	IPR017442	Serine/threonine-protein kinase-like domain
ROOT-L1_H03	EEE88220.1	1	0	1	XP_002285194.1	serine/threonine-protein phosphatase	Glycine max	1343	0	IPR007587	SIT4 phosphatase-associated protein family
ROOT-L1_H08	EEE76619.1	1	0	1	NP_564664.1	autophagy 18H-like protein	Arabidopsis thaliana	989	0	IPR019781	WD40 repeat, subgroup
ROOT-L1_H11	EEE93430.1	1	0	1	NP_173582.2	calcium-binding EF-hand-containing protein	Arabidopsis thaliana	855	0		
ROOT-L2_B04	EEE97538.1	1	0	1	XP_003634651.1	receptor-like protein kinase THESEUS 1	Arabidopsis thaliana	1402	0	IPR001245	Serine-threonine/tyrosine-protein kinase
ROOT-L2_B07	EEF10743.1	1	0	1	XP_002885828.1	SH3 domain-containing protein	Arabidopsis thaliana	909	0	IPR001452	Src homology-3 domain

ROOT-L2_D08	EEE70414.1	1	0	1	XP_002512737.1	Chaperone protein dnaJ 8, chloroplast precursor	Ricinus communis	264	3,00E-89	IPR001623	Heat shock protein DnaJ, N-terminal
ROOT-L2_D10	EEE94844.1	1	0	1	XP_002318921.1	stress-induced hydrophobic peptide	Populus trichocarpa	105	9,00E-30	IPR000612	Uncharacterised protein family
ROOT-L2_E01	ABK95110.1	1	0	1	XP_002510170.1	cysteine protease, putative	Ricinus communis	786	0	IPR000118	UPF0057
ROOT-L2_E02	EEE93091.1	1	0	1	XP_002516577.1	AP-2 complex subunit beta-1, putative	Ricinus communis	1451	0	IPR002553	Granulin
ROOT-L2_E03	EEF04692.1	1	0	1	XP_003632664.1	probable proteasome inhibitor	Vitis vinifera	348	4,00E-118	IPR013886	Clathrin/coatomer adaptor, adaptin-like, N-terminal
ROOT-L2_E09	EEF02700.1	1	0	1	XP_002516207.1	phosphoinositide 5-phosphatase	Ricinus communis	1300	0	IPR002013	PI31 proteasome regulator
ROOT-L2_F07	EEF00541.1	1	0	1	XP_002516953.1	epoxide hydrolase	Ricinus communis	261	4,00E-86		Synaptojanin, N-terminal
ROOT-L2_F08	EEE79879.1	1	0	1	XP_003636025.1	Photosystem II CP47 chlorophyll apoprotein	Medicago truncatula	588	0		
ROOT-L2_H03	EEF04172.1	1	0	1	XP_002324039.1	f-box family protein	Populus trichocarpa	1032	0	IPR019781	WD40 repeat, subgroup
ECM-L2_C02	EEE97825.1	1	1	0	BAC57955.1	polyubiquitin	Aster tripolium	453	4,00E-162	IPR000626	Ubiquitin
ROOT-L2_H04	ABK95930.1	1	0	1	XP_002869098.1	cyclase family protein	Arabidopsis lyrata	370	7,00E-128	IPR007325	Putative cyclase
Contig13	EEE83232.1	5	3	2	XP_002517818.1	hypothetical protein	Ricinus communis	720	0		
Contig53	EEF05118.1	2	1	1	NP_196277.2	uncharacterized protein	Arabidopsis thaliana	208	8,00E-67		
ECM-L1_B06	EEE92420.1	1	1	0	NP_566370.1	uncharacterized protein	Arabidopsis thaliana	420	2,00E-148	IPR006476	Conserved hypothetical protein CHP01589, plant
ECM-L1_C05	EEE84884.1	1	1	0	XP_002526924.1	conserved hypothetical protein	Ricinus communis	1153	0		
ECM-L1_D07	EEE82270.1	1	1	0	ABK94288.1	unknown protein	Populus trichocarpa	132	3,00E-39		
ECM-L3_F04	EEE77169.1	1	1	0	NP_001067108.2	hypothetical protein	Ricinus communis	292	5,00E-92		
ROOT-L1_C03	EEE79353.1	1	0	1	ABK96357.1	hypothetical protein	Populus trichocarpa	489	4,00E-176		
ROOT-L1_E06	EEF08107.1	1	0	1	ACU24189.1	unknown protein	Glycine max	419	3,00E-144		
ROOT-L1_F08	EEE79967.1	1	0	1	BAJ53105.1	predicted protein	Populus trichocarpa	585	0		
ROOT-L2_D03	EEF03909.1	1	0	1	YP_004532427.1	predicted protein	Populus trichocarpa	505	0		
ROOT-L2_D07	EEE80151.1	1	0	1	NP_001043788.1	predicted protein	Populus trichocarpa	1891	0	IPR009719	Protein of unknown function DUF1296
ROOT-L2_G08	EEE98468.1	1	0	1	AAI87250.1	unknown protein	Arabidopsis thaliana	496	6,00E-157		

Table 7 : Analysis of the TASP protein sequences retrieved by the TAT screening.

*Paralog of 659547, ** Paralog of 391051.

Protein ID version 2	Lenght	FLM	ECM	FB	ECM/FLM	FB/FLM	Secretion	Cleavage site	LL motif	Coiled coil region	NLS
659547	358	16800	35951	32806	2,1	2,0	+	20/21	+	+	+
391051	364	51753	59467	55120	1,2	1,1	+	22/23	-	+	+
304792	257	22085	50846	43558	2,3	2,0	+	20/21	-	-	+
455116	346	1416	835	589	0,6	0,4	+	22/23	-	-	+
659555*	235	nd	nd	nd	nd	nd	+	19/20	+	-	+
487613*	782	2762	2587	966	0,9	0,4	+	20/21	+	+	+
293293**	436	6358	15904	13617	2,5	2,1	+	22/23	-	+	+

Supplementary Figures:

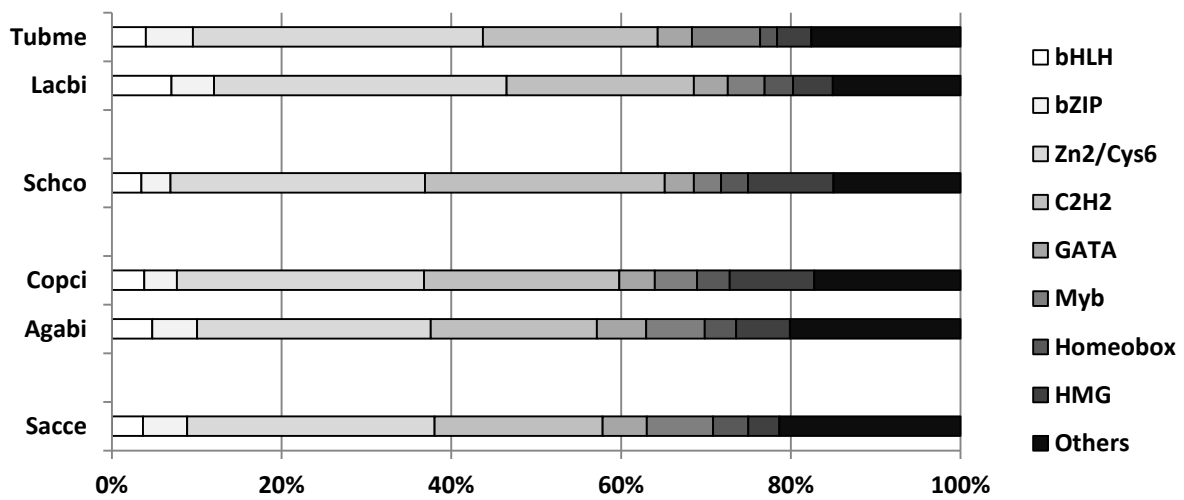


Figure S1: Distribution of *Laccaria bicolor* (Lacbi) transcription factors (TFs) among different DBD family and comparison with the distribution of TFs of other fungal genomes. *S. cerevisiae*, Sacce; *A. bisporus var. bisporus*, Agabi; *C. cinerea*, Copci; *S. commune*, Schco; *T. melanosporum*, Tubme.

Supplementary Tables:

Table S1:

Table S1.1: List of *L. bicolor* TFs identified in silico and displaying similarities with characterized TFs. m.c., manually curated; N.A.=data Non Available.

Protein ID version1	Protein ID version2	TF name	Family	Size (aa)	EST	Other models	Lineage specificity	Accession number	Description	Species	% identity	E-value	Score
149540	149540	NCB1 subunit alpl	Histon fold	192	Full EST	m.c.		NP_593726.1	Dpb3	Schizosaccharom	48	5,00E-29	117
150072	150072	LbCrz1-1	C2H2	740	Full EST	m.c.		AFR92293.1	Crz1	Cryptococcus nec	61	3,00E-40	159
182804	182804	LbISW2	Myb	1011	Full EST	688249		NP_014948.1	lsw2	Saccharomyces cr	50	0.0	946
190760	190760	LbRsc8	Myb	673	Full EST	m.c.		NP_116695.3	Rsc8	Saccharomyces cr	45	6,00E-97	313
231949	231949	LbAda2	Myb	498	Full EST	696363		NP_010736.1	Ada2	Saccharomyces cr	44	2,00E-46	180
247901	247901	LbAce1-1	Copper-fist	595	Full EST	680009		ABF60559.1	ACE1	Phanerochaete cl	39	1,00E-59	207
292045	292045	LbCon7	C2H2	666	Full EST			ABI96241.1	Con7	Magnaporthe gris	68	8,00E-30	131
293207	293207	LbRlm1-1	MAD-box	601	Full EST	m.c.		ABX79379.1	Mig1	Magnaporthe gris	48	5,00E-15	87
293242	293242	LbGcn4	bZIP	611	Partial EST			BAC55240.1	C-Gcn4	Candida maltosa	45	6,00E-08	55.5
293563	293563	LbSnf5	GATA	1841	Partial EST			BAM72038.1	Snf5	Coprinopsis ciner	59	0.0	751
293949	293949	LbSfu1	GATA	929	Full EST			AAM77345.1	Sfu1	Candida albicans	36	1,00E-27	114
293988	293988	LbHom2	Homeobox	685	Full EST			XP_003029756.1	Hom2	Schizophyllum co	40	1,00E-60	226
296037	296037	LbNrg1	C2H2	459	Full EST			ABF69301.1	Nrg1	Cryptococcus nec	70	4,00E-23	105
296675	296675		Myb	389	Partial EST			NP_013025.3	Bas1	Saccharomyces cr	31	4,00E-13	80.1
296682	296682	LbAcu15-3	Zn2Cys6	1013	Partial EST			P87000.2	Acu15	Neurospora crass	25	6,00E-38	149
297319	297319		Homeobox	458	Full EST			CBF86004.1	RfeB	Aspergillus nidula	33	5,00E-27	122
297378	297378		C2H2	207	Full EST			NP_010430.1	Swi5	Saccharomyces cr	44	8,00E-11	54.7
298274	298274	LbAbaA	TEA/ATTS	498	Full EST	692842		XP_658026.1	AbaA	Aspergillus nidul	41	1,00E-09	59.7
300824	300824	Lbltc1	DTT	926	Full EST			NP_011382.1	ltc1	Saccharomyces cr	40	7,00E-18	90.1
301029	301029		Zn2Cys6	905	Full EST			AAB63563.1	FacB	Aspergillus niger	33	2,00E-08	58.5
301089	301089	LbBdp1	Myb	522	Full EST			NP_588496.2	Bdp1	Schizosaccharom	30	3,00E-27	113
301103	301103	LbHD1	Homeobox	624	Full EST			AAA59366.1	Mating type prot	Coprinopsis ciner	32	4,00E-47	194
301157	301157	LbNirA-1	Zn2Cys6	944	Full EST	m.c.		P28348.1	NirA	Emericella nidula	28	2,00E-30	128
301563	301563		C2H2	752	Full EST			XP_659894.1	SteA	Aspergillus nidula	35	1,00E-14	77.0
301697	301697	LbBAS1	Myb/C2H2	809	Full EST	m.c.		NP_013025.3	Bas1	Saccharomyces cr	36	1,00E-22	109
302141	302141	LbRlm1-2	MAD-box	498	Full EST	691348		XP_660588.1	RlmA	Aspergillus nidula	51	5,00E-17	51
302523	302523		C2H2	325	Full EST			XP_659894.1	SteA	Aspergillus nidula	35	1,00E-06	49.3
304495	304495		Zn2Cys6	934	Partial EST			XP_003034563.1	Fst4	Schizophyllum co	30	1,00E-31	132
306097	306097	LbWC2	GATA	334	Full EST			BAH57971.1	White collar phot	Lentinula edodes	35	6,00E-53	212
307141	307141		Zn2Cys6	949	Partial EST			P87000.2	Acu-15	Neurospora crass	24	1,00E-28	122

307309	307309		Zn2Cys6	805	Full EST	698130	XP_003032372.1	Fst3	Schizophyllum co	36	1,00E-125	392
308011	308011		C2H2	660	Partial EST		XP_659894.1	SteA	Aspergillus nidula	53	4,00E-19	90.9
308583	308583	LbCmr1	Zn2Cys6/C2H2	750	Partial EST		ABI81496.1	Cmr1	Cochliobolus hete	35	2,00E-16	82.8
308722	308722	LbFst4	Zn2Cys6	860	Full EST	688408	XP_003034563.1	Fst4	Schizophyllum co	49	0.0	718
309690	309690		Zn2Cys6	895	Full EST		XP_003034563.1	Fst4	Schizophyllum co	28	2,00E-60	220
310878	310878		C2H2	223	Full EST		ABB89847.1	Con1	Magnaporthe gris	39	4,00E-05	49.3
311495	311495	LbRum1		1836	Full EST	685259	AAG02418.1	Rum1	Ustilago maydis	39	0.0	845
312485	312485	LbNirA-2	Zn2Cys6	924	Partial EST		AAB21394.1	Nit-4	Neurospora crass	24	9,00E-32	132
313099	313099		Zn2Cys6	497	Partial EST		NP_593160.2	Moc3	Schizosaccharom'	31	1,00E-06	48.5
313796	313796		Zn2Cys6	782	Full EST		ABD51992.1	FarA	Aspergillus nidula	22	2,00E-25	111
313811	313811	LbMoc3	Zn2Cys6	242	Full EST		NP_593160.1	Moc3	Schizosaccharom'	50	6,00E-12	62.4
314000	314000		Zn2Cys6	837	Full EST	696280	P87000.2	Acu-15	Neurospora crass	24	5,00E-29	123
315220	315220	LbAcu15-2	Zn2Cys6	1010	Partial EST		P87000.2	Acu-15	Neurospora crass	26	5,00E-39	156
317008	317008		Zn2Cys6	626	Full EST	679916	XP_003034563.1	Fst4	Schizophyllum co	28	3,00E-52	192
317073	317073	LbNirA-3	Zn2Cys6	1158	Full EST		AAA33602.1	Nit-4	Neurospora crass	27	3,00E-31	131
317921	317921	LbAcu15-5	Zn2Cys6	1047	Partial EST		P87000.2	Acu-15	Neurospora crass	24	3,00E-32	130
324166	324166	LbHom1-1	Homeobox	804	Partial EST		XP_003030056.1	Hom1	Schizophyllum co	48	5,00E-27	121
325474	325474	LbNirA-4	Zn2Cys6	840	Partial EST		AAA33602.1	Nit-4	Neurospora crass	23	6,00E-23	104
328297	328297		bHLH	693	Partial EST		CBF87767.1	GLCD gamma	Aspergillus nidula	41	7,00E-08	63.9
328369	328369		bHLH	345	No EST		CBF87767.1	GLCD gamma	Aspergillus nidula	40	5,00E-09	65.9
150553	379257	LbPacC	C2H2	677	Full EST		AFR98859.1	PacC	Cryptococcus nec	36	2,00E-65	233
243459	379291	LbHD2	Homeobox	518	Full EST		AAZ20158.1	Homeodomain m	Coprinellus disser	33	4,00E-39	158
230018	381332	LbPriB	Zn2Cys6	944	Full EST	m.c.	P49412.1	PriB	Lentinula edodes	61	0.0	639
312032	383085		Zn2Cys6	826	Full EST	685914	XP_658223.1	FacB	Aspergillus nidula	25	6,00E-15	78.2
234703	386478	LbPcc1	HMG	449	Full EST		XP_001830477.1	pcc1	Coprinopsis ciner	52	2,00E-30	122
168843	387518	LbWC1		977	Full EST		BAF56991.1	Photoreceptor A	Lentinula edodes	45	1,00E-151	541
162920	393192	LbSte12α	C2H2	1279	Full EST	m.c.	AAC01955.1	STE12alpha	Cryptococcus nec	46	1,00E-60	225
295376	393526		Zn2Cys6	517	Full EST		P87000.2	Acu-15	Neurospora crass	37	2,00E-07	47.8
	395214		bZIP	182	Full EST		BAC55240.1	C-Gcn4	Candida maltosa	42	2,00E-07	50.4
313780	399488	LbAcuK	Zn2Cys6	548	Full EST		NP_009798.1	Ert1	Saccharomyces cr	34	5,00E-34	135
297628	399669	LbHom1-2	Homeobox	405	Partial EST		XP_003030056.1	Hom1	Schizophyllum co	45	6,00E-25	112
317135	436253		Zn2Cys6	1138	Full EST		XP_003034563.1	Fst4	Schizophyllum co	30	2,00E-35	144
156491	440138		Myb	381	Partial EST		BAB62527.1	Cdc5	Lentinula edodes	63	1,00E-101	317
	441366		C2H2	311	Full EST		XP_759319.1	Rbf1	Ustilago maydis	37	3,00E-18	92
311992	441703		HSF	577	Full EST		NP_594284.1	Prr1	Schizosaccharom'	35	7,00E-10	64.7

312711	441832		C2H2	346	Partial EST		NP_593073.1	Prz1	Schizosaccharom	36	2,00E-08	53.1
299086	442607	LbXbp1	APSES	492	Full EST		NP_012165.1	Xbp1	Saccharomyces cr	50	8,00E-13	68.6
165046	443509	LbCreA	C2H2	704	Full EST		CAA71314.1	CRR1	Metarhizium anis	76	9,00E-27	112
150318	444460		HMG	561	Partial EST		NP_596656.1	Ste11	Schizosaccharom	27	8,00E-07	49.7
	445028		bZIP	438	Partial EST		P22697.1	Cys-3	Neurospora crass	55	1,00E-10	69.7
324193	451082		C2H2	271	Full EST		NP_010539.1	Met32	Saccharomyces cr	47	1,00E-07	48.9
323995	451323	LbMedA-1		571	Full EST		AAF91180.1	MedA	Aspergillus nidula	53	6,00E-46	173
169971	458057		HMG	497	Full EST		AAK15315.1	Rfg1	Candida albicans	33	1,00E-08	65.9
	459072	LbAsg1	Zn2Cys6	924	Full EST		NP_012136.1	Asg1	Saccharomyces cr	31	8,00E-26	115
293353	459342		Zn2Cys6	635	Full EST		XP_955949.1	Vad-3	Neurospora crass	32	7,00E-10	61.2
293031	459853	LbHap2	Histon fold	295	Full EST		NP_011277.1	Hap2	Saccharomyces cr	79	1,00E-30	116
313869	476130	LbMetR-1	bZIP	317	Full EST		P22697.1	Cys-3	Neurospora crass	58	2,00E-18	81.6
150219	476882	LbFkh2	Forkhead	317	Full EST		NP_014331.3	Fkh2	Saccharomyces cr	44	6,00E-19	88.2
301549	479092		C2H2	384	Full EST		NP_010264.3	Rpn4	Saccharomyces cr	33	2,00E-07	50.8
305984	480375		C2H2	620	Full EST		XP_759319.1	Rbf1	Ustilago maydis	62	3,00E-39	157
311603	481451	LbReb1	Myb	407	Full EST	m.c.	AAA61343.1	Reb1	Kluyveromyces la	26	1,00E-25	107
311738	481594		HMG	489	Full EST		NP_015390.1	Rox1	Saccharomyces cr	35	1,00E-09	65.5
311799	481652	LbSak1	RFX	856	Full EST		NP_594086.1	Sak1	Schizosaccharom	43	1,00E-20	95.5
298964	482609		HMG	571	Full EST	687163	AAC32736.1	Prf1	Ustilago maydis	36	3,00E-20	93.6
309167	483007		Zn2Cys6	516	Full EST		NP_010499.1	Upc2	Saccharomyces cr	32	2,00E-08	57.8
168394	483117	LbMedA-2		514	Partial EST		AAF91180.1	MedA	Aspergillus nidula	51	2,00E-44	168
309008	483154		Zn2Cys6	979	Full EST		NP_012886.3	Rgt1	Saccharomyces cr	45	1,00E-06	53.1
313151	484764		C2H2	492	Partial EST		XP_660025.1	FibC	Aspergillus nidula	56	7,00E-11	72
316437	486090		Zn2Cys6	378	Full EST		NP_009349.3	Oaf1	Saccharomyces cr	44	1,00E-06	50.8
316453	486101		Zn2Cys6	1109	Full EST		BAF99700.1	Trm1	Candida boidinii	25	8,00E-22	93.6
298403	486399		Zn2Cys6	536	No EST		BAE95337.1	CtnR	Monascus purpur	24	5,00E-12	59.3
305525	486945		Forkhead	920	Full EST		NP_596764.1	Fkh2	Schizosaccharom	46	3,00E-12	76.3
295582	487295	LbC2h2	C2H2	512	Full EST		XP_003026630.1	C2h2	Schizophyllum co	79	9,00E-31	122
313622	488576	LbAreA	GATA	1104	Full EST		ABD60578.1	FNR1	Fusarium oxyspor	71	2,00E-29	121
305714	489720		Myb	681	Partial EST		NP_013025.3	Bas1	Saccharomyces cr	33	1,00E-15	87
301720	490310	LbMetR-2	bZIP	287	Full EST		XP_661965.1	MetR	Aspergillus nidula	33	3,00E-16	72.4
	503826		bHLH	N.A.	No EST		CBF87767.1	GLCD gamma	Aspergillus nidula	40	1,00E-08	61.6
149718	694786	LbHap5	Histon fold	194	Full EST	510110	AFR96202.1	Hap5	Cryptococcus nec	63	1,00E-50	166
150186	522619	LbMcm1	MAD-box	379	Full EST	m.c.	XP_681945.1	MCM1	Aspergillus nidula	94	1,00E-46	160
299352	550021		bHLH	N.A.	No EST		CBF87767.1	GLCD gamma	Aspergillus nidula	56.6	1,00E-05	64

	553226		bHLH	N.A.	No EST		CBF87767.1	GLCD gamma	Aspergillus nidula	40	1,00E-08	61.6
167431	567783	LbAcuM-1	Zn2Cys6	388	Full EST	680142	NP_015192.1	Rds2	Saccharomyces cr	62	2,00E-86	273
243538	571647	LbSql1		491	Full EST	m.c.	NP_596609.1	Ssn6	Schizosaccharom	68	9,00E-175	532
317361	573592	LbOaf3	Zn2Cys6	202	Partial EST		NP_012990.1	Oaf3	Saccharomyces cr	48	3,00E-09	56.6
300757	574778	LbHapX	bZIP	524	Full EST		AFR94904.1	HapX	Cryptococcus nec	31	5,00E-27	115
318699	579433		C2H2	485	No EST		NP_010539.1	Met32	Saccharomyces cr	35	5,00E-07	42.7
297118	585149	LbFst3	Zn2Cys6	1097	Full EST		XP_003032372.1	Fst3	Schizophyllum co	47	0.0	663
297200	585421	LbNsdD	GATA	793	Full EST		XP_660756.1	NsdD	Aspergillus nidula	69	2,00E-21	97.4
300503	593632	LbXlnR	Zn2Cys6	544	No EST		BAL72831.1	XlnR	Aspergillus aculea	44	3,00E-10	53.9
	595635	LbAcu15-4	Zn2Cys6	1008	Partial EST		P87000.2	Acu-15	Neurospora crass	25	2,00E-36	144
239654	596083		bZIP	N.A.	Partial EST		P22697.1	Cys-3	Neurospora crass	54	1,00E-11	65.5
150048	607061		HSF	127	Full EST	466909	AAA34689.1	HSF1	Saccharomyces cr	48	2,00E-25	113
305505	607158	LbZap1	C2H2	422	Full EST		NP_012479.1	Zap1p	Saccharomyces cr	34	3,00E-42	160
305537	607166		Zn2Cys6	888	Full EST		XP_955949.1	Vad-3	Neurospora crass	23	2,00E-14	73.6
244290	608593	LbSnt2	Myb	892	Full EST		ADK22148.1	Snt2	Fusarium oxyspor	28	3,00E-59	221
302892	614278		GATA	448	Full EST		XP_754237.1	NsdD	Aspergillus fumig	54	2,00E-12	68.2
302761	614280		Zn2Cys6	905	Full EST		XP_003034563.1	Fst4	Schizophyllum co	32	2,00E-87	294
305751	619068	LbFh1	Forkhead	722	Full EST		EEU04402.1	Fh1	Saccharomyces cr	42	7,00E-22	101
	620272		bZIP	N.A.	No EST		P22697.1	Cys-3	Neurospora crass	54	1,00E-11	65.5
296536	621250		C2H2	251	Full EST	699203	NP_593073.1	Prz1	Schizosaccharom	37	2,00E-12	63.9
300881	622364	LbAce1-2	Copper-fist	411	Full EST		ABF60559.1	ACE1	Phanerochaete cl	29	4,00E-38	142
300968	622520	LbCbf11	p53-like	683	Full EST		NP_587779.1	Cbf11	Schizosaccharom	28	4,00E-45	168
301156	622851		Forkhead	403	Full EST		NP_596301.1	Sep1	Schizosaccharom	31	2,00E-12	74.7
296690	623610		Zn2Cys6	974	Full EST		P87000.2	Acu-15	Neurospora crass	24	1,00E-29	125
300743	625521		Zn2Cys6	726	Full EST		P87000.2	Acu-15	Neurospora crass	21	6,00E-07	51.6
307391	625911		Zn2Cys6	934	Full EST	683544	XP_003032372.1	Fst3	Schizophyllum co	30	7,00E-52	194
311698	628355		Zn2Cys6	889	Full EST	685525	XP_003034563.1	Fst4	Schizophyllum co	29	6,00E-66	236
312032	628949		Zn2Cys6	759	Full EST	685914	P87000.2	Acu-15	Neurospora crass	23	3,00E-10	62.8
294267	629198		Zn2Cys6	924	Full EST	686157	CAA58838.1	UaY	Emericella nidula	25	3,00E-13	73.2
296989	629646		Zn2Cys6	655	Full EST		NP_010493.1	car80	Saccharomyces cr	38	9,00E-10	62.4
294488	633206		C2H2	484	Full EST	692770	NP_015287.1	Met31	Saccharomyces cr	38	2,00E-06	46.6
292128	634738		Zn2Cys6	743	Full EST	694310	XP_003034563.1	Fst4	Schizophyllum co	27	7,00E-38	150
319718	636228	LbMbf1	HLH type 3	148	Full EST		EEU07529.1	Mbf1p	Saccharomyces cr	51	9,00E-44	144
144261	636637	LbIIIA	C2H2	489	Full EST		NP_594670.1	TFIIIA	Schizosaccharom	33	2,00E-59	201
313784	636734	LbCrz1-2	C2H2	277	Full EST		AFR92293.1	Crz1	Cryptococcus nec	58	3,00E-40	150

312467	640940		HMG	462	Full EST		AAC32736.1	Prf1	Ustilago maydis	37	2,00E-20	93.2
311571	644689	LbExp1	HMG	564	Full EST		XP_001837422.2	Exp1	Coprinopsis ciner	66	0.0	599
327972	648888		HMG	612	Partial EST		AAC32736.1	Prf1	Ustilago maydis	35	2,00E-18	88.2
293210	652780	LbHxl1	bZIP	353	Partial EST		AFR98359.1	Hxl1	Cryptococcus neoformans	47	3,00E-09 57.4	
292149	654679	LbAcu15	Zn2Cys6	977	Full EST		P87000.2	Acu-15	Neurospora crass	26	2,00E-41	163
311793	657026	LbDevR	bHLH	443	Full EST		CAC81781.1	DevR	Emericella nidula	52	7,00E-24	100
292536	657699		Homeobox	548	Full EST	687995	AAY62596.1	Pth12	Magnaporthe gris	65	9,00E-21	89.4
294333	658142		HMG	405	Full EST		ABC68485.1	MAT1-2-1	Penicillium marne	39	3,00E-07	60.8
176793	660430	bNCB2 subunit bel	Histon fold	145	Full EST		NP_010685.1	Ncb2	Saccharomyces cr	47	4,00E-27	105
242593	665554	LbYap1	bZIP	545	Full EST		AAS64313.1	Chap1	Cochliobolus hetu	27	5,00E-17	92.8
227966	667316		GATA	375	Full EST		NP_012425.1	Gzf3	Saccharomyces cr	43	9,00E-13	70.1
312016	667862	LbAtf2	bZIP	462	Full EST		XP_569310.1	Atf2	Cryptococcus nec	44	4,00E-32	129
297145	668080		GATA	735	Full EST		CAJ13843.2	white-collar-1a	Mucor circinelloic	57	2,00E-11	66.2
296988	668161	LbNosA	Zn2Cys6	670	Full EST		CAJ76908.1	NosA	Aspergillus nidula	23	2,00E-17	85.5
309255	668424		Zn2Cys6	723	Full EST	687729	P87000.2	Acu-15	Neurospora crass	21	4,00E-16	81.3
296434	670084		Zn2Cys6/C2H2	699	Partial EST		XP_659874.1	AmdA	Aspergillus nidula	27	6,00E-14	74.7
254611	670648	LbAcuM-2	Zn2Cys6	402	Partial EST		NP_015192.1	Rds2	Saccharomyces cr	41	1,00E-96	300
302899	671538		GATA	344	Partial EST		NP_011703.3	Hgh1	Saccharomyces cr	32	4,00E-12	67.4
300898	680902	LbPrf1	HMG	322	Full EST		AAC32736.1	Prf1	Ustilago maydis	43	7,00E-23	98.6
291829	681767	LbMSN4	C2H2	354	Full EST		NP_012861.1	Msn4	Saccharomyces cr	63	1,00E-15	79.0
318097	682475		Zn2Cys6	891	Full EST		XP_963640.2	Vad-5	Neurospora crass	29	4,00E-18	88.6
305811	683624		Zn2Cys6	1010	Full EST		P87000.2	Acu-15	Neurospora crass	24	4,00E-16	82.0
292733	685209	LbGat1	GATA	506	Full EST		XP_003036589.1	Gat1	Schizophyllum co	42	6,00E-65	227
311840	685688	LbCol21	Zn2Cys6	833	Full EST		XP_955876.2	Col21	Neurospora crass	23	8,00E-24	116
294744	691497	LbSFP1	C2H2	924	Full EST		NP_013507.1	SFP1	Saccharomyces cr	28	2,00E-08	56.2
317671	691799		HMG	646	Partial EST		AAC32736.1	Prf1	Ustilago maydis	39	6,00E-15	77.0
166037	694007	LbSwi6	APSES	816	Full EST		XP_003720365.1	Swi6	Magnaporthe ory	30	4,00E-96	322
	696456		C2H2	532	Full EST		NP_593073.1	Prz1	Schizosaccharom	48	4,00E-18	93.6
313819	696532	LbTrm2	C2H2	206	Full EST		BAJ07608.1	Trm2	Candida boidinii	43	3,00E-17	72.8
302769	697312		Zn2Cys6	826	Full EST		XP_003034563.1	Fst4	Schizophyllum co	33	2,00E-83	282
295375	697879		GATA	469	Full EST		XP_003036589.1	Gat1	Schizophyllum co	62	4,00E-22	97.4
147701	699455	LbHsf1	HSF	674	Full EST		NP_594846.1	Hsf1	Schizosaccharom	44	2,00E-51	187
301763	699998		C2H2	356	Full EST		NP_593288.1	Rst2	Schizosaccharom	39	2,00E-09	56.6
300797	700295	LbBri1		930	Full EST		XP_003038897.1	Bri1	Schizophyllum co	40	2,00E-161	503
299924	701575		Zn2Cys6	883	Full EST		XP_003034563.1	Fst4	Schizophyllum co	29	5,00E-62	224

305928	701951		Zn2Cys6	658	Full EST		XP_003032372.1	Fst3	Schizophyllum co	38	2,00E-79	269
299004	704012		C2H2	811	Full EST	687121	NP_593288.1	Rst2	Schizosaccharom	44	3,00E-05	45.1
179365	705566	LbCDC5	Myb	841	Full EST		BAB62527.1	Cdc5	Lentinula edodes	74	0.0	1239
318917	706529	LbCBF1	bHLH	343	Full EST		CAC19005.1	CBF1	Candida albicans	60	9,00E-30	114
254568	708062	LbAcuM-3	Zn2Cys6	449	Full EST	m.c.	ADK36628.1	AcuM	Aspergillus fumigi	39	9,00E-96	298
165205	708105	LbHap3	Histon fold	158	Full EST		AAC49411.1	HapC	Emericella nidula	76	4,00E-48	156
333777	708164	LbRgm1	C2H2	790	Full EST		NP_013907.1	Rgm1	Saccharomyces cr	52	1,00E-22	96.7
313642	709256		Zn2Cys6	749	Full EST		P49412.1	PriB	Lentinula edodes	24	1,00E-24	102
313614	709278		Zn2Cys6	577	Full EST		P87000.2	Acu-15	Neurospora crass	41	2,00E-07	52.8
170124+308018	709764+617537	LbURBS1	GATA	615	Full EST	697895	XP_757197.1	Urbs1	Ustilago maydis	39	7,00E-39	152
307210	709867	Lblec1	C2H2	415	Full EST		NP_594663.1	lec1	Schizosaccharom	44	2,00E-29	114
191754	709955	LbMbp1	APSES	749	Full EST		NP_593032.1	Res2	Schizosaccharom	32	4,00E-103	332
300067+300068	582197+625683	LbSkn7	HSF	881	Full EST	m.c.	AAX62808.1	Skn7	Cryptococcus nec	48%	6,00E-46	187

Table S1.2: List of *L. bicolor* TFs identified in silico and no displaying similarities with characterized TFs. m.c., manually curated; N.A.=data Non Available.

Protein ID version1	Protein ID version2	Family	Size (aa)	EST	Other models	Lineage specificity	Accession number	Description	Species	% identity	E-value	Score
292029	292029	Zn2Cys6	647	Partial EST			XP_001831331.2	hypothetical prot	Coprinopsis ciner	67	0.0	759
294581	294581	bHLH	394	No EST			XP_001882321.1	predicted protein	Laccaria bicolor	85	7,00E-97	314
299606	299606	GRF	650	Partial EST			XP_001831840.1	DNA-(apurinic or	Coprinopsis ciner	57	0.0	655
300072	300072	Zn2Cys6	505	Full EST			XP_001882919.1	predicted protein	Laccaria bicolor	32	3,00E-05	55.5
300474	300474	NF-X1	139	Partial EST			EKM74484.1	hypothetical prot	Agaricus bisporus	66	2,00E-25	111
300747	300747	Zn2Cys6	730	Full EST	m.c.		EKV51437.1	hypothetical prot	Agaricus bisporus	62	0.0	896
302525	302525	C2H2	204	Full EST	682203		ESK86966.1	hypothetical prot	Moniliophthora ri	27	2,00E-15	81.3
302926	302926	TEA/ATTS	482	No EST			XP_001831751.2	hypothetical prot	Coprinopsis ciner	39	6,00E-58	211
303095	303095	Zn2Cys6	290	Partial EST			XP_001882867.1	predicted protein	Laccaria bicolor	90	4,00E-174	497
305742	305742	Zn2Cys6	565	Full EST	698416		EIM88510.1	hypothetical prot	Stereum hirsutum	31	6,00E-89	305
307744	307744	Myb	997	Full EST			EGN92622.1	hypothetical prot	Serpula lacryman	53	0.0	797
310910	310910	Zn2Cys6	205	Full EST	m.c.		XP_001883992.1	predicted protein	Laccaria bicolor	39	8,00E-19	91.7
311512	311512	C2H2	1186	Full EST			XP_001837490.2	hypothetical prot	Coprinopsis ciner	32	3,00E-44	184
320896	320896	Homeobox	497	Full EST			EKV51207.1	hypothetical prot	Agaricus bisporus	53	7,00E-140	423
321078	321078	Homeobox	310	Partial EST			EKV50979.1	hypothetical prot	Agaricus bisporus	50	3,00E-82	262
329739	329739	Zn2Cys6	673	Full EST	m.c.	+	XP_001883893.1	predicted protein	Laccaria bicolor	42	9,00E-133	416
331730	331730	Zn2Cys6	371	No EST		+	XP_001875544.1	predicted protein	Laccaria bicolor	81	6,00E-169	506
332886	332886	Zn2Cys6	967	No EST		+	XP_001890044.1	predicted protein	Laccaria bicolor	94	0.0	1755
333101	333101	Zn2Cys6	252	Partial EST			XP_001882867.1	predicted protein	Laccaria bicolor	76	2,00E-107	326
334161	334161	C2H2	897	Partial EST			XP_001888967.1	predicted protein	Laccaria bicolor	74	0.0	669
332342	399673	Homeobox	535	Full EST			XP_001838208.2	hypothetical prot	Coprinopsis ciner	52	1,00E-78	269
	438987	bHLH	205	No EST			XP_001891123.1	predicted protein	Laccaria bicolor	93	3,00E-74	243
	438992	bHLH	216	No EST			XP_001882321.1	predicted protein	Laccaria bicolor	95	7,00E-104	325
155813	439496	Zn2Cys6	707	Partial EST			-	-	-	-	-	-
335808	439617	Zn2Cys6	748	No EST		+	XP_001890044.1	predicted protein	Laccaria bicolor	94	0.0	1374
294677	444635	C2H2	515	Full EST			XP_001835091.1	hypothetical prot	Coprinopsis ciner	39	3,00E-10	71.2
303137	444686	Zn2Cys6	366	Partial EST			XP_001882867.1	predicted protein	Laccaria bicolor	83	0.0	553
334368	445505	C2H2	560	Full EST		+	-	-	-	-	-	-
306911	445893	C2H2	916	No EST			XP_001887146.1	predicted protein	Laccaria bicolor	87	0.0	1303
305186	449185	C2H2	404	Full EST			EMD39405.1	hypothetical prot	Ceriporiopsis sub	52	2,00E-87	281

298017	453749	Zn2Cys6	824	No EST		+	XP_001877304.1	predicted protein <i>Laccaria bicolor</i>	98	0.0	800
306201	455773	APSES	929	Full EST			XP_002911924.1	hypothetical prot <i>Coprinopsis cinere</i>	48	0.0	640
301974	455979	Zn2Cys6	417	Full EST		+	XP_001874373.1	predicted protein <i>Laccaria bicolor</i>	64	1,00E-22	107
325675	456860	TEA/ATTS	494	Full EST	687405		XP_001887770.1	predicted protein <i>Laccaria bicolor</i>	80	0.0	799
294045	458584	C2H2	362	Partial EST			EIW81598.1	hypothetical prot <i>Coniophora puteana</i>	44	4,00E-05	53.5
293340	459322	HMG	484	Partial EST			XP_002911955.1	hypothetical prot <i>Coprinopsis cinere</i>	52	4,00E-52	192
335020	460596	Zn2Cys6	737	No EST		+	XP_001885028.1	predicted protein <i>Laccaria bicolor</i>	60	3,00E-50	188
	461548	bZIP	268	No EST		+	-	-	-	-	-
294583	462217	bZIP	802	Full EST			EKM56391.1	hypothetical prot <i>Phanerochaete chrysosporia</i>	47	1,00E-102	341
321741	467042	C2H2	228	Partial EST			XP_001888340.1	predicted protein <i>Laccaria bicolor</i>	40	1,00E-12	74.7
325558	477979	C2H2	438	Full EST			XP_001879153.1	predicted protein <i>Laccaria bicolor</i>	33	3,00E-26	119
301759	478107	SGT1	841	Full EST			EMD41652.1	hypothetical prot <i>Ceriporiopsis subteranea</i>	58	0.0	940
299001	482572	TEA/ATTS	269	Partial EST			XP_001883698.1	predicted protein <i>Laccaria bicolor</i>	54	1,00E-24	110
300472	483735	NF-X1	94	No EST		+	-	-	-	-	-
323970/313540	483927	Zn2Cys6	818	No EST		+	XP_001881611.1	predicted protein <i>Laccaria bicolor</i>	97	0.0	1533
303218	483986	Zn2Cys6	358	No EST			XP_001891037.1	predicted protein <i>Laccaria bicolor</i>	87	0.0	619
316706	484334	Zn2Cys6	342	No EST		+	XP_001889350.1	predicted protein <i>Laccaria bicolor</i>	94	6,00E-129	379
304051	484885	Zn2Cys6	73	Partial EST			ESK87335.1	transcription fact <i>Moniliophthora roran</i>	66	1,00E-21	89.7
327759	486390	Zn2Cys6	293	Partial EST			XP_001888638.1	predicted protein <i>Laccaria bicolor</i>	39	8,00E-60	209
324602	487565	C2H2	134	Full EST	695264		XP_001875147.1	predicted protein <i>Laccaria bicolor</i>	44	1,00E-07	56.6
331193	509072	Zn2Cys6	N.A.	Full EST	690006		XP_001832306.2	hypothetical prot <i>Coprinopsis cinere</i>	51	2,00E-54	196
151260	512103	NF-X1	N.A.	Full EST			XP_002910268.1	shuttle craft prot <i>Coprinopsis cinere</i>	56	0.0	1065
	540135	C2H2	N.A.	No EST			XP_001882874.1	predicted protein <i>Laccaria bicolor</i>	55	5,00E-27	107
	568346	bHLH	390	No EST			XP_001882311.1	predicted protein <i>Laccaria bicolor</i>	73	7,00E-134	400
318333	568492	HMG	285	Full EST			EJF61605.1	hypothetical prot <i>Dichomitus squarrosus</i>	26	6,00E-07	58.9
325489	573284	Zn2Cys6	252	Partial EST			XP_001888195.1	predicted protein <i>Laccaria bicolor</i>	88	1,00E-58	209
328264	574270	bHLH	372	No EST			XP_001882400.1	predicted protein <i>Laccaria bicolor</i>	80	6,00E-11	73.2
312412	576537	bHLH	287	No EST			XP_001873445.1	predicted protein <i>Laccaria bicolor</i>	73	1,00E-60	205
318334	578700	HMG	224	No EST			XP_448357.1	hypothetical prot <i>Candida glabrata</i>	30	1,00E-04	50.1
299955	579118	C2H2	175	No EST			XP_001887833.1	predicted protein <i>Laccaria bicolor</i>	36	5,00E-20	92.8
299937	579366	Zn2Cys6	358	Partial EST			XP_001883992.1	predicted protein <i>Laccaria bicolor</i>	80	0.0	539
	579506	C2H2	103	No EST			XP_001882874.1	predicted protein <i>Laccaria bicolor</i>	63	6,00E-33	123
299831	580937	Zn2Cys6	109	No EST			XP_001879118.1	predicted protein <i>Laccaria bicolor</i>	82	3,00E-54	180
	581437	C2H2	95	No EST			XP_001882874.1	predicted protein <i>Laccaria bicolor</i>	55	4,00E-28	110
	581905	Zn2Cys6	967	No EST		+	XP_001890044.1	predicted protein <i>Laccaria bicolor</i>	96	0.0	1796

304339	583411	bHLH	1039	Full EST		XP_001838961.1	hypothetical prot Coprinopsis ciner	47	0.0	742
311707	583431	Zn2Cys6	315	Partial EST		XP_001888958.1	predicted protein Laccaria bicolor	75	4,00E-47	178
303137	594734	Zn2Cys6	366	Partial EST		XP_001882867.1	predicted protein Laccaria bicolor	83	0.0	556
333124	594922	TEA/ATTS	502	No EST		XP_001879464.1	predicted protein Laccaria bicolor	81	0.0	815
310368	595372	Zn2Cys6	909	Partial EST		ESK86577.1	hypothetical prot Moniliophthora ri	43	2,00E-174	535
310368	595386	Zn2Cys6	935	Partial EST		ESK86577.1	hypothetical prot Moniliophthora ri	43	0.0	568
314316	595621	Zn2Cys6	793	Partial EST		XP_001877594.1	predicted protein Laccaria bicolor	64	0.0	556
334157	595757	Zn2Cys6	354	Partial EST		XP_001888960.1	WD40-containing Laccaria bicolor	62	6,00E-41	164
	606882	Copper-fist	N.A.	No EST		XP_001891229.1	predicted protein Laccaria bicolor	61	4,00E-126	375
298451	608663	C2H2	946	No EST		XP_001890680.1	predicted protein Laccaria bicolor	67	0.0	1188
141130	611756	: complex compon	1939	Full EST		-	-	-	-	-
313765	612492	p53-like	1090	Full EST		XP_001830657.1	jkappa-recombin Coprinopsis ciner	75	0.0	1332
313619	613245	Zn2Cys6	359	Partial EST		XP_001883903.1	predicted protein Laccaria bicolor	86	0.0	601
308094	617721	C2H2	129	Full EST		XP_001882874.1	predicted protein Laccaria bicolor	49	2,00E-16	80.5
334646	619686	C2H2	584	Full EST	m.c.	EKV42986.1	hypothetical prot Agaricus bisporus	41	1,00E-81	275
	620550	Zn2Cys6	251	Partial EST		XP_001887755.1	predicted protein Laccaria bicolor	94	4,00E-169	478
320903	622992	bHLH	430	Partial EST		XP_001829294.2	hypothetical prot Coprinopsis ciner	69	2,00E-147	434
142667	623651	C2H2	106	Full EST	682201	ESK84996.1	C2H2 type zinc fir Moniliophthora ri	53	3,00E-15	89
294648	625677	bHLH	631	Partial EST		EKM82300.1	hypothetical prot Agaricus bisporus	54	7,00E-94	310
309028	630145	Histon fold	215	Full EST		EIN12889.1	histone-fold-cont Punctularia strigo	51	2,00E-45	160
308108+308109	697835+637785	Zn2Cys6	321	Full EST	697833	XP_003033055.1	hypothetical prot Schizophyllum co	39	1,00E-46	175
306314	643886	C2H2	362	Full EST		XP_001885248.1	predicted protein Laccaria bicolor	39	2,00E-68	232
304198	654916	Zn2Cys6	357	Partial EST		XP_001884065.1	predicted protein Laccaria bicolor	95	0.0	644
301245	655850	bHLH	296	Full EST		XP_001829296.1	hypothetical prot Coprinopsis ciner	71	6,00E-116	347
292246	656449	TEA/ATTS	469	Full EST		XP_001833298.1	hypothetical prot Coprinopsis ciner	55	5,00E-145	434
328804	661551	Zn2Cys6	341	Partial EST		-	-	-	-	-
294399	663232	bHLH	743	Full EST		EPS93416.1	hypothetical prot Fomitopsis pinico	38	2,00E-77	271
301023	666027	Homeobox	236	Partial EST		XP_001829072.2	hypothetical prot Coprinopsis ciner	53	7,00E-60	199
301338	666247	Zn2Cys6	229	Full EST	681483	EKM83945.1	hypothetical prot Agaricus bisporus	79	1,00E-103	309
295643	667917	C2H2	454	Full EST		XP_001879886.1	predicted protein Laccaria bicolor	52	1,00E-26	120
293616	679667	bHLH	428	Full EST		EGO01310.1	hypothetical prot Serpula lacryman	40	1,00E-49	183
291812	681707	C2H2	292	Full EST		XP_001829430.1	hypothetical prot Coprinopsis ciner	54	2,00E-104	317
311402	685157	Zn2Cys6	724	Full EST		ESK89702.1	hypothetical prot Moniliophthora ri	32	8,00E-88	301
	685852	bZIP	450	Full EST		ESK97594.1	hypothetical prot Moniliophthora ri	61	1,00E-166	488
297317	686144	C2H2	542	Full EST		ESK98276.1	hypothetical prot Moniliophthora ri	53	0.0	546

325649	687441	bHLH	468	Full EST	EKM78892.1	hypothetical prot Agaricus bisporus	41	3,00E-61	214
297737	690446	C2H2	547	Full EST	XP_001883572.1	predicted protein Laccaria bicolor	40	5,00E-75	261
297882	690614	YL1	477	Full EST	EGO19422.1	hypothetical prot Serpula lacryman	50	4,00E-132	402
305344	694069	Myb	312	Full EST	EKV43858.1	hypothetical prot Agaricus bisporus	51	9,00E-76	246
	694534	C2H2	160	Partial EST	XP_001888487.1	predicted protein Laccaria bicolor	60	4,00E-29	119
	695265	C2H2	151	Full EST	XP_001882874.1	predicted protein Laccaria bicolor	38	2,00E-14	75.9
325071	696110	Zn2Cys6	273	Full EST	EGO21656.1	hypothetical prot Serpula lacryman	61	9,00E-75	239
	696146	GRF	211	Full EST	XP_001830882.2	hypothetical prot Coprinopsis ciner	51	9,00E-31	129
316204	697356	C2H2	409	Full EST	EIW51857.1	hypothetical prot Trametes versicol	84	2,00E-96	306
301339	700814	bHLH	274	Full EST	XP_001829359.1	hypothetical prot Coprinopsis ciner	64	2,00E-98	301
309226	704283	Zn2Cys6	656	Full EST	EKV45884.1	hypothetical prot Agaricus bisporus	70	0.0	926
294995	705820	C2H2	284	Full EST	XP_001874320.1	predicted protein Laccaria bicolor	87	2,00E-168	479
301873	705977	C2H2	281	Full EST	XP_001884602.1	predicted protein Laccaria bicolor	85	2,00E-168	479
307634	706259	C2H2	225	Full EST	XP_001884602.1	predicted protein Laccaria bicolor	56	1,00E-68	223
296378	707132	bZIP	515	Full EST	EGO00851.1	hypothetical prot Serpula lacryman	50	2,00E-137	421
296436	707179	Zn2Cys6	365	Full EST	EKM80783.1	hypothetical prot Agaricus bisporus	64	7,00E-150	439
293478	708777	Zn2Cys6	879	Full EST	XP_001833412.2	hypothetical prot Coprinopsis ciner	44	0.0	564

Table S2:

Table S2: List of *L. bicolor* TFs Identified in silico, along with gene expression change in ECM Roots of *P. trichocarpa*, *P. deltooides* and Douglas fir as compared with FLM. N.A.=data Non Available.

Protein ID version1	Protein ID version2	TF name	Family	ratio <i>P. tricho</i> ECM/FLM	P value <i>P. tricho</i> ECM/FLM	ratio <i>P. delto</i> ECM/FLM	P value <i>P. delto</i> ECM/FLM	ratio Douglas fir ECM/FLM	P value Douglas fir ECM/FLM	FLM	<i>P. tricho</i> ECM	<i>P. delto</i> ECM	Douglas fir ECM
149540	149540	NCB1 subunit alp	Histon fold	4,8	0,001	5,5	0,001	1,3	0,758	2264	10841	12405	2977
150072	150072	LbCrz1-1	C2H2	18,4	0,094	21,5	0,074	5,3	0,260	60	1097	1284	318
182804	182804	LbISW2	Myb	0,3	0,002	0,3	0,003	0,6	0,156	13414	3959	3959	7677
190760	190760	LbRsc8	Myb	1,3	0,151	1,3	0,069	0,6	0,069	15546	20686	20769	8756
231949	231949	LbAda2	Myb	0,9	0,597	0,8	0,245	1,0	1,000	6263	5695	4836	6549
247901	247901	LbAce1-1	Copper-fist	3,8	0,011	4,3	0,006	1,5	0,966	1974	7581	8425	2994
292029	292029		Zn2Cys6	15,9	0,001	11,7	0,001	17,4	0,008	2661	42247	31192	46214
292045	292045	LbCon7	C2H2	0,1	0,002	0,1	0,009	0,1	0,251	4615	239	331	422
293207	293207	LbRlm1-1	MAD-box	114,1	0,016	96,0	0,016	7,3	0,155	34	3856	3245	248
293242	293242	LbGcn4	bZIP	7,6	0,001	6,9	0,001	4,5	0,004	6885	52563	47845	30659
293563	293563	LbSnf5	GATA										
293949	293949	LbSfu1	GATA	0,7	0,051	0,7	0,003	1,5	0,064	21117	14379	14893	30765
293988	293988	LbHom2	Homeobox	0,7	0,012	0,7	0,060	1,0	0,993	18290	12226	12360	17892
294581	294581		bHLH	2,1	0,006	2,1	0,286	1,5	0,078	504	1044	1047	776
296037	296037	LbNrg1	C2H2	1,4	0,754	2,0	0,057	1,1	0,700	7024	10062	13958	7974
296675	296675		Myb	2,1	0,042	1,0	0,957	0,3	0,288	5295	11334	5145	1728
296682	296682	LbAcu15-3	Zn2Cys6	3,2	0,005	4,0	0,043	4,7	0,015	1011	3223	4017	4704
297319	297319		Homeobox	0,6	0,122	0,3	0,012	0,4	0,140	4401	2593	1434	1978
297378	297378		C2H2	2,8	0,006	2,2	0,007	2,7	0,033	7861	21856	17402	20872
298274	298274	LbAbaA	TEA/ATTS	104,6	0,004	87,7	0,003	73,0	0,015	232	24249	20327	16913
299606	299606		GRF	0,6	0,070	0,5	0,033	0,5	0,031	6037	3592	3133	2951
300072	300072		Zn2Cys6	0,5	0,008	0,8	0,287	0,6	0,335	2164	1180	1815	1324
300474	300474		NF-X1	0,2	0,034	0,2	0,012	0,2	0,025	6239	1278	1416	1100
300747	300747		Zn2Cys6	0,5	0,067	0,5	0,009	0,7	0,243	17311	7852	8080	11396
300824	300824	Lbltc1	DTT	0,8	0,344	0,9	0,438	1,1	0,564	5868	4771	5094	6685
301029	301029		Zn2Cys6	0,9	0,544	0,9	0,252	1,7	0,055	9138	8250	8339	15081
301089	301089	LbBdp1	Myb	0,4	0,013	0,7	0,071	0,5	0,026	9319	4030	6493	4322
301103	301103	LbHD1	Homeobox	0,8	0,152	0,8	0,309	0,5	0,017	4062	3280	3263	2051
301157	301157	LbNirA-1	Zn2Cys6	0,2	0,050	0,1	0,004	0,1	0,020	4651	749	261	561
301563	301563		C2H2	34,8	0,009	44,4	0,008	2,8	1,000	93	3228	4117	256

329739	329739		Zn2Cys6	3,1	0,083	3,8	0,019	0,6	0,449	390	1227	1486	223
331730	331730		Zn2Cys6	1,0	1,000	1,0	1,000	1,0	1,000	1	1	1	1
332886	332886		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
333101	333101		Zn2Cys6	0,0	0,018	0,2	0,024	0,1	0,052	1170	30	201	91
334161	334161		C2H2	0,2	0,060	0,1	0,014	0,7	0,571	1284	232	171	956
150553	379257	LbPacC	C2H2	3,3	0,005	4,1	0,004	0,9	0,859	7974	26156	32604	7530
243459	379291	LbHD2	Homeobox	1,1	0,746	0,8	0,171	0,9	0,446	6286	6672	5257	5475
230018	381332	LbPriB	Zn2Cys6	0,7	0,156	1,1	1,000	0,8	0,618	4494	3226	4754	3483
312032	383085		Zn2Cys6	1,3	0,324	0,9	0,594	1,5	0,462	8535	11181	7274	12641
234703	386478	LbPcc1	HMG	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
168843	387518	LbWC1		0,1	0,012	0,1	0,010	0,2	0,012	9639,39	1047,84	1284,99	2013,99
162920	393192	LbSte12α	C2H2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
295376	393526		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	395214		bZIP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
313780	399488	LbAcuK	Zn2Cys6	0,6	0,005	0,6	0,003	1,2	0,612	14083	8074	8821	17009
297628	399669	LbHom1-2	Homeobox	2,2	0,005	2,4	0,003	2,3	0,131	1480	3324	3509	3438
332342	399673		Homeobox	0,5	0,202	0,5	0,145	1,4	0,605	2241	1188	1200	3145
317135	436253		Zn2Cys6	0,8	0,096	0,9	0,285	1,2	0,182	7589	6264	6579	9249
	438987		bHLH	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	438992		bHLH	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
155813	439496		Zn2Cys6	1,3	0,239	1,2	0,292	1,2	0,548	11679	14610	13817	13754
335808	439617		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
156491	440138		Myb	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	441366		C2H2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
311992	441703		HSF	2,6	0,013	2,2	0,081	3,6	0,020	6660	17558	14327	23866
312711	441832		C2H2	1,3	0,067	1,2	0,072	0,8	0,572	3486	4596	4199	2948
299086	442607	LbXbp1	APSES	1,5	0,347	1,5	0,007	1,0	1,000	6697	10066	10312	6893
165046	443509	LbCreA	C2H2	2,6	0,042	2,4	0,038	1,4	1,000	1330	3504	3190	1925
150318	444460		HMG	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
294677	444635		C2H2	0,0	0,002	0,0	0,004	0,0	0,004	44595	556	660	555
303137	444686		Zn2Cys6	0,0	0,000	0,0	0,000	0,0	0,096	3015	1	1	57
	445028		bZIP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
334368	445505		C2H2	0,0	0,004	0,0	0,002	0,0	0,061	5132	197	101	228
306911	445893		C2H2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
305186	449185		C2H2	10,7	0,002	11,6	0,002	1,7	0,797	1311	14031	15261	2192

324193	451082		C2H2	1,8	0,022	1,5	0,070	0,8	0,304	21735	39589	31903	17031
323995	451323	LbMedA-1		0,5	0,024	0,4	0,011	0,5	0,087	5240,15	2868,46	1972,38	2762,76
298017	453749		Zn2Cys6	3,6	0,507	1,0	1,000	1,0	1,000	1	4	1	1
306201	455773		APSES	0,6	0,042	0,7	0,112	0,6	0,143	17281	10493	11584	9586
301974	455979		Zn2Cys6	0,3	0,015	0,2	0,007	0,1	0,030	5153	1660	1165	724
325675	456860		TEA/ATTS	0,9	0,590	1,4	0,185	0,3	0,009	3109	2657	4440	901
169971	458057		HMG	0,6	0,010	0,6	0,018	0,9	0,703	51526	30189	30588	46610
294045	458584		C2H2	0,6	0,029	0,7	0,009	0,6	0,200	8858	5488	5799	4994
	459072	LbAsg1	Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
293340	459322		HMG	1,5	0,512	1,7	0,365	0,7	0,524	202	301	336	132
293353	459342		Zn2Cys6	9,1	0,002	8,3	0,009	4,6	0,044	446	4073	3712	2049
293031	459853	LbHap2	Histon fold	1,6	0,029	1,7	0,002	1,4	0,024	19902	32775	32886	27797
335020	460596		Zn2Cys6	1,0	1,000	1,0	1,000	1,0	1,000	1	1	1	1
	461548		bZIP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
294583	462217		bZIP	1,9	0,017	1,5	0,077	2,7	0,069	8712	16690	12920	23170
321741	467042		C2H2	20,0	0,123	31,2	0,057	53,5	0,061	61	1215	1898	3247
313869	476130	LbMetR-1	bZIP	0,9	0,654	0,9	0,320	1,1	0,804	42392	39893	37472	44989
150219	476882	LbFkh2	Forkhead	2,2	0,005	2,2	0,019	1,0	1,000	9510	20452	21168	9500
325558	477979		C2H2	0,9	0,754	0,8	0,455	0,5	0,364	3201	2910	2547	1456
301759	478107		SGT1	0,5	0,021	0,4	0,013	0,8	0,016	4298	2112	1755	3250
301549	479092		C2H2	1,7	0,015	1,6	0,007	2,0	0,036	16503	28830	26673	33201
305984	480375		C2H2	1,9	0,009	1,6	0,017	1,6	0,184	4500	8446	7102	7224
311603	481451	LbReb1	Myb	0,6	0,042	0,6	0,008	0,7	0,038	7392	4341	4161	4972
311738	481594		HMG	0,2	0,008	0,1	0,002	0,2	0,057	9965	1497	1043	1614
311799	481652	LbSak1	RFX	0,6	0,011	0,6	0,010	1,0	1,000	35027	20388	20281	35406
299001	482572		TEA/ATTS	0,7	0,408	0,2	0,009	1,7	0,585	2131	1388	506	3548
298964	482609		HMG	0,4	0,026	0,3	0,002	0,7	0,369	21242	8057	6744	14885
309167	483007		Zn2Cys6	0,4	0,005	0,4	0,003	0,4	0,067	18675	7298	7360	7135
168394	483117	LbMedA-2		3,4	0,005	2,9	0,002	3,6	0,456	804,02	2733,43	2358,48	2900,58
309008	483154		Zn2Cys6	1,2	0,684	1,3	0,432	2,4	0,104	2700	3139	3397	6370
300472	483735		NF-X1	0,3	0,044	0,3	0,007	0,4	0,081	3711	1289	1270	1542
323970/313540	483927		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
303218	483986		Zn2Cys6	0,6	0,149	0,8	0,235	1,5	0,372	3356	2060	2643	5065
316706	484334		Zn2Cys6	13,1	0,048	43,5	0,011	1,0	1,000	1	13	44	1
313151	484764		C2H2	1,6	0,081	2,1	0,066	2,6	0,051	2394	3940	5075	6332

	581905		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
304339	583411		bHLH	4,6	0,005	4,0	0,004	3,1	0,038	773	3576	3107	2387
311707	583431		Zn2Cys6	1,9	0,149	3,2	0,037	2,6	0,217	2279	4365	7355	5910
297118	585149	LbFst3	Zn2Cys6	2,4	0,011	2,3	0,006	2,8	0,241	7858	19247	17871	21837
297200	585421	LbNsdD	GATA	1,9	0,007	2,0	0,026	2,5	0,020	7904	14743	16043	19850
300503	593632	LbXlnR	Zn2Cys6	0,0	0,031	0,0	0,001	0,1	0,017	453	9	1	28
303137	594734		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
333124	594922		TEA/ATTS	1,0	1,000	1,0	1,000	25,2	0,580	1	1	1	25
310368	595372		Zn2Cys6	5,2	0,011	5,4	0,016	4,5	0,041	912	4789	4886	4094
310368	595386		Zn2Cys6	5,2	0,011	5,4	0,016	4,5	0,041	912	4789	4886	4094
314316	595621		Zn2Cys6	2,6	0,007	1,6	0,083	2,0	0,336	947	2504	1495	1883
	595635	LbAcu15-4	Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
334157	595757		Zn2Cys6	0,0	0,013	0,0	0,013	0,1	0,052	361	4	6	28
239654	596083		bZIP	0,4	0,110	0,1	0,150	1,2	1,000	424	184	51	496
	606882		Copper-fist	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
150048	607061		HSF	19,7	0,072	30,4	0,052	4,1	1,000	24	478	739	99
305505	607158	LbZap1	C2H2	0,9	0,849	1,2	0,644	0,5	0,316	453	416	544	214
305537	607166		Zn2Cys6	1,2	0,398	1,2	0,638	1,3	0,333	4010	4932	4753	5408
244290	608593	LbSnt2	Myb	0,1	0,031	0,6	0,040	0,4	0,034	202	30	117	83
298451	608663		C2H2 complex	1,2	0,463	1,3	0,757	3,7	0,016	3299	3932	4371	12226
141130	611756		complex	0,6	0,168	0,6	0,110	0,9	0,771	29829	18226	18295	25722
313765	612492		p53-like	1,1	0,799	1,1	0,367	1,4	0,399	11668	12538	13250	16073
313619	613245		Zn2Cys6	0,5	0,032	0,6	0,008	0,7	0,088	12529	6367	7154	9148
302892	614278		GATA	1031,1	0,002	897,5	0,002	59,5	0,020	2	1760	1532	102
302761	614280		Zn2Cys6	2,7	0,013	2,2	0,011	4,3	0,087	2850	7564	6348	12136
308094	617721		C2H2	1,7	0,788	0,7	0,499	0,8	0,629	405	684	295	335
305751	619068	LbFhl1	Forkhead	2,5	0,051	2,5	0,038	1,3	0,507	5605	13812	14175	7344
334646	619686		C2H2	24,7	0,006	32,4	0,003	1,6	0,284	244	6026	7884	397
	620272		bZIP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	620550		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
296536	621250		C2H2	3,4	0,005	3,4	0,006	1,5	0,718	8199	27792	28036	11947
300881	622364	LbAce1-2	Copper-fist	0,6	0,003	0,6	0,004	0,7	0,043	16435	9234	9744	11124
300968	622520	LbCbf11	p53-like	1,0	0,996	1,0	0,723	0,9	0,370	12866	12725	13219	11074
301156	622851		Forkhead	1,1	0,604	1,1	0,333	0,9	0,567	2647	2843	2922	2375
320903	622992		bHLH	0,5	0,010	0,5	0,015	0,7	0,225	32791	15450	16983	23563

296690	623610		Zn2Cys6	10,9	0,001	8,7	0,000	4,2	0,009	624	6775	5422	2636
142667	623651		C2H2	2,1	0,021	1,4	0,177	1,7	0,336	7044	15028	9571	12291
300743	625521		Zn2Cys6	0,4	0,030	0,5	0,008	0,4	0,049	21789	8980	10633	8958
294648	625677		bHLH	2,1	0,094	2,6	0,019	2,7	0,037	6624	14180	17102	17841
307391	625911		Zn2Cys6	2,7	0,013	2,5	0,015	2,6	0,104	740	2007	1842	1915
311698	628355		Zn2Cys6	1,2	0,596	1,1	0,392	1,1	1,000	8745	10730	9794	9447
312032	628949		Zn2Cys6	1,3	0,324	0,9	0,594	1,5	0,462	8535	11181	7274	12641
294267	629198		Zn2Cys6	0,5	0,008	0,4	0,003	0,9	0,764	11903	6050	4863	10664
296989	629646		Zn2Cys6	2,2	0,012	2,2	0,005	2,2	0,077	11150	25048	24165	24707
309028	630145		Histon fold	1,0	1,000	0,9	0,393	0,7	0,237	15092	15832	13259	10318
294488	633206		C2H2	4,0	0,010	3,6	0,016	4,3	0,027	3425	13800	12480	14730
292128	634738		Zn2Cys6	0,4	0,044	0,4	0,004	0,6	0,166	13046	4743	5453	7368
319718	636228	LbMbf1	HLH type 3	1,9	0,002	2,0	0,000	1,2	0,314	25887	49705	52985	29959
144261	636637	LbIII A	C2H2	0,6	0,014	0,8	0,378	1,0	0,999	5148	2970	4312	4987
313784	636734	LbCrz1-2	C2H2	1,9	0,012	1,9	0,005	1,9	0,046	10653	20144	20577	20297
308109	637785		Zn2Cys6	2,4	0,003	2,3	0,003	1,2	0,537	14549	34524	32922	17937
312467	640940		HMG	0,2	0,010	0,2	0,008	0,2	0,176	8058	1675	1325	1637
306314	643886		C2H2	0,1	0,010	0,1	0,002	0,2	0,034	14062	1410	1310	2769
311571	644689	LbExp1	HMG	1,5	0,035	1,7	0,052	4,2	0,021	7425	11321	12443	31210
327972	648888		HMG	0,2	0,007	0,2	0,014	0,9	0,708	35453	6986	5830	30890
293210	652780	LbHxl1	bZIP	2,8	0,036	3,2	0,021	1,0	1,000	7250	20554	23435	7348
292149	654679	LbAcu15	Zn2Cys6	1,3	0,141	1,0	0,979	1,1	0,683	21947	28805	22414	24585
304198	654916		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
301245	655850		bHLH	1,7	0,012	1,6	0,003	1,6	0,028	29732	50122	46511	46973
292246	656449		TEA/ATTS	7,7	0,002	6,5	0,003	5,0	0,015	3192	24609	20792	15889
311793	657026	LbDevR	bHLH	2,0	0,009	2,3	0,001	1,3	0,637	2401	4750	5543	3019
292536	657699		Homeobox	3,1	0,003	3,0	0,003	1,8	0,164	12441	37966	36862	22606
294333	658142		HMG	0,0	0,003	0,0	0,004	0,1	0,020	25770	1017	1010	1391
176793	660430	NCB2 subunit be	Histon fold	1,0	1,000	1,0	1,000	1,4	0,335	11556	11647	11549	16625
328804	661551		Zn2Cys6	0,1	0,189	0,2	0,103	0,3	0,032	383	55	73	113
294399	663232		bHLH	31,5	0,005	40,1	0,003	14,1	0,021	257	8103	10321	3639
242593	665554	LbYap1	bZIP	0,8	0,236	0,7	0,098	0,7	0,169	14241	10786	10197	10290
301023	666027		Homeobox	1,1	0,244	1,1	0,068	1,1	0,933	19345	20712	20965	21855
301338	666247		Zn2Cys6	3,4	0,002	3,1	0,004	2,9	0,009	7908	26998	24204	22604
227966	667316		GATA	2,1	0,008	2,0	0,026	1,4	0,810	10667	22544	21780	15360

312016	667862	LbAtf2	bZIP	1,5	0,236	1,2	0,778	1,0	1,000	5364	8130	6203	5458
295643	667917		C2H2	10,6	0,001	9,0	0,001	7,9	0,031	2034	21546	18332	16152
297145	668080		GATA	0,5	0,084	0,3	0,018	1,8	0,166	6333	2894	2030	11486
296988	668161	LbNosA	Zn2Cys6	18,9	0,001	16,6	0,001	20,0	0,005	2318	43764	38452	46338
309255	668424		Zn2Cys6	1,1	0,578	0,9	0,947	2,5	0,035	6533	7434	6109	16264
296434	670084		Zn2Cys6/C2H2	0,3	0,034	0,0	0,038	0,5	0,207	1741	505	65	892
254611	670648	LbAcuM-2	Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
302899	671538		GATA	0,4	0,007	0,4	0,002	1,2	0,257	10946	4537	4695	12611
293616	679667		bHLH	0,4	0,016	0,4	0,061	0,6	0,092	4573	1821	1924	2620
300898	680902	LbPrf1	HMG	0,9	0,760	1,2	0,411	0,5	0,154	1793	1534	2203	880
291812	681707		C2H2	1,0	0,819	1,1	0,192	0,9	0,721	24346	24869	26965	22696
291829	681767	LbMSN4	C2H2	1,8	0,011	2,1	0,008	1,3	0,233	12137	22010	24952	15419
318097	682475		Zn2Cys6	0,5	0,046	0,5	0,039	0,8	0,560	9311	4489	4407	7447
305811	683624		Zn2Cys6	0,6	0,098	0,4	0,010	0,5	0,359	2775	1603	1248	1281
311402	685157		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
292733	685209	LbGat1	GATA	13,2	0,001	12,2	0,001	4,9	0,019	2514	33314	30800	12213
311840	685688	LbCol21	Zn2Cys6	0,4	0,003	0,4	0,019	0,8	0,394	5156	1902	1885	4172
	685852		bZIP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
297317	686144		C2H2	1,3	0,033	1,2	0,269	1,5	0,418	3187	4050	3787	4642
325649	687441		bHLH	58,5	0,019	43,3	0,023	13,9	1,000	8	454	336	108
297737	690446		C2H2	0,4	0,057	0,7	0,385	0,5	0,188	2490	1056	1822	1230
297882	690614		YL1	0,9	0,308	0,9	0,546	0,8	0,107	15051	13638	13450	11482
294744	691497	LbSFP1	C2H2	6,5	0,007	3,2	0,012	11,3	0,022	352	2286	1131	3964
317671	691799		HMG	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
166037	694007	LbSwi6	APSES	0,3	0,016	0,4	0,009	0,5	0,098	5267	1457	1961	2874
305344	694069		Myb	2,7	0,009	2,1	0,005	0,7	0,379	2075	5541	4302	1523
	694534		C2H2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	695265		C2H2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
325071	696110		Zn2Cys6	0,7	0,215	0,6	0,013	0,4	0,031	10299	7212	5768	4533
	696146		GRF	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	696456		C2H2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
313819	696532	LbTrm2	C2H2	3,6	0,000	3,3	0,005	1,8	0,070	10960	39007	36611	19882
302769	697312		Zn2Cys6	10,7	0,001	8,4	0,001	7,1	0,065	3106	33282	26167	22050
316204	697356		C2H2	3,2	0,033	2,9	0,084	1,9	0,105	106	340	303	205
295375	697879		GATA	11,4	0,002	12,7	0,002	10,5	0,003	2106	24032	26820	22109

Table S3:

Table S3: List of *L. bicolor* TFs Identified in silico, along with gene expression change in ECM Roots of *P. trichocarpa* and Fruiting Bodies (FB) as compared with FLM. N.A.=data Non Available.

Protein ID version1	Protein ID version2	TF name	Family	ratio <i>P.tricho</i> ECM/FLM	P value <i>P.tricho</i> ECM/FLM	ratio FB/FLM	P value FB/FLM	FLM	<i>P.tricho</i> ECM	Fb
149540	149540	LbNCB1 subunit alpha	Histon fold	1,1	0,970	0,7	0,170	1412	1534	1015
150072	150072	LbCrz1-1	C2H2	4,2	0,050	1,8	0,540	127	539	226
182804	182804	LbISW2	Myb	0,6	0,060	0,5	0,000	11082	6902	5074
190760	190760	LbRsc8	Myb	0,7	0,070	0,6	0,010	11413	7512	7192
231949	231949	LbAda2	Myb	1,4	0,160	1,1	0,700	7623	10432	8155
247901	247901	LbAce1-1	Copper-fist	2,7	0,000	4,2	0,000	1758	4732	7292
292029	292029		Zn2Cys6	12,9	0,000	8,1	0,000	2304	29633	18705
292045	292045	LbCon7	C2H2	0,1	0,000	0,1	0,000	6046	870	626
293207	293207	LbRlm1-1	MAD-box	1,5	0,310	3,3	0,000	524	780	1748
293242	293242	LbGcn4	bZIP	4,5	0,000	2,8	0,000	6035	27194	16933
293563	293563	LbSnf5	GATA							
293949	293949	LbSfu1	GATA	0,9	0,710	0,3	0,000	11967	11119	2946
293988	293988	LbHom2	Homeobox	1,4	0,030	0,2	0,000	16993	24245	3856
294581	294581		bHLH	2,1	0,040	1,8	0,040	1377	2945	2519
296037	296037	LbNrg1	C2H2	1,2	0,420	0,3	0,000	7457	8830	1982
296675	296675		Myb	0,4	0,020	0,2	0,000	2720	941	412
296682	296682	LbAcu15-3	Zn2Cys6	4,8	0,060	0,6	0,120	733	3507	464
297319	297319		Homeobox	1,0	0,720	0,3	0,000	7217	7243	1843
297378	297378		C2H2	2,5	0,000	1,4	0,170	7146	18139	9627
298274	298274	LbAbaA	TEA/ATTS	25,2	0,000	11,6	0,000	1332	33520	15425
299606	299606		GRF	0,5	0,070	0,5	0,000	4070	2036	1932
300072	300072		Zn2Cys6	0,4	0,040	2,0	0,000	2174	904	4273
300474	300474		NF-X1	0,2	0,000	0,2	0,000	6133	1226	1229
300747	300747		Zn2Cys6	0,7	0,050	0,6	0,000	17434	11807	10015
300824	300824	Lbltc1	DTT	0,8	0,430	0,5	0,000	7446	6094	3872
301029	301029		Zn2Cys6	1,1	0,790	0,6	0,010	7094	7638	4300
301089	301089	LbBdp1	Myb	0,6	0,050	0,9	0,710	10879	6274	10230
301103	301103	LbHD1	Homeobox	0,9	0,540	0,4	0,000	6639	5703	2730
301157	301157	LbNirA-1	Zn2Cys6	0,4	0,010	0,5	0,000	5575	2092	2541
301563	301563		C2H2	1,5	0,300	1,4	0,230	851	1291	1180

329739	329739		Zn2Cys6	0,4	0,020	0,9	0,420	1535	585	1322
331730	331730		Zn2Cys6	1,0	1,000	1,0	1,000	1	1	1
332886	332886		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
333101	333101		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
334161	334161		C2H2	0,4	0,050	0,6	0,090	990	415	577
150553	379257	LbPacC	C2H2	2,2	0,000	0,2	0,000	11346	24876	2316
243459	379291	LbHD2	Homeobox	0,9	0,570	0,3	0,000	7089	6142	2335
230018	381332	LbPriB	Zn2Cys6	0,7	0,170	1,1	0,740	4596	3221	4920
312032	383085		Zn2Cys6	1,1	0,710	1,2	0,160	11050	12327	13644
234703	386478	LbPcc1	HMG	0,5	0,010	0,2	0,000	8499	4515	1708
168843	387518	LbWC1		0,3	0,000	0,3	0,000	11666	3039	3549
162920	393192	LbSte12α	C2H2	4,4	0,010	1,6	0,260	212	934	339
295376	393526		Zn2Cys6	33,6	0,000	23,0	0,000	353	11862	8117
	395214		bZIP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
313780	399488	LbAcuK	Zn2Cys6	1,0	0,770	0,7	0,010	20733	19836	14713
297628	399669	LbHom1-2	Homeobox	2,0	0,210	0,9	0,370	2086	4231	1778
332342	399673		Homeobox	0,5	0,040	0,0	0,000	4406	2211	193
317135	436253		Zn2Cys6	0,7	0,150	0,6	0,010	7505	5362	4138
	438987		bHLH	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	438992		bHLH	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
155813	439496		Zn2Cys6	4,0	0,420	4,2	0,190	21	86	90
335808	439617		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
156491	440138		Myb	0,5	0,010	1,2	0,490	7502	3598	8749
	441366		C2H2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
311992	441703		HSF	1,8	0,000	1,1	0,410	10601	19299	12134
312711	441832		C2H2	1,5	0,100	1,7	0,000	4425	6605	7713
299086	442607	LbXbp1	APSES	1,2	0,600	0,1	0,000	13139	15879	1105
165046	443509	LbCreA	C2H2	3,6	0,000	1,2	0,530	1455	5279	1693
150318	444460		HMG	0,5	0,160	2,0	0,010	1201	651	2347
294677	444635		C2H2	0,1	0,000	0,0	0,000	16740	1191	405
303137	444686		Zn2Cys6	0,1	0,050	0,6	0,050	3082	271	1938
	445028		bZIP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
334368	445505		C2H2	0,1	0,000	0,2	0,000	4253	343	709
306911	445893		C2H2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
305186	449185		C2H2	1,7	0,230	2,2	0,020	735	1281	1619

324193	451082		C2H2	1,2	0,180	1,1	0,660	25940	31203	27542
323995	451323	LbMedA-1		0,9	0,470	0,6	0,000	13574	11744	7897
298017	453749		Zn2Cys6	1,0	1,000	1,0	1,000	1	1	1
306201	455773		APSES	0,6	0,010	0,4	0,000	23122	14550	9181
301974	455979		Zn2Cys6	0,2	0,000	0,6	0,010	5618	829	3278
325675	456860		TEA/ATTS	0,7	0,240	0,5	0,010	3442	2472	1706
169971	458057		HMG	0,8	0,080	0,1	0,000	40807	33191	3105
294045	458584		C2H2	0,8	0,150	0,8	0,140	7664	5733	5766
	459072	LbAsg1	Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
293340	459322		HMG	0,9	0,350	0,6	0,090	1321	1241	738
293353	459342		Zn2Cys6	8,1	0,000	1,4	0,380	1022	8220	1411
293031	459853	LbHap2	Histon fold	1,1	0,440	0,6	0,000	19057	21531	11472
335020	460596		Zn2Cys6	1,0	1,000	1,0	1,000	1	1	1
	461548		bZIP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
294583	462217		bZIP	1,7	0,080	1,7	0,010	5013	8453	8535
321741	467042		C2H2	48,2	0,000	1,7	0,390	63	3038	108
313869	476130	LbMetR-1	bZIP	0,9	0,280	0,8	0,020	36138	32092	27735
150219	476882	LbFkh2	Forkhead	1,3	0,430	1,4	0,020	10433	13325	14860
325558	477979		C2H2	0,4	0,040	0,3	0,000	2844	1162	800
301759	478107		SGT1	0,6	0,070	1,0	0,890	5353	3266	5517
301549	479092		C2H2	1,6	0,000	1,2	0,070	19296	30141	23691
305984	480375		C2H2	1,0	0,980	0,9	0,790	5311	5268	5012
311603	481451	LbReb1	Myb	0,6	0,050	1,0	0,920	9210	5481	9041
311738	481594		HMG	0,1	0,000	0,1	0,000	10045	1254	1059
311799	481652	LbSak1	RFX	0,8	0,020	0,5	0,000	40509	30968	19070
299001	482572		TEA/ATTS	0,6	0,080	1,0	0,920	5634	3540	5558
298964	482609		HMG	0,4	0,000	0,1	0,000	19778	7945	2863
309167	483007		Zn2Cys6	0,4	0,000	0,3	0,000	12913	4700	4254
168394	483117	LbMedA-2		6,8	0,000	9,4	0,000	716	4835	6722
309008	483154		Zn2Cys6	1,3	0,390	0,6	0,040	5690	7161	3592
300472	483735		NF-X1	0,5	0,010	0,6	0,010	7501	3463	4359
323970/313540	483927		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
303218	483986		Zn2Cys6	0,7	0,210	0,4	0,000	5218	3800	2079
316706	484334		Zn2Cys6	0,4	0,470	0,0	0,000	104	43	3
313151	484764		C2H2	2,4	0,200	10,1	0,000	1660	3933	16712

	581905		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
304339	583411		bHLH	1,4	0,290	2,7	0,000	1843	2576	5009
311707	583431		Zn2Cys6	1,1	0,970	0,4	0,000	4754	5366	1993
297118	585149	LbFst3	Zn2Cys6	1,9	0,010	2,3	0,000	13924	26082	32508
297200	585421	LbNsdD	GATA	1,0	0,930	0,6	0,000	13591	14132	7508
300503	593632	LbXlnR	Zn2Cys6	0,1	0,070	1,4	0,290	983	48	1348
303137	594734		Zn2Cys6	0,1	0,050	0,6	0,050	3082	271	1938
333124	594922		TEA/ATTS	0,3	0,480	0,3	0,190	116	39	30
310368	595372		Zn2Cys6	1,4	0,210	0,2	0,000	2525	3591	470
310368	595386		Zn2Cys6	1,4	0,210	0,2	0,000	2525	3591	470
314316	595621		Zn2Cys6	1,7	0,980	0,3	0,000	1741	2958	549
	595635	LbAcu15-4	Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
334157	595757		Zn2Cys6	0,6	0,250	0,4	0,020	503	286	198
239654	596083		bZIP	0,6	0,200	4,3	0,000	531	298	2304
	606882		Copper-fist	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
150048	607061		HSF	0,1	0,030	0,1	0,040	80	6	7
305505	607158	LbZap1	C2H2	0,9	0,640	0,8	0,410	499	437	372
305537	607166		Zn2Cys6	1,9	0,010	0,5	0,010	3171	5976	1638
244290	608593	LbSnt2	Myb	0,3	0,090	0,2	0,000	408	131	79
298451	608663		C2H2	1,0	0,840	1,3	0,260	2973	2939	3709
141130	611756		CCR4-Not complex componer	0,6	0,010	0,4	0,000	15734	8863	6763
313765	612492		p53-like	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
313619	613245		Zn2Cys6	0,7	0,080	0,7	0,010	22653	16490	16166
302892	614278		GATA	4,6	0,250	5,3	0,010	56	261	297
302761	614280		Zn2Cys6	4,0	0,000	4,0	0,000	3331	13292	13172
308094	617721		C2H2	0,8	0,310	1,4	0,310	1655	1310	2334
305751	619068	LbFhl1	Forkhead	0,8	0,240	1,2	0,190	6039	4505	7482
334646	619686		C2H2	3,9	0,000	3,0	0,010	299	1171	896
	620272		bZIP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	620550		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
296536	621250		C2H2	1,8	0,030	0,2	0,000	10073	18172	1646
300881	622364	LbAce1-2	Copper-fist	0,8	0,130	0,8	0,050	20314	15146	15705
300968	622520	LbCbf11	p53-like	1,1	0,790	1,4	0,090	10043	10886	13513
301156	622851		Forkhead	1,0	0,790	1,1	0,620	3123	3000	3444
320903	622992		bHLH	0,6	0,000	0,5	0,000	38399	22521	18353

296690	623610		Zn2Cys6	4,2	0,000	4,1	0,000	507	2102	2087
142667	623651		C2H2	2,1	0,000	1,3	0,420	6988	14828	8881
300743	625521		Zn2Cys6	0,6	0,020	0,2	0,000	16186	9228	3916
294648	625677		bHLH	2,0	0,000	1,0	0,970	10099	19790	10183
307391	625911		Zn2Cys6	1,1	0,850	0,5	0,010	2465	2743	1133
311698	628355		Zn2Cys6	1,1	0,810	1,3	0,060	13015	14333	16915
312032	628949		Zn2Cys6	1,1	0,710	1,2	0,160	11050	12327	13644
294267	629198		Zn2Cys6	0,7	0,090	0,5	0,000	13530	9256	6775
296989	629646		Zn2Cys6	2,0	0,000	0,8	0,050	11840	23757	8977
309028	630145		Histon fold	1,1	0,860	1,5	0,020	8136	8555	12375
294488	633206		C2H2	3,1	0,000	1,5	0,030	4893	15283	7238
292128	634738		Zn2Cys6	0,7	0,080	0,5	0,000	20282	14479	10730
319718	636228	LbMbf1	HLH type 3	1,4	0,010	1,4	0,000	25846	34951	37078
144261	636637	LbIIIA	C2H2	0,5	0,030	1,2	0,440	7346	3706	8448
313784	636734	LbCrz1-2	C2H2	1,6	0,000	1,5	0,000	15627	25083	24136
308109	637785		Zn2Cys6	1,5	0,070	1,7	0,170	6531	9971	10751
312467	640940		HMG	0,1	0,000	0,0	0,000	8819	1074	25
306314	643886		C2H2	0,2	0,000	0,2	0,000	7206	1713	1394
311571	644689	LbExp1	HMG	3,2	0,000	1,9	0,000	4936	15580	9363
327972	648888		HMG	0,7	0,040	0,3	0,000	21169	14527	6969
293210	652780	LbHxl1	bZIP	1,4	0,260	1,2	0,450	11903	16087	14078
292149	654679	LbAcu15	Zn2Cys6	1,3	0,230	0,8	0,150	9744	12895	7624
304198	654916		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
301245	655850		bHLH	1,6	0,000	1,2	0,060	23839	38389	29009
292246	656449		TEA/ATTS	6,5	0,000	4,0	0,000	3686	24060	14610
311793	657026	LbDevR	bHLH	1,8	0,090	1,0	0,890	2885	5074	2776
292536	657699		Homeobox	2,2	0,000	1,1	0,840	12573	27757	13407
294333	658142		HMG	0,1	0,000	0,1	0,000	24306	2142	1798
176793	660430	LbNCB2 subunit beta	Histon fold	1,6	0,080	1,8	0,000	10857	16854	19582
328804	661551		Zn2Cys6	0,6	0,140	2,3	0,000	965	530	2223
294399	663232		bHLH	3,6	0,000	11,2	0,000	581	2118	6508
242593	665554	LbYap1	bZIP	0,7	0,110	0,7	0,020	15000	10388	9787
301023	666027		Homeobox	1,2	0,520	0,7	0,010	19878	22794	13745
301338	666247		Zn2Cys6	2,9	0,000	1,9	0,000	6563	18843	12419
227966	667316		GATA	2,9	0,000	1,1	0,540	6593	19057	7361

312016	667862	LbAtf2	bZIP	0,8	0,370	3,0	0,000	6255	4915	18628
295643	667917		C2H2	9,0	0,000	2,9	0,000	2296	20738	6687
297145	668080		GATA	0,8	0,290	0,4	0,000	8479	6448	3009
296988	668161	LbNosA	Zn2Cys6	17,5	0,000	6,8	0,000	2928	51270	20006
309255	668424		Zn2Cys6	1,8	0,020	0,2	0,000	8672	15989	1807
296434	670084		C2H2	0,5	0,040	0,9	0,620	3388	1844	3026
254611	670648	LbAcuM-2	Zn2Cys6	1,2	0,650	1,6	0,010	3865	4461	6342
302899	671538		GATA	0,8	0,190	1,1	0,570	14514	11176	15808
293616	679667		bHLH	0,3	0,010	0,2	0,000	2359	605	522
300898	680902	LbPrf1	HMG	0,8	0,430	1,4	0,110	2820	2362	3975
291812	681707		C2H2	1,5	0,100	1,8	0,000	4847	7023	8940
291829	681767	LbMSN4	C2H2	1,4	0,040	1,1	0,420	17380	23558	19263
318097	682475		Zn2Cys6	0,8	0,130	0,7	0,030	12149	9068	7953
305811	683624		Zn2Cys6	0,8	0,300	0,5	0,000	6933	5819	3691
311402	685157		Zn2Cys6	0,4	0,000	0,3	0,000	12717	5653	3565
292733	685209	LbGat1	GATA	5,5	0,000	1,1	0,700	2889	15747	3064
311840	685688	LbCol21	Zn2Cys6	0,7	0,090	0,6	0,010	6672	4518	4032
	685852		bZIP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
297317	686144		C2H2	0,8	0,500	1,0	0,870	4999	4030	4843
325649	687441		bHLH	1,0	0,770	0,7	0,200	1485	1551	1046
297737	690446		C2H2	0,6	0,060	0,4	0,000	5974	3443	2324
297882	690614		YL1	0,8	0,190	0,9	0,360	14323	11123	12636
294744	691497	LbSFP1	C2H2	2,7	0,000	1,3	0,470	2073	5586	2638
317671	691799		HMG	0,3	0,000	0,4	0,000	7301	2448	3239
166037	694007	LbSwi6	APSES	0,3	0,000	0,2	0,000	10560	3157	1566
305344	694069		Myb	0,6	0,280	1,2	0,720	1283	816	1532
	694534		C2H2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	695265		C2H2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
325071	696110		Zn2Cys6	0,9	0,360	0,4	0,000	8943	8072	3721
	696146		GRF	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	696456		C2H2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
313819	696532	LbTrm2	C2H2	1,3	0,140	0,6	0,000	17414	22840	11131
302769	697312		Zn2Cys6	6,2	0,000	6,2	0,000	3694	22845	22946
316204	697356		C2H2	2,6	0,460	2,7	0,020	286	751	773
295375	697879		GATA	7,8	0,000	3,0	0,000	1858	14452	5607

Table S4:

Table S4: List of *L. bicolor* TFs Identified in silico, along with gene expression change in ECM Roots of *P. trichocarpa* as compared with FLM, during a time-course of ECM development. N.A.=data Non Available.

Protein ID version1	Protein ID version2	TF name	Family	ratio 2W/FLM	P value 2W/FLM	ratio 4W/FLM	P value 4W/FLM	ratio 6W/FLM	P value 6W/FLM	ratio 12W/FLM	P value 12W/FLM	FLM	2W ECM	4W ECM	6W ECM	12W ECM
149540	149540	ICB1 subunit al	Histon fold	1,8	0,297	1,1	0,604	0,5	0,416	1,5	0,585	1443	2666	1560	770	2150
150072	150072	LbCrz1-1	C2H2	4,6	0,656	4,5	0,811	18,6	0,016	3,1	0,850	30	140	136	566	94
182804	182804	LbISW2	Myb	0,3	0,043	0,7	0,180	0,5	0,096	0,0	0,012	4698	1226	3120	2298	192
190760	190760	LbRsc8	Myb	0,1	0,007	0,7	0,081	0,1	0,010	0,1	0,000	8597	849	5993	1168	522
231949	231949	LbAda2	Myb	0,1	0,003	0,5	0,245	0,3	0,133	0,2	0,033	2568	181	1410	747	514
247901	247901	LbAce1-1	Copper-fist	0,3	0,126	1,9	0,394	0,4	0,265	0,2	0,118	1675	423	3145	728	391
292029	292029		Zn2Cys6	6,7	0,000	15,7	0,000	26,6	0,000	30,6	0,000	976	6539	15289	25989	29903
292045	292045	LbCon7	C2H2	0,5	0,191	0,6	0,320	0,4	0,138	0,4	0,070	2538	1280	1532	960	1014
293207	293207	LbRlm1-1	MAD-box	13,7	0,019	8,0	0,382	3,4	0,741	7,1	0,459	19	266	157	67	138
293242	293242	LbGcn4	bZIP	1,2	0,826	1,5	0,508	1,4	0,413	2,2	0,001	11941	14427	18106	16744	26182
293563	293563	LbSnf5	GATA													
293949	293949	LbSfu1	GATA	0,8	0,510	1,2	0,563	0,8	0,539	1,0	0,846	18928	15849	22492	15884	19828
293988	293988	LbHom2	Homeobox	0,1	0,000	0,6	0,104	0,2	0,002	0,1	0,000	20056	2348	11784	4166	1631
294581	294581		bHLH	9,9	0,000	6,8	0,012	5,7	0,013	11,3	0,000	484	4771	3273	2764	5473
296037	296037	LbNrg1	C2H2	0,6	0,175	1,2	0,604	0,6	0,165	0,6	0,200	5178	2942	6213	3263	3270
296675	296675		Myb	1,5	0,907	2,4	0,286	2,7	0,108	7,6	0,000	829	1222	2020	2237	6340
296682	296682	LbAcu15-3	Zn2Cys6	1,2	0,413	3,6	0,040	4,4	0,019	3,4	0,346	693	839	2486	3083	2360
297319	297319		Homeobox	0,0	0,002	0,1	0,070	0,0	0,002	0,0	0,000	3236	153	454	146	1
297378	297378		C2H2	0,5	0,055	1,1	0,535	1,1	0,999	0,3	0,009	5710	2902	6047	6254	1816
298274	298274	LbAbaA	TEA/ATTS	3,6	0,604	24,3	0,000	65,0	0,001	11,3	0,000	87	311	2112	5662	982
299606	299606		GRF	0,2	0,096	0,7	0,219	0,4	0,188	0,1	0,008	2847	647	1905	1131	260
300072	300072		Zn2Cys6	0,0	0,000	0,0	0,018	0,0	0,004	0,0	0,000	891	1	43	18	1
300474	300474		NF-X1	0,3	0,107	0,5	0,376	0,6	0,367	0,4	0,086	1884	645	1027	1170	821
300747	300747		Zn2Cys6	1,2	0,607	1,4	0,418	0,7	0,203	1,3	0,363	6506	7833	8786	4458	8718
300824	300824	Lbltc1	DTT	1,9	0,139	1,3	0,724	1,5	0,478	1,1	0,827	2603	4875	3327	3867	2922
301029	301029		Zn2Cys6	0,5	0,050	1,1	0,780	0,7	0,218	0,6	0,152	5550	2593	6181	3716	3368
301089	301089	LbBdp1	Myb	0,1	0,011	0,5	0,083	0,1	0,048	0,1	0,007	6969	754	3592	449	930
301103	301103	LbHD1	Homeobox	3,1	0,006	2,0	0,260	1,1	0,261	2,4	0,225	1387	4360	2749	1461	3372
301157	301157	LbNirA-1	Zn2Cys6	0,7	0,186	0,2	0,123	0,2	0,071	1,8	0,349	2408	1598	443	486	4443
301563	301563		C2H2	0,6	0,231	3,0	0,701	2,3	0,854	4,9	0,995	86	50	254	200	417

329739	329739		Zn2Cys6	11,2	0,005	4,4	0,411	8,6	0,087	11,8	0,000	170	1903	752	1454	2012
331730	331730		Zn2Cys6	305,9	0,022	238,0	0,424	1630,6	0,102	248,2	0,019	1	306	238	1631	248
332886	332886		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
333101	333101		Zn2Cys6	3,0	0,398	1,5	0,768	2,0	0,715	2,6	0,050	382	1136	589	779	1010
334161	334161		C2H2	0,5	0,174	0,4	0,164	0,9	0,429	0,7	0,389	2349	1284	972	2008	1650
150553	379257	LbPacC	C2H2	0,0	0,000	0,5	0,076	0,1	0,001	0,1	0,000	18764	558	9489	2303	2260
243459	379291	LbHD2	Homeobox	0,4	0,100	0,8	0,334	0,4	0,101	0,3	0,082	3058	1128	2312	1132	969
230018	381332	LbPriB	Zn2Cys6	0,9	0,591	1,1	0,929	0,9	0,530	0,5	0,100	4198	3629	4509	3639	2046
312032	383085		Zn2Cys6	1,5	0,380	1,9	0,159	1,9	0,159	1,3	0,488	3721	5465	7024	6909	4951
234703	386478	LbPcc1	HMG	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
168843	387518	LbWC1		0,3	0,061	0,6	0,180	0,5	0,150	0,2	0,008	4089	1225	2257	2233	927
162920	393192	LbSte12α	C2H2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
295376	393526		Zn2Cys6	3,5	0,794	10,5	0,000	12,8	0,000	17,8	0,000	247	873	2584	3156	4395
	395214		bZIP	3,8	0,386	54,6	0,002	60,0	0,000	29,7	0,000	168	642	9196	10107	4995
313780	399488	LbAcuK	Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
297628	399669	LbHom1-2	Homeobox	1,9	0,212	2,4	0,058	3,2	0,021	2,0	0,095	1469	2730	3528	4640	2976
332342	399673		Homeobox	0,4	0,127	0,5	0,121	0,6	0,163	0,7	0,270	3182	1292	1613	1874	2230
317135	436253		Zn2Cys6	0,8	0,545	1,1	0,949	1,2	0,863	0,7	0,303	4061	3202	4363	4815	2785
	438987		bHLH	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	438992		bHLH	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
155813	439496		Zn2Cys6	0,8	0,582	0,7	0,374	1,0	0,929	1,2	0,482	7470	6331	5459	7664	9316
335808	439617		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
156491	440138		Myb	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	441366		C2H2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
311992	441703		HSF	0,2	0,007	1,5	0,189	0,3	0,052	0,2	0,006	6454	1518	9971	2191	1131
312711	441832		C2H2	1,2	0,933	1,1	0,920	1,3	0,814	1,0	0,832	2142	2490	2415	2683	2201
299086	442607	LbXbp1	APSES	0,0	0,019	1,1	0,583	0,4	0,147	0,1	0,035	2845	68	3024	1118	343
165046	443509	LbCreA	C2H2	0,0	0,000	2,1	0,413	0,4	0,037	3,3	0,058	396	1	827	173	1295
150318	444460		HMG	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
294677	444635		C2H2	0,2	0,001	0,1	0,003	0,2	0,006	0,2	0,000	14331	2499	1664	2639	2385
303137	444686		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	445028		bZIP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
334368	445505		C2H2	2,4	0,538	0,8	0,421	0,2	0,013	3,3	0,377	224	546	184	39	745
306911	445893		C2H2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
305186	449185		C2H2	0,8	0,680	0,8	0,602	1,5	0,851	0,9	0,590	1127	914	956	1685	968

324193	451082		C2H2	0,2	0,005	0,8	0,324	0,5	0,065	0,3	0,001	11873	2680	9506	5896	3033
323995	451323	LbMedA-1		0,3	0,130	0,4	0,227	0,5	0,250	0,4	0,069	2823	973	1201	1359	1256
298017	453749		Zn2Cys6	867,9	0,000	616,9	0,397	1094,8	0,046	1067,7	0,000	1	868	617	1095	1068
306201	455773		APSES	0,1	0,000	0,4	0,015	0,2	0,007	0,1	0,000	20340	1408	7742	3938	1882
301974	455979		Zn2Cys6	1,9	0,458	0,5	0,282	1,0	0,915	1,5	0,461	1807	3434	907	1775	2680
325675	456860		TEA/ATTS	0,1	0,027	0,1	0,025	0,1	0,047	0,1	0,001	4721	359	291	542	484
169971	458057		HMG	0,1	0,000	0,7	0,088	0,1	0,001	0,1	0,000	41539	3474	27580	5751	2610
294045	458584		C2H2	0,5	0,050	0,5	0,094	0,4	0,134	0,3	0,005	5586	2721	2547	2370	1522
	459072	LbAsg1	Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
293340	459322		HMG	9,1	0,360	3,8	0,856	18,0	0,137	25,3	0,614	17	157	65	312	439
293353	459342		Zn2Cys6	2,2	0,550	3,5	0,156	4,5	0,442	4,8	0,393	345	770	1193	1549	1652
293031	459853	LbHap2	Histon fold	0,5	0,029	0,8	0,534	0,5	0,070	0,4	0,016	19433	9464	16192	9792	8367
335020	460596		Zn2Cys6	52,9	0,417	41,3	0,426	8,3	0,419	62,1	0,414	1	53	41	8	62
	461548		bZIP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
294583	462217		bZIP	0,6	0,213	1,2	0,715	0,9	0,609	0,8	0,607	6987	4510	8436	6325	5874
321741	467042		C2H2	87,4	0,028	168,2	0,000	368,7	0,000	61,3	0,006	6	509	979	2146	357
313869	476130	LbMetR-1	bZIP	0,1	0,000	0,5	0,038	0,2	0,002	0,0	0,000	31923	1638	15453	7839	1126
150219	476882	LbFkh2	Forkhead	0,0	0,014	0,5	0,068	0,3	0,072	0,0	0,009	7885	371	3690	1998	194
325558	477979		C2H2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
301759	478107		SGT1	1,2	0,756	1,3	0,720	1,2	0,555	0,6	0,240	1955	2333	2583	2401	1234
301549	479092		C2H2	0,7	0,126	1,0	0,402	0,8	0,140	0,2	0,001	13012	9591	13214	10030	3185
305984	480375		C2H2	0,3	0,068	0,8	0,513	1,2	0,742	0,1	0,008	3097	1017	2445	3594	439
311603	481451	LbReb1	Myb	0,4	0,140	0,9	0,568	0,3	0,144	0,6	0,136	2576	1027	2329	892	1513
311738	481594		HMG	1,9	0,295	0,9	0,710	2,3	0,165	1,1	0,702	1797	3391	1647	4122	1899
311799	481652	LbSak1	RFX	0,4	0,021	0,7	0,166	0,5	0,032	0,1	0,000	28418	11505	20572	13560	3461
299001	482572		TEA/ATTS	0,3	0,010	0,6	0,190	1,1	0,172	0,0	0,000	1890	489	1119	2057	1
298964	482609		HMG	0,3	0,004	0,7	0,145	0,2	0,004	0,1	0,000	18534	4701	12630	3522	1024
309167	483007		Zn2Cys6	0,2	0,002	0,2	0,001	0,3	0,015	0,2	0,000	14186	3130	2761	4189	2740
168394	483117	LbMedA-2		0,1	0,012	0,5	0,352	0,6	0,260	0,2	0,046	1223	71	568	790	193
309008	483154		Zn2Cys6	0,3	0,129	2,3	0,475	0,8	0,313	0,1	0,013	1960	494	4445	1571	136
300472	483735		NF-X1	0,0	0,000	0,3	0,173	0,3	0,111	0,0	0,000	1266	13	414	433	16
323970/313540	483927		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
303218	483986		Zn2Cys6	0,6	0,216	1,4	0,628	1,3	0,859	0,5	0,108	2945	1882	4174	3793	1448
316706	484334		Zn2Cys6	474,7	0,000	156,2	0,422	726,5	0,029	573,9	0,000	1	475	156	726	574
313151	484764		C2H2	1,2	0,659	4,2	0,265	2,7	0,787	1,6	0,943	553	662	2339	1471	901

	581905		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
304339	583411		bHLH	0,2	0,138	0,8	0,645	0,3	0,414	0,1	0,034	857	178	706	258	92
311707	583431		Zn2Cys6	0,8	0,439	2,2	0,528	0,3	0,216	0,8	0,382	1712	1337	3714	581	1334
297118	585149	LbFst3	Zn2Cys6	0,0	0,000	1,3	0,245	0,6	0,067	0,0	0,000	5985	4	7550	3401	1
297200	585421	LbNsdD	GATA	0,3	0,023	0,9	0,537	0,6	0,125	0,4	0,010	7650	2609	6559	4473	3027
300503	593632	LbXlnR	Zn2Cys6	9,7	0,607	1,3	0,294	10,9	0,913	10,7	0,039	26	257	33	287	282
303137	594734		Zn2Cys6	0,0	0,000	0,0	0,004	0,0	0,001	0,0	0,000	717	14	9	33	1
333124	594922		TEA/ATTS	7,0	0,420	73,4	0,420	27,6	0,274	1,0	1,000	1	7	73	28	1
310368	595372		Zn2Cys6	0,2	0,150	2,6	0,379	0,8	0,288	0,3	0,108	1663	387	4321	1299	544
310368	595386		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
314316	595621		Zn2Cys6	1,4	0,802	2,3	0,156	1,7	0,486	1,6	0,385	1083	1478	2506	1833	1706
	595635	LbAcu15-4	Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
334157	595757		Zn2Cys6	11,2	0,559	11,8	0,500	8,2	0,744	10,9	0,141	55	615	646	448	595
239654	596083		bZIP	2,7	0,549	3,9	0,290	3,0	0,750	5,4	0,115	301	800	1170	912	1635
	606882		Copper-fist	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
150048	607061		HSF	930,4	0,000	519,1	0,410	762,1	0,040	743,7	0,004	1	930	519	762	744
305505	607158	LbZap1	C2H2	3,0	0,190	2,5	0,393	1,6	0,984	2,2	0,417	272	812	684	433	591
305537	607166		Zn2Cys6	0,1	0,022	1,1	0,654	0,3	0,161	0,1	0,023	2506	162	2824	721	173
244290	608593	LbSnt2	Myb	0,8	0,077	0,3	0,217	1,7	0,672	1,1	0,493	127	102	43	217	138
298451	608663		C2H2	3,3	0,601	4,6	0,024	4,1	0,040	5,5	0,001	350	1167	1624	1431	1940
141130	611756		CCR4-Not complex compc	1,0	0,448	1,1	0,663	0,8	0,259	0,6	0,070	18518	18508	19569	15573	11597
313765	612492		p53-like	0,0	0,000	0,7	0,069	0,0	0,000	0,0	0,000	5450	1	3703	49	1
313619	613245		Zn2Cys6	0,2	0,008	0,7	0,156	0,3	0,015	0,1	0,000	9326	1808	6638	2809	652
302892	614278		GATA	33,1	0,423	1,0	1,000	166,8	0,172	83,8	0,192	1	33	1	167	84
302761	614280		Zn2Cys6	0,0	0,010	2,4	0,520	1,3	0,458	0,2	0,040	1670	69	4024	2105	271
308094	617721		C2H2	24,0	0,011	5,4	0,846	10,1	0,061	20,9	0,000	175	4190	940	1758	3645
305751	619068	LbFhl1	Forkhead	0,3	0,046	1,0	0,989	0,7	0,448	0,5	0,044	6874	2271	7181	5065	3382
334646	619686		C2H2	6,7	0,019	6,8	0,589	7,8	0,897	6,7	0,001	152	1020	1030	1182	1013
	620272		bZIP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	620550		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
296536	621250		C2H2	0,0	0,009	0,9	0,211	0,7	0,023	0,0	0,000	11853	176	10638	8004	380
300881	622364	LbAce1-2	Copper-fist	0,1	0,009	0,5	0,098	0,2	0,018	0,2	0,001	8009	1038	3949	1614	1342
300968	622520	LbCbfl1	p53-like	0,0	0,000	0,5	0,069	0,1	0,048	0,0	0,000	8166	42	4394	595	1
301156	622851		Forkhead	0,2	0,050	0,4	0,161	0,3	0,173	0,1	0,029	2141	388	885	638	114
320903	622992		bHLH	0,1	0,000	0,7	0,137	0,3	0,006	0,1	0,000	22560	1888	15060	6382	1758

296690	623610		Zn2Cys6	0,7	0,425	0,9	0,629	1,5	0,799	1,2	0,937	1877	1376	1762	2851	2271
142667	623651		C2H2	0,6	0,164	0,8	0,425	0,9	0,558	1,3	0,623	5265	3041	4101	4870	7081
300743	625521		Zn2Cys6	0,1	0,002	0,7	0,141	0,4	0,029	0,0	0,000	12109	1685	8755	5134	22
294648	625677		bHLH	0,1	0,000	0,8	0,086	0,2	0,005	0,1	0,000	15699	1679	11873	2822	1695
307391	625911		Zn2Cys6	0,3	0,157	0,7	0,377	0,5	0,164	0,3	0,261	773	260	512	388	261
311698	628355		Zn2Cys6	2,1	0,302	1,2	0,669	1,3	0,824	1,1	0,862	3204	6861	3695	4292	3638
312032	628949		Zn2Cys6	1,5	0,380	1,9	0,159	1,9	0,159	1,3	0,488	3721	5465	7024	6909	4951
294267	629198		Zn2Cys6	0,2	0,013	0,8	0,334	0,4	0,047	0,0	0,023	8067	1278	6744	3114	392
296989	629646		Zn2Cys6	1,2	0,859	1,8	0,088	1,9	0,145	0,9	0,591	8901	10696	16345	16500	7624
309028	630145		Histon fold	2,2	0,026	1,0	0,876	1,3	0,640	2,4	0,008	6514	14503	6554	8394	15824
294488	633206		C2H2	0,3	0,091	2,1	0,460	1,3	0,635	0,2	0,037	2149	617	4474	2803	523
292128	634738		Zn2Cys6	0,2	0,011	0,8	0,296	0,3	0,048	0,2	0,005	6861	1527	5169	2169	1687
319718	636228	LbMbf1	HLH type 3	0,9	0,267	0,7	0,211	0,5	0,039	0,9	0,318	27258	24917	18866	13585	24468
144261	636637	LbIIIA	C2H2	0,8	0,443	1,0	0,833	0,8	0,556	0,7	0,289	2685	2110	2720	2154	1822
313784	636734	LbCrz1-2	C2H2	0,5	0,030	0,9	0,408	0,7	0,114	0,1	0,000	9148	4616	8337	5984	1276
308109	637785		Zn2Cys6	0,1	0,004	0,9	0,408	0,3	0,037	0,3	0,005	8792	1285	7798	2910	2707
312467	640940		HMG	0,0	0,009	0,5	0,070	0,2	0,016	0,0	0,010	8447	346	4111	1341	242
306314	643886		C2H2	0,5	0,168	0,8	0,673	0,5	0,281	0,7	0,356	2498	1186	2054	1353	1863
311571	644689	LbExp1	HMG	0,3	0,009	1,5	0,836	0,4	0,065	0,3	0,005	6702	1753	10124	2618	1872
327972	648888		HMG	0,0	0,000	0,5	0,048	0,1	0,000	0,0	0,001	34125	884	17927	3975	157
293210	652780	LbHxl1	bZIP	0,1	0,014	1,0	0,373	0,2	0,044	0,2	0,003	5599	822	5610	1388	1162
292149	654679	LbAcu15	Zn2Cys6	0,4	0,016	1,3	0,382	0,9	0,197	0,1	0,003	11523	4325	14833	10610	1504
304198	654916		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
301245	655850		bHLH	0,6	0,074	1,1	0,592	0,7	0,232	0,2	0,001	25821	14427	27928	17567	5960
292246	656449		TEA/ATTS	1,6	0,645	1,4	0,857	1,8	0,510	3,2	0,196	3770	6164	5314	6968	12071
311793	657026	LbDevR	bHLH	0,2	0,047	0,9	0,352	0,4	0,148	0,2	0,020	3648	690	3295	1390	616
292536	657699		Homeobox	0,1	0,001	0,8	0,191	0,2	0,006	0,2	0,000	11465	1233	9344	2304	1775
294333	658142		HMG	0,1	0,033	0,1	0,041	0,1	0,020	0,2	0,007	5285	693	450	432	1011
176793	660430	VCB2 subunit b	Histon fold	1,9	0,113	1,6	0,567	1,1	0,982	2,7	0,006	7369	14166	11981	8329	19633
328804	661551		Zn2Cys6	2,3	0,515	0,5	0,304	1,4	0,943	1,5	0,820	236	551	107	335	347
294399	663232		bHLH	0,7	0,471	2,6	0,439	2,2	0,329	1,6	0,721	594	409	1540	1282	938
242593	665554	LbYap1	bZIP	1,5	0,367	1,2	0,448	0,9	0,201	0,7	0,078	6917	10216	8208	5981	5016
301023	666027		Homeobox	1,6	0,061	0,9	0,685	1,0	0,909	1,7	0,042	14257	22934	12741	13843	24829
301338	666247		Zn2Cys6	0,3	0,017	1,0	0,399	1,1	0,711	0,2	0,005	6742	2119	6699	7192	1470
227966	667316		GATA	0,2	0,005	0,7	0,224	0,5	0,071	0,0	0,001	9827	1644	6551	5025	355

312016	667862	LbAtf2	bZIP	1,6	0,481	1,4	0,593	1,6	0,684	2,0	0,082	2607	4112	3770	4226	5135
295643	667917		C2H2	0,7	0,246	1,0	0,684	2,1	0,689	1,0	0,848	3243	2249	3209	6830	3093
297145	668080		GATA	0,8	0,345	1,9	0,116	1,3	0,921	0,9	0,546	5959	4470	11252	7456	5080
296988	668161	LbNosA	Zn2Cys6	0,1	0,058	3,3	0,668	3,4	0,359	0,8	0,192	4250	583	14165	14340	3489
309255	668424		Zn2Cys6	0,4	0,142	3,7	0,577	1,8	0,357	0,1	0,005	1776	781	6511	3230	183
296434	670084		C2H2	0,0	0,000	0,3	0,153	0,3	0,216	0,7	0,273	1211	7	422	319	845
254611	670648	LbAcuM-2	Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
302899	671538		GATA	0,3	0,029	1,3	0,912	1,1	0,929	0,3	0,012	7349	1920	9480	7930	2451
293616	679667		bHLH	1,4	0,706	1,0	0,853	2,2	0,794	1,8	0,166	1139	1547	1176	2452	2106
300898	680902	LbPrf1	HMG	1,2	0,960	1,3	0,865	1,6	0,499	1,3	0,790	1099	1338	1444	1762	1483
291812	681707		C2H2	0,3	0,002	0,4	0,010	0,4	0,017	0,2	0,000	22988	6120	8599	8259	3796
291829	681767	LbMSN4	C2H2	0,5	0,064	0,9	0,566	0,6	0,131	0,6	0,068	8544	3882	8011	4788	4773
318097	682475		Zn2Cys6	0,2	0,008	1,2	0,802	0,6	0,081	0,1	0,004	6947	1639	8101	4503	747
305811	683624		Zn2Cys6	0,0	0,000	0,8	0,370	0,4	0,136	0,0	0,000	675	14	572	265	1
311402	685157		Zn2Cys6	0,3	0,061	0,8	0,339	0,6	0,191	0,0	0,002	3202	1095	2610	1781	34
292733	685209	LbGat1	GATA	0,2	0,002	1,0	0,219	0,3	0,027	0,4	0,007	9233	1545	8922	2781	3364
311840	685688	LbCol21	Zn2Cys6	0,2	0,006	1,5	0,675	0,5	0,113	0,0	0,000	3170	626	4842	1609	1
	685852		bZIP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
297317	686144		C2H2	1,6	0,399	1,2	0,714	1,5	0,971	2,1	0,424	1589	2591	1927	2309	3342
325649	687441		bHLH	0,7	0,454	0,6	0,068	2,0	0,436	3,1	0,266	118	81	76	235	369
297737	690446		C2H2	0,7	0,177	0,7	0,304	0,5	0,142	0,0	0,002	2651	1898	1960	1250	112
297882	690614		YL1	0,3	0,011	1,0	0,538	0,5	0,127	0,3	0,005	7160	2095	7413	3542	2348
294744	691497	LbSFP1	C2H2	1,3	0,849	1,7	0,972	9,3	0,572	3,5	0,452	451	568	772	4187	1573
317671	691799		HMG	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
166037	694007	LbSwi6	APSES	1,7	0,383	1,4	0,750	1,6	0,787	1,5	0,497	2079	3503	2816	3242	3038
305344	694069		Myb	7,1	0,000	3,3	0,186	7,1	0,005	8,5	0,000	753	5327	2509	5308	6421
	694534		C2H2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	695265		C2H2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
325071	696110		Zn2Cys6	0,6	0,170	0,6	0,291	0,9	0,723	0,9	0,664	5487	3261	3223	4752	4675
	696146		GRF	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	696456		C2H2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
313819	696532	LbTrm2	C2H2	1,9	0,072	1,8	0,110	1,3	0,693	2,2	0,005	8480	16284	15211	10901	18503
302769	697312		Zn2Cys6	0,3	0,112	1,9	0,546	1,4	0,825	0,4	0,037	2894	834	5627	4089	1172
316204	697356		C2H2	3,4	1,000	0,0	0,000	3,5	0,689	3,8	0,882	35	118	1	121	130
295375	697879		GATA	1,6	0,607	5,6	0,097	2,6	0,630	2,2	0,083	1658	2642	9332	4374	3614

Table S5:

Table S5: List of *L. bicolor* TFs Identified in silico, along with gene expression change in ECM Roots of Douglas fir as compared with FLM, during a time-course of ECM development. N.A.=data Non Available.

Protein ID version1	Protein ID version2	TF name	Family	ratio 2W/FLM	P value 2W/FLM	ratio 4W/FLM	P value 4W/FLM	ratio 6W/FLM	P value 6W/FLM	FLM	2W ECM	4W ECM	6W ECM
149540	149540	NCB1 subunit alpi	Histon fold	0,4	0,008	0,3	0,008	0,6	0,013	1308	584	440	773
150072	150072	LbCrz1-1	C2H2	2,3	0,009	0,0	0,007	0,2	0,346	77	179	2	13
182804	182804	LbISW2	Myb	0,7	0,008	0,6	0,003	0,9	0,262	4133	3050	2391	3723
190760	190760	LbRsc8	Myb	0,4	0,013	0,4	0,003	0,8	0,115	6575	2862	2859	5352
231949	231949	LbAda2	Myb	0,3	0,003	0,5	0,007	1,1	0,146	2746	957	1264	3071
247901	247901	LbAce1-1	Copper-fist	0,6	0,049	0,6	0,026	2,3	0,003	1651	1072	1006	3856
292029	292029		Zn2Cys6	0,9	0,297	4,0	0,005	13,6	0,000	939	872	3716	12789
292045	292045	LbCon7	C2H2	0,8	0,018	0,3	0,000	0,3	0,000	2473	1917	799	776
293207	293207	LbRlm1-1	MAD-box	0,5	0,502	0,8	0,510	1,6	0,147	110	55	91	172
293242	293242	LbGcn4	bZIP	1,1	0,556	0,8	0,102	0,9	0,428	10700	11427	8176	9790
293563	293563	LbSnf5	GATA										
293949	293949	LbSfu1	GATA	0,7	0,009	0,8	0,118	0,7	0,018	37098	26571	29101	26417
293988	293988	LbHom2	Homeobox	0,7	0,003	0,7	0,021	0,9	0,015	16686	12198	11850	14533
294581	294581		bHLH	1,2	0,341	0,7	0,237	0,5	0,015	510	589	362	273
296037	296037	LbNrg1	C2H2	0,5	0,107	0,2	0,000	0,3	0,001	4529	2233	1041	1509
296675	296675		Myb	0,0	0,329	0,2	0,004	0,5	0,014	748	7	178	344
296682	296682	LbAcu15-3	Zn2Cys6	3,1	0,005	3,1	0,004	5,1	0,002	611	1864	1885	3134
297319	297319		Homeobox	0,1	0,000	0,2	0,002	0,3	0,000	2695	304	574	689
297378	297378		C2H2	0,7	0,008	0,8	0,002	0,7	0,001	5560	3943	4418	3802
298274	298274	LbAbaA	TEA/ATTS	1,6	0,258	5,3	0,002	26,1	0,000	194	313	1022	5056
299606	299606		GRF	0,5	0,019	0,4	0,012	0,7	0,029	2595	1378	1071	1774
300072	300072		Zn2Cys6	0,5	0,025	0,4	0,023	0,7	0,175	795	408	280	588
300474	300474		NF-X1	0,2	0,007	0,4	0,009	0,4	0,001	1780	355	656	711
300747	300747		Zn2Cys6	0,6	0,021	0,6	0,016	0,6	0,012	5963	3635	3366	3367
300824	300824	Lbltc1	DTT	1,3	0,062	1,1	0,474	0,8	0,214	3540	4774	3915	2905
301029	301029		Zn2Cys6	0,8	0,025	0,8	0,152	1,1	0,212	5637	4729	4689	6101
301089	301089	LbBdp1	Myb	0,6	0,005	0,6	0,010	0,6	0,007	7278	4316	4538	4728
301103	301103	LbHD1	Homeobox	1,2	0,153	0,9	0,348	0,6	0,012	1405	1651	1256	885
301157	301157	LbNirA-1	Zn2Cys6	0,1	0,045	0,0	0,148	0,2	0,001	1884	173	34	328
301563	301563		C2H2	0,0	0,000	0,0	0,000	1,0	1,000	113	1	1	114

329739	329739		Zn2Cys6	1,6	0,048	0,6	0,473	1,3	0,262	202	324	112	265
331730	331730		Zn2Cys6	1,0	1,000	1,0	1,000	1,0	1,000	1	1	1	1
332886	332886		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
333101	333101		Zn2Cys6	3,9	0,005	1,6	0,074	0,5	0,031	376	1482	613	200
334161	334161		C2H2	0,2	0,000	0,2	0,000	0,3	0,000	2246	377	463	575
150553	379257	LbPacC	C2H2	0,4	0,001	0,4	0,000	0,4	0,000	15249	5417	5635	5582
243459	379291	LbHD2	Homeobox	0,3	0,002	0,5	0,008	0,6	0,012	3143	795	1676	1796
230018	381332	LbPriB	Zn2Cys6	0,7	0,060	0,6	0,002	0,8	0,019	3255	2383	1893	2674
312032	383085		Zn2Cys6	0,7	0,014	0,7	0,013	1,2	0,078	3880	2889	2861	4610
234703	386478	LbPcc1	HMG	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
168843	387518	LbWC1		0,3	0,002	0,3	0,002	0,5	0,005	3985	1333	1297	1821
162920	393192	LbSte12α	C2H2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
295376	393526		Zn2Cys6	2,0	0,054	4,8	0,001	16,8	0,000	170	345	822	2868
	395214		bZIP	0,3	0,116	11,1	0,003	56,8	0,000	215	66	2379	12189
313780	399488	LbAcuK	Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
297628	399669	LbHom1-2	Homeobox	0,5	0,002	0,7	0,018	1,2	0,061	1262	611	938	1492
332342	399673		Homeobox	0,1	0,000	0,3	0,001	0,4	0,002	2673	366	891	1089
317135	436253		Zn2Cys6	0,7	0,071	0,5	0,020	0,6	0,021	5585	4010	3026	3276
	438987		bHLH	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	438992		bHLH	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
155813	439496		Zn2Cys6	0,4	0,248	0,7	0,002	0,5	0,007	6776	3001	4539	3184
335808	439617		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
156491	440138		Myb	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	441366		C2H2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
311992	441703		HSF	0,4	0,013	1,1	0,732	2,0	0,017	7508	3365	8191	15126
312711	441832		C2H2	0,7	0,130	0,8	0,004	0,8	0,006	1552	1016	1240	1198
299086	442607	LbXbp1	APSES	1,1	0,213	1,6	0,002	2,4	0,000	2736	2944	4509	6641
165046	443509	LbCreA	C2H2	0,1	0,427	2,1	0,013	3,5	0,002	397	44	831	1392
150318	444460		HMG	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
294677	444635		C2H2	0,6	0,005	0,6	0,005	0,1	0,012	9245	5199	5304	559
303137	444686		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	445028		bZIP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
334368	445505		C2H2	4,0	0,005	8,4	0,001	0,9	0,543	266	1078	2242	236
306911	445893		C2H2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
305186	449185		C2H2	0,9	0,635	0,5	0,011	0,8	0,086	924	838	478	759

324193	451082		C2H2	0,9	0,260	0,4	0,006	0,7	0,033	10992	9611	4839	7713
323995	451323	LbMedA-1		0,3	0,002	0,4	0,001	0,5	0,001	2523	673	917	1240
298017	453749		Zn2Cys6	2,1	0,494	1,0	1,000	1,0	1,000	1	2	1	1
306201	455773		APSES	0,3	0,001	0,3	0,001	0,3	0,002	19471	5757	5674	6537
301974	455979		Zn2Cys6	0,0	0,169	0,3	0,001	0,3	0,001	1867	76	495	502
325675	456860		TEA/ATTS	0,2	0,002	0,1	0,001	0,1	0,001	4259	765	343	373
169971	458057		HMG	0,5	0,004	0,5	0,001	0,8	0,014	35185	19131	16046	26896
294045	458584		C2H2	0,4	0,005	0,4	0,005	0,5	0,009	4152	1644	1611	1962
	459072	LbAsg1	Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
293340	459322		HMG	1,5	0,594	1,7	0,234	2,2	0,069	72	111	124	158
293353	459342		Zn2Cys6	0,5	0,138	0,9	0,423	2,4	0,007	242	111	216	575
293031	459853	LbHap2	Histon fold	0,6	0,004	0,8	0,025	0,6	0,017	15875	9850	12051	9470
335020	460596		Zn2Cys6	1,0	1,000	1,0	1,000	1,0	1,000	1	1	1	1
	461548		bZIP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
294583	462217		bZIP	0,6	0,001	0,6	0,002	0,5	0,001	6741	4033	4110	3702
321741	467042		C2H2	0,1	0,217	0,9	0,503	2,4	0,009	97	5	84	235
313869	476130	LbMetR-1	bZIP	0,7	0,008	0,9	0,127	0,8	0,025	26580	17532	22741	20406
150219	476882	LbFkh2	Forkhead	1,0	0,790	0,9	0,457	0,9	0,360	8651	8230	7717	7427
325558	477979		C2H2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
301759	478107		SGT1	0,8	0,087	1,2	0,180	0,8	0,086	2106	1709	2479	1728
301549	479092		C2H2	0,4	0,001	0,5	0,001	0,7	0,002	13218	5202	6244	8967
305984	480375		C2H2	0,7	0,127	1,0	0,966	0,9	0,488	2769	1892	2704	2534
311603	481451	LbReb1	Myb	0,8	0,105	0,9	0,398	0,9	0,317	2472	1983	2315	2205
311738	481594		HMG	1,5	0,099	1,1	0,745	0,3	0,006	1818	2784	2050	540
311799	481652	LbSak1	RFX	0,7	0,005	0,6	0,004	0,7	0,005	25506	17321	15845	17491
299001	482572		TEA/ATTS	0,2	0,002	0,9	0,132	1,4	0,007	2008	441	1728	2767
298964	482609		HMG	0,6	0,003	0,5	0,002	0,4	0,002	17776	11550	9248	6457
309167	483007		Zn2Cys6	0,3	0,001	0,2	0,001	0,4	0,002	9555	2989	2384	4136
168394	483117	LbMedA-2		0,0	0,019	0,3	0,001	0,8	0,013	1035	43	305	804
309008	483154		Zn2Cys6	0,9	0,336	1,6	0,011	1,7	0,010	2018	1834	3313	3503
300472	483735		NF-X1	0,2	0,012	0,4	0,018	0,3	0,000	1799	291	653	483
323970/313540	483927		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
303218	483986		Zn2Cys6	1,2	0,113	1,5	0,017	1,1	0,395	2742	3304	4044	3022
316706	484334		Zn2Cys6	78,5	0,001	8,3	0,242	1,0	1,000	1	79	8	1
313151	484764		C2H2	2,6	0,004	3,2	0,001	5,9	0,000	655	1723	2075	3843

	581905		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
304339	583411		bHLH	0,8	0,140	0,7	0,199	1,3	0,058	1028	836	726	1373
311707	583431		Zn2Cys6	0,7	0,069	0,9	0,164	1,0	0,296	2041	1504	1825	1970
297118	585149	LbFst3	Zn2Cys6	0,8	0,073	0,9	0,259	1,3	0,022	5484	4572	5027	6993
297200	585421	LbNsdD	GATA	0,4	0,002	0,6	0,007	0,5	0,008	9286	3932	5314	4771
300503	593632	LbXlnR	Zn2Cys6	1,0	1,000	0,1	0,047	0,2	0,388	86	83	5	19
303137	594734		Zn2Cys6	0,9	0,653	0,4	0,016	0,1	0,006	730	633	313	87
333124	594922		TEA/ATTS	1,0	1,000	1,0	1,000	1,0	1,000	1	1	1	1
310368	595372		Zn2Cys6	0,0	0,111	0,1	0,002	0,5	0,029	1510	24	179	740
310368	595386		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
314316	595621		Zn2Cys6	0,5	0,009	0,5	0,008	0,6	0,009	806	435	430	445
	595635	LbAcu15-4	Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
334157	595757		Zn2Cys6	0,0	0,090	1,2	0,413	0,6	0,010	110	3	130	69
239654	596083		bZIP	0,1	0,302	0,1	0,005	0,9	0,294	330	27	39	291
	606882		Copper-fist	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
150048	607061		HSF	10,9	0,186	1,0	1,000	1,0	1,000	1	11	1	1
305505	607158	LbZap1	C2H2	4,3	0,001	3,9	0,000	3,1	0,000	324	1378	1268	1006
305537	607166		Zn2Cys6	0,5	0,036	1,0	0,982	1,5	0,119	2074	1025	1995	3156
244290	608593	LbSnt2	Myb	0,6	0,388	0,6	0,435	1,6	0,069	165	91	94	260
298451	608663		C2H2	2,9	0,011	8,7	0,002	10,3	0,001	362	1057	3147	3710
141130	611756		CCR4-Not complex compon	0,9	0,661	0,8	0,136	0,7	0,051	15465	14410	12277	10911
313765	612492		p53-like	0,7	0,119	0,7	0,076	1,4	0,063	4477	3206	3111	6146
313619	613245		Zn2Cys6	0,5	0,005	0,8	0,006	0,7	0,003	8538	4067	6491	6054
302892	614278		GATA	1,0	1,000	1,0	1,000	1,0	1,000	1	1	1	1
302761	614280		Zn2Cys6	4,0	0,000	3,9	0,001	7,3	0,000	1176	4741	4615	8584
308094	617721		C2H2	0,0	0,054	0,9	0,975	0,5	0,156	228	3	209	107
305751	619068	LbFhl1	Forkhead	0,5	0,022	0,5	0,015	0,7	0,070	6028	3130	3002	4379
334646	619686		C2H2	2,0	0,021	1,0	1,000	4,3	0,003	180	359	183	766
	620272		bZIP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	620550		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
296536	621250		C2H2	1,6	0,015	1,1	0,466	1,1	0,496	11181	17794	12213	12692
300881	622364	LbAce1-2	Copper-fist	0,5	0,010	0,7	0,033	0,6	0,015	10967	5236	7217	6438
300968	622520	LbCbf11	p53-like	0,8	0,279	0,7	0,013	0,8	0,043	6668	5351	4695	5572
301156	622851		Forkhead	1,1	0,194	0,9	0,220	1,1	0,762	2213	2497	1954	2329
320903	622992		bHLH	0,6	0,008	0,7	0,016	0,7	0,016	24205	13647	16992	16523

296690	623610		Zn2Cys6	0,8	0,056	0,7	0,006	1,4	0,019	1802	1414	1311	2495
142667	623651		C2H2	0,2	0,001	0,2	0,000	0,5	0,002	4387	1070	988	2356
300743	625521		Zn2Cys6	0,8	0,024	0,8	0,015	0,9	0,163	8108	6419	6416	7511
294648	625677		bHLH	0,1	0,002	0,1	0,003	0,1	0,002	13132	1210	744	1453
307391	625911		Zn2Cys6	0,9	0,490	1,0	1,000	2,3	0,002	620	530	619	1430
311698	628355		Zn2Cys6	0,7	0,002	0,6	0,001	0,8	0,049	2946	1921	1690	2361
312032	628949		Zn2Cys6	0,7	0,014	0,7	0,013	1,2	0,078	3880	2889	2861	4610
294267	629198		Zn2Cys6	0,8	0,186	1,0	0,900	1,1	0,391	5997	5036	6114	6418
296989	629646		Zn2Cys6	1,5	0,002	1,3	0,006	1,9	0,000	7581	11254	9625	14363
309028	630145		Histon fold	1,4	0,028	1,1	0,051	1,0	0,901	7731	10712	8771	7837
294488	633206		C2H2	3,0	0,005	4,2	0,002	4,1	0,001	2234	6705	9360	9087
292128	634738		Zn2Cys6	0,8	0,041	0,8	0,036	0,9	0,262	7649	5870	5753	6707
319718	636228	LbMbf1	HLH type 3	1,1	0,258	1,1	0,467	1,2	0,121	24822	27694	26501	28922
144261	636637	LbIIIA	C2H2	0,5	0,002	0,8	0,033	0,6	0,002	3308	1745	2502	1831
313784	636734	LbCrz1-2	C2H2	1,2	0,021	1,2	0,023	1,3	0,038	8665	10521	10293	11597
308109	637785		Zn2Cys6	0,7	0,173	0,6	0,025	1,4	0,081	5455	4045	3115	7868
312467	640940		HMG	1,0	1,000	0,6	0,006	0,5	0,006	7034	7086	4125	3409
306314	643886		C2H2	1,5	0,004	1,9	0,002	1,5	0,010	2137	3165	4127	3166
311571	644689	LbExp1	HMG	0,9	0,493	1,1	0,054	2,9	0,000	5946	5372	6790	17163
327972	648888		HMG	0,2	0,002	0,3	0,002	0,4	0,003	23263	5584	7657	9441
293210	652780	LbHxl1	bZIP	0,3	0,000	0,2	0,001	0,8	0,030	5186	1420	1187	4134
292149	654679	LbAcu15	Zn2Cys6	0,8	0,070	0,9	0,395	1,0	1,000	10115	7929	9217	10020
304198	654916		Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
301245	655850		bHLH	1,3	0,105	1,2	0,299	1,5	0,044	20251	26079	23858	29654
292246	656449		TEA/ATTS	0,9	0,428	1,1	0,490	2,0	0,004	3330	2957	3675	6691
311793	657026	LbDevR	bHLH	0,6	0,006	0,7	0,027	1,2	0,146	3230	2048	2154	3743
292536	657699		Homeobox	0,7	0,025	0,7	0,022	0,7	0,014	9610	6347	7105	6575
294333	658142		HMG	2,9	0,001	1,9	0,003	0,2	0,001	4430	13008	8573	1037
176793	660430	bNCB2 subunit bel	Histon fold	1,0	0,995	1,1	0,514	1,1	0,341	7003	6879	7501	7678
328804	661551		Zn2Cys6	0,6	0,030	0,5	0,049	0,4	0,009	660	367	349	231
294399	663232		bHLH	1,4	0,251	0,9	0,733	1,5	0,130	613	852	531	894
242593	665554	LbYap1	bZIP	0,5	0,002	0,7	0,017	0,9	0,114	6167	2855	4222	5337
301023	666027		Homeobox	1,1	0,124	1,0	0,890	0,8	0,011	13178	14090	13019	10632
301338	666247		Zn2Cys6	1,4	0,004	1,5	0,012	1,9	0,001	6771	9292	10205	12721
227966	667316		GATA	0,7	0,003	0,9	0,060	1,3	0,010	9208	6338	7922	12008

312016	667862	LbAtf2	bZIP	0,9	0,746	0,8	0,095	1,5	0,023	1574	1480	1238	2342
295643	667917		C2H2	0,8	0,264	0,8	0,024	2,1	0,002	3782	2856	2838	7817
297145	668080		GATA	0,6	0,006	1,2	0,081	1,2	0,022	5281	2912	6302	6271
296988	668161	LbNosA	Zn2Cys6	0,9	0,360	1,2	0,253	5,9	0,001	4212	3614	5079	24946
309255	668424		Zn2Cys6	3,7	0,003	5,4	0,001	4,8	0,001	1737	6418	9453	8343
296434	670084		C2H2	0,3	0,113	0,3	0,010	0,3	0,008	827	264	269	272
254611	670648	LbAcuM-2	Zn2Cys6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
302899	671538		GATA	0,2	0,001	0,3	0,000	0,3	0,002	6296	979	1869	2186
293616	679667		bHLH	0,4	0,095	0,4	0,011	0,3	0,006	1469	645	547	500
300898	680902	LbPrf1	HMG	1,2	0,439	1,3	0,016	0,6	0,002	1154	1375	1470	709
291812	681707		C2H2	0,2	0,000	0,3	0,000	0,4	0,000	20673	4516	5988	9180
291829	681767	LbMSN4	C2H2	1,2	0,018	1,1	0,180	1,2	0,019	5764	7009	6548	6915
318097	682475		Zn2Cys6	1,0	0,805	1,7	0,021	1,5	0,035	4979	4756	8385	7554
305811	683624		Zn2Cys6	0,4	0,006	0,3	0,115	0,4	0,016	675	286	173	299
311402	685157		Zn2Cys6	0,7	0,022	0,8	0,091	0,7	0,014	2957	2117	2296	1978
292733	685209	LbGat1	GATA	0,8	0,271	0,6	0,042	1,3	0,212	4943	3755	2854	6569
311840	685688	LbCol21	Zn2Cys6	0,6	0,050	1,1	0,402	1,4	0,026	2744	1634	2990	3760
	685852		bZIP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
297317	686144		C2H2	1,0	0,801	1,2	0,048	1,2	0,044	1552	1598	1853	1917
325649	687441		bHLH	0,1	0,345	0,1	0,068	0,0	0,007	21	3	2	1
297737	690446		C2H2	0,6	0,015	1,1	0,555	0,8	0,165	2457	1581	2636	2074
297882	690614		YL1	0,5	0,002	0,5	0,002	0,6	0,002	6686	3327	3069	4008
294744	691497	LbSFP1	C2H2	0,8	0,542	0,3	0,007	0,5	0,011	886	689	278	404
317671	691799		HMG	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
166037	694007	LbSwi6	APSES	1,1	0,766	1,3	0,067	1,0	0,705	2427	2569	3187	2527
305344	694069		Myb	1,2	0,060	0,8	0,251	0,6	0,043	793	987	628	488
	694534		C2H2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	695265		C2H2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
325071	696110		Zn2Cys6	0,8	0,259	0,8	0,310	0,5	0,013	5607	4616	4709	2705
	696146		GRF	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	696456		C2H2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
313819	696532	LbTrm2	C2H2	1,0	1,000	0,7	0,039	0,6	0,012	6688	6681	4674	3823
302769	697312		Zn2Cys6	1,5	0,007	1,6	0,012	1,9	0,003	2608	3859	4063	4917
316204	697356		C2H2	2,4	0,033	0,5	0,007	0,5	0,065	152	359	76	73
295375	697879		GATA	1,7	0,003	2,8	0,001	7,3	0,000	1904	3267	5331	13951

Materials and Methods

Microorganism and plant material

Saccharomyces cerevisiae strain MaV103 (MATa, *leu2-3,112*, *trp1-901*, *his3Δ200*, *ade2-101*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *SPAL10::URA3*, *GAL1::lacZ*, *HIS3UASGAL1::HIS3@LYS2*, *can1R*, *cyh2R*) were propagated on YAPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, and 40 mg/L adenine) and cultured at 30°C.

For microarrays experiments, *Laccaria bicolor* inoculum was grown on a substrate of peat moss:vermiculite (3:1) dampened with liquid Pachlewski medium medium (2.7 mM di-ammonium tartrate, 7.3 mM KH₂PO₄, 2.0 mM MgSO₄·7 H₂O, 13 mM maltose, 110 mM glucose, 2.9 μM thiamine-HCl, and 1 mL of a trace-element stock solution Kanieltra medium) for 3 months. Pre-rooted stem cuttings of *P. trichocarpa* or *P. deltooides* (rooted for 1 week in a solution of: 2.5 mM KNO₃, 0.8 mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄·7 H₂O, 2.3 mM Ca(NO₃)₂·4 H₂O, 23 μM H₃BO₃, 4.6 μM MnCl₂·4 H₂O, 0.4 ZnSO₄·7 H₂O, 0.09 μM (NH₄)₂MoO₄, 0.18 μM CuSO₄·5 H₂O, 20 μM FeNaEDTA, pH 5.8) or 1 week old seedlings of *Pseudotsuga menziesii* were planted in 1 liter of a 9:1 mixture (v/v) of Terra-Green (a calcined attapulgite clay supplied by Turf-Pro, UK):*L. bicolor* inoculum. Each pot was given 20 mL of a dilute nutrient solution (0.8 mM KNO₃, 0.8 mM Ca(NO₃)₂·4 H₂O, 0.3 mM NaH₂PO₄, 0.3 mM MgSO₄·7 H₂O, and 20 μL trace elements solution Kanieltra per liter of solution) weekly. To determine the percent of *P. trichocarpa*, *P. deltooides* and *Pseudotsuga menziesii* roots colonized by *L. bicolor* over time, plants were destructively harvested and the root system was carefully washed clean of substrate and the top third of the root system, in which most *L. bicolor* mycorrhizal root tips are found, was analyzed for degree of mycorrhization. This was performed by taking 4 random selections from this portion of the root mass, counting 25 lateral roots from each sample and scoring them as mycorrhizal root tips or un-colonized root tips using a Nikon SMZ-2T stereomicroscope (Nikon Instruments Europe B.V., Netherlands, Europe). At least 3 biological replicates (i.e. at least 3 individual plants) per time point were analyzed for mycorrhization potential. The colonization experiment was replicated twice (technical replicate) under climate controlled greenhouse conditions maintaining a 16 hour photoperiod and a temperature of 22 degrees Celsius during the day.

Bioinformatic predictions and annotations

Eukaryotic transcription factors can be classified on the basis of their characteristic DNA-binding domains. Transcription factors encoded in the genome of *L. bicolor* were identified using a previously described method (Wilson et al., 2008), which is based on a manually curated set of PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) and Superfamily domains (<http://supfam.cs.bris.ac.uk/SUPERFAMILY/>). For comparison, the same method was applied to the genomes of *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau et al., 1996), *Agaricus bisporus var bisporus* (Morin et al, 2012), *Coprinopsis cinerea* (Stajich et al, 2010), *Schizophillum commune* (Ohm et al, 2010) and *Tuber melanosporum* (Martin et al. 2010). Functional annotations were performed with BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) search against the nr database from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using a threshold e-value of 10^{-5} . For each putative transcription factor identified, best hit with experimental characterization and/or publication are reported. The presence of NLS and coiled coil regions were inferred with PSORT II prediction at <http://psort.hgc.jp/>. N-terminal signal peptides and cleavage sites were predicted using SignalP at <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>.

Transcript profiling

Comparison of Mature *L. bicolor* ECM from *P. trichocarpa*, *P. deltoids* and *P. menziesii*

The *L. bicolor* custom-exon expression array version 2 ($4 \times 72\text{K}$) manufactured by Roche NimbleGen Systems Limited (Madison, WI) (<http://www.nimblegen.com/products/exp/index.html>) contained three independent, nonidentical, 60-mer probes per gene model. For 18,653 annotated protein-coding gene models from the *L. bicolor* genome v1 (<http://genome.jgi-psf.org/Lacbi1/Lacbi1.home.html>) probes could be designed. Included in the array were 2,032 random 60-mer control probes and labeling controls. Three biological replicates were used for each microarray experiments. For 4,702 probes, technical duplicates were included on the array. Full details of the transcript profiling can be found in the Supporting Information (Vincent et al., 2012).

Time course profiling

Tissues used for transcriptomic profiling were taken from root systems of *P. trichocarpa* after 2, 4, 6 and 12 weeks post contact with the fungus, and from *P. menziesii* after 2, 4 and 6 weeks of colonization. Plants were destructively harvested, their roots washed of the substrate and roots observed using a Nikon SMZ-2T stereomicroscope (Nikon Instruments Europe B.V., Netherlands, Europe). For 2 and 4 week samples, only roots that

exhibited fungal mycelia attached to the root surface were sampled and frozen immediately in liquid nitrogen. For 6 and 12 week samples, only roots that had a developed fungal mantle were sampled and frozen in liquid nitrogen. Systemic roots harvested from *P. trichocarpa* were defined as fine lateral roots that were in contact with *L. bicolor* but that were not colonized nor had fungal mycelia evident on the root surface. For each timepoint taken, plant host roots grown in the same substrate and with the same nutrient regime but without fungus were harvested to act as a control for transcriptomic analyses. *L. bicolor* free living mycelium grown on a medium containing agar and the nutrient solution used on the plants was used as the control tissue for *L. bicolor*. This control was used as *L. bicolor* grown in the Terra Green substrate could not be harvested in sufficient quantity for RNA extraction and transcriptomic analysis.

Four biological replicates of between 50-100 mg of tissues harvested as described above were used for RNA extraction for each timepoint. Total RNA extraction was performed using the RNeasy kit (Qiagen) as per the manufacturer's instructions with the addition of 25 mg polyethylene glycol 8000/mL RLC buffer to the extraction solution. An on-column DNA digestion step with DNase I (Qiagen) was also included to avoid DNA contamination. RNA quality was verified by Experion HighSens capillary gels (Bio-Rad). As mycorrhizal tissues are very recalcitrant to RNA extraction, quantities of RNA recovered were too low for quantities needed for oligoarray. Therefore we amplified the RNA using the Clontech SMARTer amplification kit according to manufacturer's instructions.

Two oligoarrays were used in this study: The 4-plex *Laccaria bicolor* whole genome expression array (GPL14641) and the *Populus trichocarpa* 12-plex whole genome expression array (GPL13485), both manufactured by NimbleGen Systems Limited (Madison, WI). Single dye labeling of samples, hybridization procedures and data acquisition were performed at the NimbleGen facilities (NimbleGen Systems, Reykjavik, Iceland) following their standard protocol. Three or four biological replicates were performed for each condition. Microarray probe intensities were normalized across chips using the ARRAYSTAR software (DNASTAR). Natural log-transformed data were calculated and were subjected to the CyberT statistical framework (<http://cybert.ics.uci.edu/>; Baldi and Long, 2001) using the Standard t-test unpaired two conditions data module. Benjamini & Hochberg multiple-hypothesis testing corrections with False Discovery Rate (FDR) were used. Before transcripts were declared present, the signal-to-noise threshold (signal background) was calculated based on the mean intensity of random probes present on the microarray. Cut-off values for signal intensity (three-times the mean intensity of random probes) were then subtracted from the normalized

intensity values. The highest signal intensity values observed on these arrays were ~65,000 arbitrary units. Signals below the cut-off values were assigned a signal intensity value of 1.

Hierarchical clustering analysis

Hierarchical clustering of transcription factors with up- or down-down regulation ≥ 2.5 fold and expression ≥ 300 (arbitrary units) in at least one of the condition tested was performed with the program Epiclust from the European Bioinformatics Institute (<http://www.bioinf.ebc.ee/EP/EP/EPCLUST/>). Data were normalized using Log transformation with a Log base of 2. Number of attributes with opposites sign was used as distance metric and average linkage clustering as linkage method.

cDNA libraries construction

cDNA libraries construction were performed as reported in Plett et al., (2011). Briefly, total RNA (500 μg per sample) was prepared from *L. bicolor* fruiting bodies (FB) and from free-living mycelium (FLM) of *L. bicolor* (strain S238N) grown in P5 liquid Pachlewski medium for 3 weeks. The RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) was used for RNA extraction followed by a DNase I treatment and purification of mRNA on Oligotex columns (Qiagen). Next FB and FLM mRNAs were pooled and FB/FLM entry cDNA library was constructed with the CloneMiner cDNA Library Construction Kit (Invitrogen), starting from 2 μg of purified mRNA. For the ectomycorrhiza (ECM) and root libraries, total RNAs were extracted from *L. bicolor* mycorrhiza root tips and non mycorrhiza roots tips during a time course of symbiosis development with the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), using the RLC buffer, containing 20 mg ml^{-1} of PEG 8000, and applying DNaseI treatment on column. ECM and Root entry cDNA libraries were constructed with the CloneMiner cDNA Library Construction Kit (Invitrogen), starting from 500 ng of purified Total RNAs. Entry cDNA libraries were then transferred to the yeast-expressible pDEST_32 vector using the Gateway system (supplied with the ProQuest_ Two-Hybrid System kit, Invitrogen).

Transcriptional activator trap assays

For the “transcriptional activator trap” assay, yeast strain MaV103 harboring Gal4-dependent LacZ, HIS3 and URA3 reporter genes, was transformed with twenty micrograms of each pDESTTM32 cDNA library and plated onto twenty Petri dishes (150 mm diameter) on selective medium (SD-Leu-His) containing 25 mM 3-amino-1,2,4-triazole (3AT). About 1.7, 2, and 0.8 million colonies were screened for Laccaria FLM/FB, ECM, and Root library,

respectively. 3AT-resistant colonies were individually transferred to 384-well SD-Leu plates, handled with a 384-multipinner device (V&P) and analyzed for LacZ, HIS3 and URA3 reporter gene expression as described (Montanini et al, 2011; Plett et al., 2011). Colonies that scored positive to the three reporter genes (about 200 for each library) were retained and subjected to sequence analysis.. Transcriptional activator trap-positive clones were then sequenced, and the resulting sequences were first trimmed to remove low-quality and vector-derived regions. The resulting sequences were used as queries for a BLASTX search against the *L. bicolor* and *Populus trichocarpa* proteomes at the NCBI. When available, a gene model was assigned to each sequence (identity > 95%). Sequences overlapping the same gene model were checked manually and included in contig sequences.

References

- Alexander IJ: The significance of ectomycorrhizas in the nitrogen cycle. In: Lee JA, McNeill D, Rorison IH, (eds). In Nitrogen as an Ecological Factor. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications; 1983:69-93.
- Anderson IC, Chambers SM, Cairney JWG: Intra- and interspecific variation in patterns of organic and inorganic nitrogen utilization by three Australian *Pisolithus* species. *Mycol Res* 1999, 103:1579-1587.
- Andrianopoulos A and Timberlake WE: The *Aspergillus nidulans* abaA gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Mol. Cell. Biol* 1994, 14(4):2503-2515.
- Aro N, Pakula T, Penttila M: Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Reviews* 2005, 29:719-739.
- Baptista P, Martins A, Pais MS, Tavares RM, Lino-Neto T: Involvement of reactive oxygen species during early stages of ectomycorrhiza establishment between *Castanea sativa* and *Pisolithus tinctorius*. *Mycorrhiza* 2007, 17:185-193.
- Berg J, Tymoczko J, Stryer L. In *Biochemistry*. 6th edition. New York, USA: W. H. Freeman; 2006.
- Bhavsar, R.B., Makley, L.N. and Tsonis, P.a. (2010) The other lives of ribosomal proteins. *Human genomics*, 4, 327-344.
- Bonifacino JS, Traub LM. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:395-447.
- Brown AJ and Casselton LA: Mating in mushrooms: increasing the chances but prolonging the affair. *Trends in Genetics* 2001, 17(7):393-400.
- Brundrett, MC: Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* 2002, 154:275-304.
- Burgess T, Dell B, Malajczuk N: Variation in mycorrhizal development and growth stimulation of 20 isolates of *Pisolithus* inoculated onto *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. *New Phytologist* 1994, 127:731-739.
- Chalot M, Brun A: Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. *FEMS Microbiol Rev* 1998, 22:21-44.
- Chang YC, Wright LC, Tschärke RL, Sorrell TC, Wilson CF, Kwon-Chung KJ: Regulatory roles for the homeodomain and C2H2 Zinc finger regions of *Cryptococcus neoformans* Ste12ap. *Molecular Microbiology* 2004, 53(5):1385-1396.
- Cholbinski, P., Jastrzebska, Z., Wysocka-Kapcinska, M., Plochocka, D., Gornicka, A., Hopper, A.K. and Zoladek, T. (2011) Yeast ubiquitin ligase Rsp5 contains nuclear localization and export signals. *European journal of cell biology*, 90, 834-843.
- Colot HV, Park G, Turner GE, Ringelberg C, Crew CM, Litvinkova L, Weiss RL, Borkovich KA, Dunlap JC: A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, 103(27):10352-10357.
- De, S., Varsally, W., Falciani, F. and Brogna, S. (2011) Ribosomal proteins' association with transcription sites peaks at tRNA genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *RNA (New York, N.Y.)*, 17, 1713-1726.
- Deveau A, Kohler A, Frey-Klett P, Martin F: The major pathways of carbohydrate metabolism in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* S238N. *New Phytol* 2008, 180(2):379-90.
- Dieci, G., Ruotolo, R., Braglia, P., Carles, C., Carpentieri, A., Amoresano, A. and Ottonello, S. (2009) Positive modulation of RNA polymerase III transcription by ribosomal proteins. *Biochemical and biophysical research communications*, 379, 489-493.
- Duddridge JA and Read DJ: Modification of the host-fungus interface in mycorrhizas synthesised between *Suillus bovinus* Fr O. Kuntz and *Pinus sylvestris* L. *New Phytologist* 1984c, 96:583-588.
- Duplessis S, Courty PE, Tagu D, Martin F: Transcript patterns associated with ectomycorrhiza development in *Eucalyptus globulus* and *Pisolithus microcarpus*. *New Phytologist* 2005, 165:599-611.

- Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D: New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 2003, 13(4):17R-27R.
- Ellis JG, Rafiqi M, Gan P, Chakrabarti A, Dodds PN: Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 2009, 12:399-405.
- Felten J, Kohler A, Morin E, Bhalerao RP, Palme K, Martin F, Ditengou FA, Legué V: The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates lateral root formation in poplar and *Arabidopsis* through auxin transport and signaling. *Plant Physiol* 2009, 151(4):1991-2005.
- Felten J, Legué V, Ditengou FA: Lateral root stimulation in the early interaction between *Arabidopsis thaliana* and the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*: is fungal auxin the trigger? *Plant Signal Behav* 2010, 5(7):864-7.
- Finlay RD, Ek H, Odham G, Söderström B: Mycelial uptake, translocation and assimilation of nitrogen from ¹⁵N-labelled ammonium by *Pinus sylvestris* plants infected with four different ectomycorrhizal fungi. *New Phytol* 1988, 110:59-66.
- Finlay RD, Ek H, Odham G, Söderström B: Uptake, translocation and assimilation of nitrogen from ¹⁵N-labelled ammonium and nitrate sources by intact ectomycorrhizal systems of *Fagus sylvatica* infected with *Paxillus involutus*. *New Phytol* 1989, 113:47-55.
- Finlay RD, Frostegard A, Sonnerfeldt AM: Utilization of organic and inorganic nitrogen sources by ectomycorrhizal fungi in pure culture and in symbiosis with *Pinus contorta* Dougl. ex Loud. *New Phytol* 1992, 120:105-115.
- Finlay RD, Söderström B: Mycorrhiza and carbon flow to the soil. In *Mycorrhiza functioning*. Edited by Allen MF. London, UK: Chapman and Hall; 1992:134-160.
- Gafur A, Schützendübel A, Langenfeld-Heyser R, Fritze E, Polle A: Compatible and Incompetent *Paxillus involutus* Isolates for Ectomycorrhiza Formation *in vitro* with Poplar (*Populus x canescens*) Differ in H₂O₂ production. *Plant Biology* 2004, 6(1):91-99.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG: Life with 6000 genes. *Science* 1996, 274:546-567.
- Guescini M, Zeppa S, Pierleoni R, Sisti D, Stocchi L, Stocchi V: The expression profile of the *Tuber borchii* nitrite reductase suggests its positive contribution to host plant nitrogen nutrition. *Current Genetics* 2007, 51:31-41.
- Guidot A, Verner MC, Debaud JC, Marmeisse R: Intraspecific variation in use of different organic nitrogen sources by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Mycorrhiza* 2005, 15:167-177.
- Hall, D.A., Zhu, H., Zhu, X., Royce, T., Gerstein, M. and Snyder, M. (2009) Regulation of Gene Expression by a Metabolic Enzyme. *October*, 482.
- Hartmann HA, Kahmann R, Bölker M: The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *The EMBO Journal* 1996, 15(7):1632-1641.
- Hederstedt L, Rutberg L: Succinate dehydrogenase--a comparative review. *Microbiol Rev* 1981, 45(4):542-55.
- Hu, S., Xie, Z., Onishi, A., Yu, X., Jiang, L., Lin, J., Rho, H.-s., Woodard, C., Wang, H., Jeong, J.-s., Long, S., He, X. and Wade, H. (2009) Profiling the Human Protein-DNA Interactome Reveals ERK2 as a Transcriptional Repressor of Interferon Signaling. *Cell*, 139, 610-622.
- Hutchison, E.a., Bueche, J.a. and Glass, N.L. (2012) Diversification of a protein kinase cascade: IME-2 is involved in nonself recognition and programmed cell death in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 192, 467-482.
- Johansson T, Le Quéré A, Ahren D, Söderström B, Erlandsson R, Lundeberg J, Uhlén M, Tunlid A: Transcriptional responses of *Paxillus involutus* and *Betula pendula* during formation of ectomycorrhizal root tissue. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2004, 17:202-215.
- Kadosh D and Johnson AD: Rfg1, a Protein Related to the *Saccharomyces cerevisiae* Hypoxic Regulator Rox1, Controls Filamentous Growth and Virulence in *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biology*, 2001, 21(7):2496-2505.
- Keller G: Utilization of inorganic and organic nitrogen sources by high-subalpine ectomycorrhizal fungi of *Pinus cembra* in pure culture. *Mycol Res* 1996, 100:989-998.

- Kloppholz, S., Kuhn, H. and Requena, N. (2011) A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Current biology : CB*, 21, 1204-1209.
- Klose J, Kronstad JW: The multifunctional beta-oxidation enzyme is required for full symptom development by the biotrophic maize pathogen *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell* 2006, 5:2047-2061.
- Kreuzwieser J, Rennenberg H: Sulphate uptake and xylem loading of mycorrhizal beech roots. *New Phytol* 1998, 140:319-329.
- Kropp BR, McAfee BJ, Fortin JA: Variable loss of ectomycorrhizal ability in monokaryotic and dikaryotic cultures of *Laccaria bicolor*. *Canadian Journal of Botany* 1987, 65:500-504.
- Laczko E, Boller T, Wiemken V: Lipids in roots of *Pinus sylvestris* seedlings and in mycelia of *Pisolithus tinctorius* during ectomycorrhiza formation: changes in fatty acid and sterol composition. *Plant, Cell & Environment* 2003, 27:27-40.
- Larsen PE, Sreedasyam A, Trivedi G, Podila GK, Cseke LJ, Collart FR: Using next generation transcriptome sequencing to predict an ectomycorrhizal metabolome. *BMC Syst Biol* 2011,5:70.
- Laverman AM, Zoomer HR, van Verseveld HW, Verhoef HA: Temporal and spatial variation of nitrogen transformations in a coniferous forest soil. *Soil Biol Biochem* 2000, 32:1661-1670.
- Le Quere A, Wright DP, Söderström B, Tunlid A, Johansson T: Global patterns of gene regulation associated with the development of ectomycorrhiza between birch (*Betula pendula* Roth.) and *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2005, 18:659-673.
- Lindström, M.S. (2009) Emerging functions of ribosomal proteins in gene-specific transcription and translation. *Biochemical and biophysical research communications*, 379, 167-170.
- López MF, Männer P, Hampp R, Nehls U: Increased trehalose biosynthesis in Hartig net hyphae of ectomycorrhizas. *New Phytologist* 2007, 174:389-398.
- Mansouri-Baully H, Kruse J, Sýkorová Z, Scheerer U, Kopriva S: Sulfur uptake in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. *Mycorrhiza* 2006, 16(6):421-427.
- Martin F, Canet D, Marchal JP, Brondeau J: *In vivo* natural-abundance ¹³C nuclear magnetic resonance studies of living ectomycorrhizal fungi. Observation of fatty acids in *Cenococcum graniforme* and *Hebeloma crustuliniforme*. *Plant Physiology* 1984, 75:151-153.
- Martin F, Boiffin V, Pfeffer PE: Carbohydrate and amino acid metabolism in the *Eucalyptus globules*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizal during glucose utilization. *Plant Physiology* 1998, 118:627-635.
- Martin F, Aerts A, Ahrén D, Brun A, Danchin EG, Duchaussoy F, Gibon J, Kohler A, Lindquist E, Pereda V, Salamov A, Shapiro HJ, Wuyts J, Blaudez D, Buée M, Brokstein P, Canbäck B, Cohen D, Courty PE, Coutinho PM, Delaruelle C, Detter JC, Deveau A, DiFazio S, Duplessis S, Fraissinet-Tachet L, Lucic E, Frey-Klett P, Fourrey C, Feussner I, Gay G, Grimwood J, Hoegger PJ, Jain P, Kilaru S, Labbé J, Lin YC, Legué V, Le Tacon F, Marmeisse R, Melayah D, Montanini B, Muratet M, Nehls U, Niculita-Hirzel H, Oudot-Le Secq MP, Peter M, Quesneville H, Rajashekar B, Reich M, Rouhier N, Schmutz J, Yin T, Chalot M, Henrissat B, Kües U, Lucas S, Van de Peer Y, Podila GK, Polle A, Pukkila PJ, Richardson PM, Rouzé P, Sanders IR, Stajich JE, Tunlid A, Tuskan G, Grigoriev IV: The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* 2008, 452:88-92.
- Martin F, Kohler A, Murat C, Balestrini R, Coutinho PM, Jaillon O, Montanini B, Morin E, Noel B, Percudani R, Porcel B, Rubini A, Amicucci A, Amselem J, Anthouard V, Arcioni S, Artiguenave F, Aury JM, Ballario P, Bolchi A, Brenna A, Brun A, Buée M, Cantarel B, Chevalier G, Couloux A, Da Silva C, Denoeud F, Duplessis S, Ghignone S, Hilselberger B, Iotti M, Marçais B, Mello A, Miranda M, Pacioni G, Quesneville H, Riccioni C, Ruotolo R, Splivallo R, Stocchi V, Tisserant E, Viscomi AR, Zambonelli A, Zampieri E, Henrissat B, Lebrun MH, Paolocci F, Bonfante P, Ottonello S, Wincker P: Perigord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* 2010, 464(7291):1033-1038.
- Massicotte HB, Peterson RL, Ackerley CA, Piché Y: Structure and ontogeny of *Alnus crispa* - *Alpova diplophloeus* ectomycorrhizae. *Canadian Journal of Botany* 1986, 64:177-192.
- Massicotte HB, Melville LH, Peterson RL: Scanning electron microscopy of ectomycorrhizae, potential and limitations. *Scanning Microscopy* 1987a, 1:1439-1454.
- Massicotte HB, Peterson RL, Ackerley CA, Ashford AE: Ontogeny of *Eucalyptus pilularis* - *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. II. Transmission electron microscopy. *Canadian Journal of Botany* 1987b, 65:1940-1947.

- Massicotte HB, Peterson RL, Ashford AE: Ontogeny of *Eucalyptus pilularis* – *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. I. Light microscopy and scanning electron microscopy. *Canadian Journal of Botany* 1987c, 65:1927-1939.
- Massicotte HB, Peterson RL, Melville LH: Ontogeny of *Alnus diplophloeus* ectomycorrhizae 1. Light microscopy and scanning electron microscopy. *Canadian Journal of Botany* 1989, 67:191-200.
- Massicotte HB, Peterson RL, Ackerley CA, Melville LH: Structure and ontogeny of *Betula alleghaniensis*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. *Canadian Journal of Botany* 1990, 68:579-593.
- Montanini B, Viscomi AR, Bolchi A, Martin Y, Siverio JM, Balestrini R, Bonfante P, Ottonello S: Functional properties and differential mode of regulation of the nitrate transporter from a plant symbiotic ascomycete. *Biochemical Journal* 2006b, 394:125-134.
- Montanini B, Levati E, Bolchi A, Kohler A, Morin E, Tisserant E, Martin F, Ottonello S: Genome-wide search and functional identification of transcription factors in the mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. *New Phytol* 2011, 189(3):736-50.
- Morin E, Kohler A, Baker AR, Foulongne-Oriol M, Lombard V, Nagy LG, Ohm RA, Patyshakuliyeva A, Brun A, Aerts AL, Bailey AM, Billette C, Coutinho PM, Deakin G, Doddapaneni H, Floudas D, Grimwood J, Hildén K, Kues U, Labutti KM, Lapidus A, Lindquist EA, Lucas SM, Murat C, Riley RW, Salamov AA, Schmutz J, Subramanian V, Wosten HA, Xu J, Eastwood DC, Foster GD, Sonnenberg AS, Cullen D, de Vries RP, Lundell T, Hibbett DS, Henrissat B, Burton KS, Kerrigan RW, Challen MP, Grigoriev IV, Martin F: Genome sequence of the button mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, 109(43):17501-17506.
- Nehls U, Mokolajewski S, Magel E, Hampp R: Carbohydrate metabolism in ectomycorrhizas: gene expression, monosaccharide transport and metabolic control. *New Phytologist* 2001, 150:533-541.
- Nygren CMR, Eberhardt U, Karlsson M, Parret JL, Lindahl BD, Taylor AFS: Growth on nitrate and occurrence of nitrate reductase-encoding genes in a phylogenetically diverse range of ectomycorrhizal fungi. *New Phytol* 2008, 180:875-889.
- Nylund JE: The ectomycorrhizal information zone and its relation to acid polysaccharides of cortical cell walls. *New Phytologist* 1987, 106:505-516.
- Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, Skriver K: NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in Plant Science* 2005, 10:79-87.
- Ohm RA, de Jong JF, de Bekker C, Wosten HA, Lugones LG: Transcription factor genes of *Schizophyllum commune* involved in regulation of mushroom formation. *Molecular Microbiology* 2011, 81:1433-45.
- Peterson RL and Bonfante P: Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas. *Plant and Soil* 1994, 159:79-88.
- Plett J.M., Kemppainen, M., Kale, S.D., Kohler, A., Legué, V., Brun, A., Tyler, B.M., Pardo, A.G. and Martin, F. (2011) A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Current biology* : CB, 21, 1197-1203.
- Plett JM, Montanini B, Kohler A, Ottonello S, Martin F: Tapping genomics to unravel ectomycorrhizal symbiosis. *Methods Mol Biol* 2011, 722:249-281.
- Rangel-Castro JJ, Danell E, Taylor AFS: Use of different nitrogen sources by the edible ectomycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius*. *Mycorrhiza* 2002, 12:131-137.
- Read DJ, Perez-Moreno J: Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? *New Phytologist* 2003, 157:475-492.
- Rennenberg H: The significance of ectomycorrhizal fungi for sulfur nutrition of trees. *Plant Soil* 1999, 215:115-122.
- Sebastiana M, Figueiredo A, Acioli B, Sousa L, Pessoa F, Balde A, Pais MS: Identification of plant genes involved on the initial contact between ectomycorrhizal symbionts (*Castanea sativa*-European chestnut and *Pisolithus tinctorius*). *European Journal of Soil Biology* 2009, 45:275-282.
- Schaeffer C, Johann P, Nehls U, Hampp R: Evidence for an up-regulation of the host and a down-regulation of the fungal phosphofructokinase activity in ectomycorrhizas of Norway spruce and fly agaric. *New Phytol* 1996, 134:697-702.

- Shi Y, Shi Y: Metabolic enzymes and coenzymes in transcription—a direct link between metabolism and transcription? *Trends in Genetics* 2004, 20:445-452.
- Smith SE and Read DJ. In *Mycorrhizal Symbiosis*. 2nd edition. London, UK: Academic Press; 1997.
- Smith SE, Read DJ. In *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd edition. London, UK: Academic Press; 2008.
- Sopko R, Raithatha S, Stuart D. Phosphorylation and maximal activity of *Saccharomyces cerevisiae* meiosis-specific transcription factor Ndt80 is dependent on Ime2. *Mol Cell Biol*. 2002 Oct;22(20):7024-40
- Stajich JE, Wilke SK, Ahrén D, Au CH, Birren BW, Borodovsky M, Burns C, Canbäck B, Casselton LA, Cheng CK, Deng J, Dietrich FS, Fargo DC, Farman ML, Gathman AC, Goldberg J, Guigó R, Hoegger PJ, Hooker JB, Huggins A, James TY, Kamada T, Kilaru S, Kodira C, Kües U, Kupfer D, Kwan HS, Lomsadze A, Li W, Lilly WW, Ma LJ, Mackey AJ, Manning G, Martin F, Muraguchi H, Natvig DO, Palmerini H, Ramesh MA, Rehmeier CJ, Roe BA, Shenoy N, Stanke M, Ter-Hovhannisyanyan V, Tunlid A, Velagapudi R, Vision TJ, Zeng Q, Zolan ME, Pukkila PJ: Insights into evolution of multicellular fungi from the assembled chromosomes of the mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, 107:11889-11894.
- Stark JM, Hart SC: High rates of nitrification and nitrate turnover in undisturbed coniferous forests. *Nature* 1997, 385:61-64.
- Stegmaier P, Kel AE, Wingender E: Systematic DNA-binding domain classification of transcription factors. *Genome Informatics* 2004, 15:276-286.
- Stracke R, Werber M, Weisshaar B: The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology* 2001, 4:447-456.
- Szurek B, Marois E, Bonas U, Van den Ackerveken G: Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J* 2001, 26(5):523-34.
- Titz B, Thomas S, Rajagopala SV, Chiba T, Ito T, Uetz P: Transcriptional activators in yeast. *Nucleic Acids Research* 2006, 34:955-967.
- Trépanier M, Bécard G, Moutoglis P, Willemot C, Gagné S, Tyler AS, Rioux JA: Dependence of arbuscular-mycorrhizal fungi on their plant host for palmitic acid synthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 2005, 71:5341-5347.
- Tripathi G, Wiltshire C, Macaskill S, Tournu H, Budge S, Brown AJP: Gcn4 co-ordinates morphogenetic and metabolic responses to amino acid starvation in *Candida albicans*. *The EMBO Journal* 2002, 21(20):5448-5456.
- Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, Schein J, Sterck L, Aerts A, Bhalerao RR, Bhalerao RP, Blaudez D, Boerjan W, Brun A, Brunner A, Busov V, Campbell M, Carlson J, Chalot M, Chapman J, Chen GL, Cooper D, Coutinho PM, Couturier J, Covert S, Cronk Q, Cunningham R, Davis J, Degroevé S, Déjardin A, Depamphilis C, Detter J, Dirks B, Dubchak I, Duplessis S, Ehlting J, Ellis B, Gendler K, Goodstein D, Gribskov M, Grimwood J, Groover A, Gunter L, Hamberger B, Heinze B, Helariutta Y, Henrissat B, Holligan D, Holt R, Huang W, Islam-Faridi N, Jones S, Jones-Rhoades M, Jorgensen R, Joshi C, Kangasjärvi J, Karlsson J, Kelleher C, Kirkpatrick R, Kirst M, Kohler A, Kalluri U, Larimer F, Leebens-Mack J, Leplé JC, Locascio P, Lou Y, Lucas S, Martin F, Montanini B, Napoli C, Nelson DR, Nelson C, Nieminen K, Nilsson O, Pereda V, Peter G, Philippe R, Pilate G, Poliakov A, Razumovskaya J, Richardson P, Rinaldi C, Ritland K, Rouzé P, Ryaboy D, Schmutz J, Schrader J, Segerman B, Shin H, Siddiqui A, Sterky F, Terry A, Tsai CJ, Uberbacher E, Unneberg P, Vahala J, Wall K, Wessler S, Yang G, Yin T, Douglas C, Marra M, Sandberg G, Van de Peer Y, Rokhsar D: The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 2006, 313(5793):1596-604.
- Van Bergen En Henegouwen, P.M. (2009) Eps15: a multifunctional adaptor protein regulating intracellular trafficking. *Cell communication and signaling : CCS*, 7, 24.
- Vecchi, M., Polo, S., Poupon, V., van de Loo, J.W., Benmerah, a. and Di Fiore, P.P. (2001) Nucleocytoplasmic shuttling of endocytic proteins. *The Journal of cell biology*, 153, 1511-1517.
- Veneault-Fourrey C and Martin F: Mutualistic interactions on a knife-edge between saprotrophy and pathogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* 2011, 14:444-450
- Wallenda T, Read DJ: Kinetics of amino acid uptake by ectomycorrhizal roots. *Plant Cell Environ* 1999, 22:179-187.

- Wang Y, Zhang X, Zhang H, Lu Y, Huang H, Dong X, Chen J, Dong J, Yang X, Hang H, Jiang T. Coiled-coil networking shapes cell molecular machinery. *Mol Biol Cell*. 2012 Oct;23(19):3911-22.
- Weiss H, Friedrich T, Hofhaus G, Preis D: The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *Eur J Biochem* 1991, 197(3):563-576.
- Wilson RA, Calvo AM, Chang P-K, Keller NP: Characterization of the *Aspergillus parasiticus* DELTA12-desaturase gene: a role for lipid metabolism in the *Aspergillus*-seed interaction. *Microbiology* 2004, 150:2881-2888.
- Woelk T, Oldrini B, Maspero E, Confalonieri S, Cavallaro E, Di Fiore PP, Polo S (2006) : Molecular mechanisms of coupled monoubiquitination. *Nature Cell Biology* 8(11):1246-54
- Wong KKY, Piché Y, Montpetit D, Kropp BR: Differences in the colonisation of *Pinus banksiana* roots by sib-monokaryotic and dikaryotic strains of ectomycorrhizal *Laccaria bicolor*. *Canadian Journal of Botany* 1989, 67:1717-1726.
- Wong KKY, Piché Y, Fortin JA. Differential development of root colonisation among four closely related genotypes of ectomycorrhizal *Laccaria bicolor*. *Mycological Research* 1990, 94:876-884.
- Wright DP, Johansson T, Le Quere A, Söderström B, Tunlid A: 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 Phytologist* 2005, 167:579-596.

Acknowledgments

Y. D. is supported by a Ph.D. scholarship from the French Ministère de la Recherche et de la Technologie. This work was supported by grants from the US Department of Energy – Oak Ridge National Laboratory Scientific Focus Area for Genomics Foundational Sciences (Project Plant– Microbe Interfaces) and the Region Lorraine (to FM). FM’s research group is part of the Laboratory of Excellence ARBRE (ANR-12-LABX-0002_ARBRE).

Chapitre V : Discussion générale

Laccaria MiSSP7 is targeted to host cell nucleus

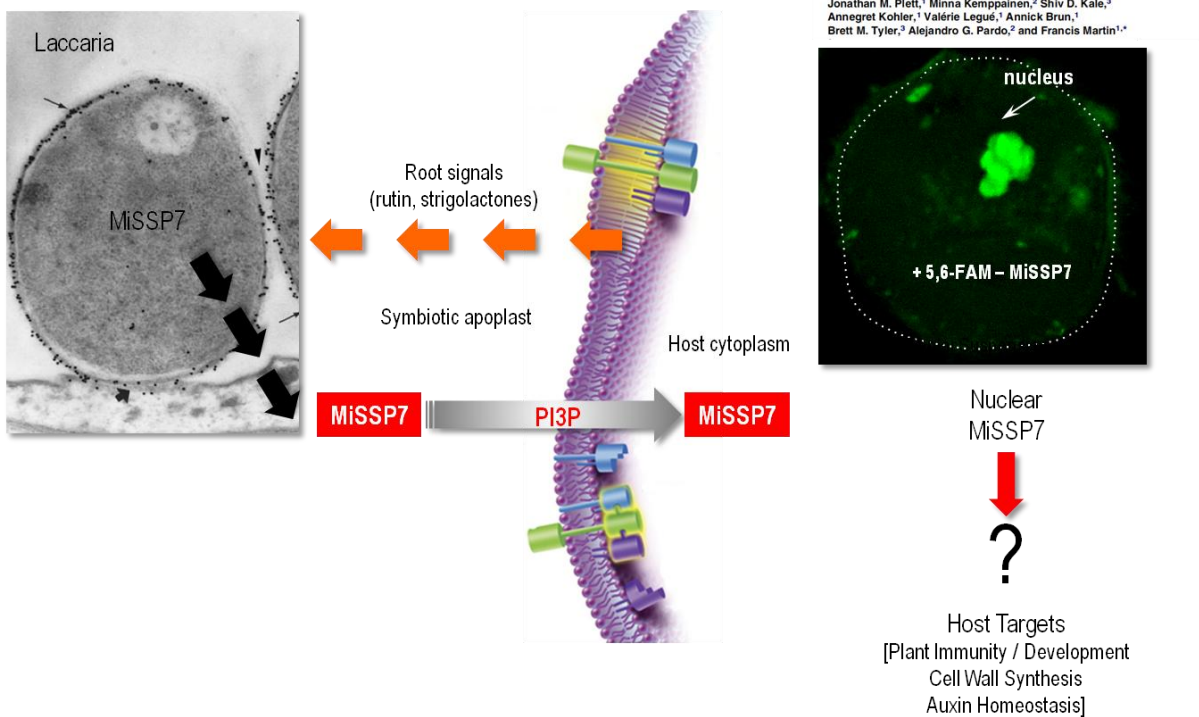


Figure V.1 : Représentation schématique des principales connaissances acquises sur MiSSP7 avant mon arrivé en thèse. Au cours de l'interaction symbiotique entre *L. bicolor* et *P. trichocarpa*, le champignon sécrète MiSSP7, une petite protéine de 7 kDa essentielle au développement des mycorhizes. Une fois dans l'apoplaste, MiSSP7 est transportée dans les cellules végétales par endocytose puis dans le noyau où elle modifie le transcriptome de la plante hôte.

Récemment, MiSSP7 a été caractérisée comme une protéine essentielle à la colonisation des racines du peuplier par *L. bicolor* et en particulier, à la formation du réseau de Hartig. La perception par les cellules fongiques d'exudats racinaires, et notamment de composés tels que la rutine et les strigolactones, induit la synthèse de MiSSP7 (Plett et Martin, 2011). Après sa sécrétion, MiSSP7 est transportée à l'intérieur de la cellule végétale et adressée au noyau (Plett *et al.*, 2011 ; Figure V.1). Une partie de mon travail a consisté à poursuivre la caractérisation fonctionnelle de MiSSP7 afin d'identifier son rôle dans la cellule végétale et par extension dans le développement symbiotique.

V.1. Le rôle de MiSSP7 dans le développement de la symbiose.

V.1.1. MiSSP7 cible deux protéines JAZ, PtJAZ5 et PtJAZ6.

Le génome de *P. trichocarpa* code 15 gènes JAZs dont 10 seulement sont exprimés dans les racines. Il s'agit de POPTR_0001s16640 (orthologue d'AtJAZ5), POPTR_0003s06670 (orthologue d'AtJAZ6), POPTR_0003s16350, POPTR_0006s14160 (orthologue d'AtJAZ1), POPTR_0008s13290, POPTR_0010s11850, POPTR_0011s02260 (orthologue d'AtJAZ8), POPTR_0012s04220 (orthologue d'AtJAZ3), POPTR_0015s04880 (orthologue d'AtJAZ4) et POPTR_0018s08300 (orthologue d'AtJAZ12). A l'instar des récepteurs JAZs d'*A. thaliana*, la famille des protéines JAZ de *P. trichocarpa* est très divergente. La recherche des cibles végétales de l'effecteur symbiotique MiSSP7, via le système double hybride en levure nous a permis de montrer qu'il ne cible que les protéines PtJAZ5 et PtJAZ6, parmi les récepteurs JAZs exprimés dans les racines (Chapitre II, Figure 1). Si le rôle des protéines JAZ est conservé entre *A. thaliana* et le peuplier, nous pouvons supposer que ces deux protéines soient impliquées dans la voie de signalisation induite par l'AJ chez le peuplier.

Certains effecteurs d'agents pathogènes bactériens ou fongiques sont également capables de réguler la voie de signalisation induite par l'AJ de la plante en ciblant des récepteurs JAZ. Par exemple, les agents phytopathogènes *Pseudomonas syringae* et *Hyaloperonospora arabidopsidis* produisent tous les deux des effecteurs ayant pour cible AtJAZ3 (Mukhtar *et al.*, 2011). De plus, *P. syringae* produit la coronatine. Il s'agit d'une molécule qui mime le rôle de JA-Ile et est capable de se lier au site actif des récepteurs JAZ (Weiler *et al.*, 1994; Koda *et al.*, 1996; Bender *et al.*, 1999). Cette fixation induit les réponses dépendantes de l'AJ et inhibe les réponses de défense médiées par l'AS.

Bien que les séquences protéiques des récepteurs JAZ de *P. trichocarpa* soient globalement très divergentes, PtJAZ5 et PtJAZ6 présentent de fortes similarités de séquence avec 73% d'acides aminés identiques (Chapitre II, Figure S1). Cela pourrait expliquer la spécificité de l'interaction de MiSSP7 avec PtJAZ5 et PtJAZ6. Une telle spécificité de la part d'un effecteur symbiotique reflète celle qui a été observé pour les effecteurs d'autres agents phytopathogènes. En effet, les effecteurs produits par *P. syringae* et *H. arabidopsidis* ne ciblent qu'un seul récepteur JAZ chez *Arabidopsis*, AtJAZ3 (Mukhtar *et al.*, 2011). Toutefois, l'effecteur coronatine produit par *P. syringae* est supposé se lier à tous les récepteurs JAZ (Katsir *et al.*, 2008; Fonseca *et al.*, 2009). Nous avons confirmé l'interaction de MiSSP7 avec PtJAZ6 par une autre méthode en système bactérien (Edwards *et al.*, 2009). Nous avons également tenté de la confirmer par co-immuno précipitation *in planta* après expression transitoire sur feuilles de tabac des fusions FLAG-MiSSP7 et GFP-PtJAZ6 mais sans succès (Petre *et al.*, résultats non publiés). Ceci pourrait être dû à l'instabilité de la protéine fusion PtJAZ6-GFP et pourrait être amélioré par l'utilisation d'inhibiteurs de protéases et du protéasome stabilisant la protéine JAZ (VanWees *et al.*, ; information personnelle). L'interaction de MiSSP7 avec PtJAZ6 a également été confirmée avec succès par BiFC (Chapitre II, Figure 1).

Bien que Klopffholz et ses collaborateurs (2011) aient récemment démontré que le champignon symbiotique arbusculaire *G. intraradices* produit au moins un effecteur capable de cibler la voie de signalisation induite par l'éthylène, nos travaux démontrent pour la première fois qu'un champignon ectomycorhizien produit un effecteur capable de cibler les voies de signalisation hormonales. Toutefois, il reste à démontrer comment le contrôle de la voie de signalisation dépendante de l'AJ impacte le développement de la symbiose : est-ce un contrôle de l'immunité de la plante hôte et/ou un contrôle développemental ?

V.1.2. PtJAZ6 interagit avec Pt14-3-3 et PtMYC

Un croisement double hybride contre les banques d'ADNc d'ectomycorhizes et de racines, avec PtJAZ6 comme appât, m'a permis de montrer que PtJAZ6 interagit avec plusieurs protéines de peuplier pour former un potentiel complexe de régulation. Ce complexe comprend les protéines PtJAZ6, Pt14-3-3 et PtMYC (Figure V.2). Toutes ces interactions ont été confirmées en système bactérien et doivent être vérifiées par le système BiFC. Aucune protéine adaptatrice de type NINJA n'a pu être identifiée, ce qui contraste avec ce qui est connu chez le modèle *A. thaliana* (Pauwels et Goossens, 2011).

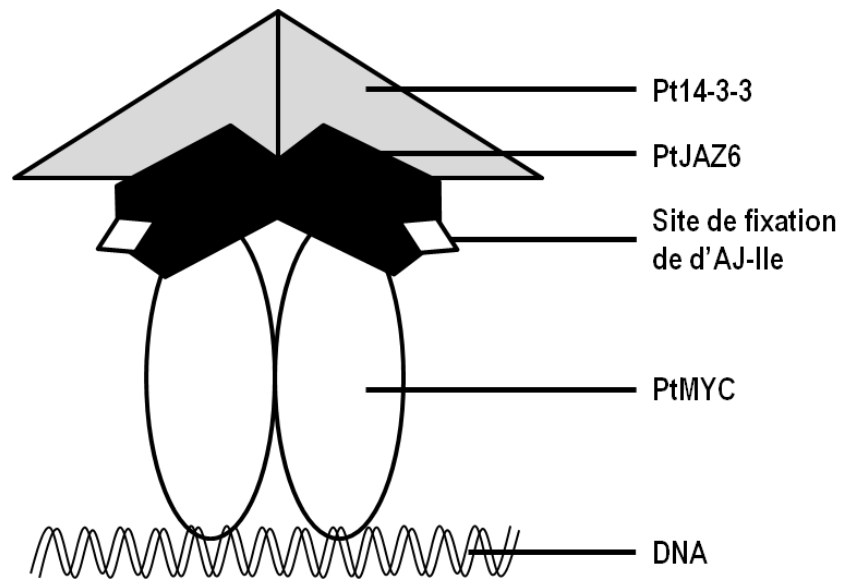


Figure V.2 : Représentation schématique du complexe de régulation hypothétique formé par PtJAZ6, Pt14-3-3 et PtMYC.

Dans ce complexe, la protéine Pt13-3-3 pourrait jouer le rôle de protéine d'échafaudage. Les organismes eucaryotes possèdent généralement plusieurs isoformes de la protéine 14-3-3, dont 12 chez les plantes, y compris chez *A. thaliana*, la tomate et le tabac (Ferl *et al.*, 2002; Bridges et Moorhead 2005). Les protéines 14-3-3 constituent généralement des homodimères ou des hétérodimères. Au cours de nos croisements doubles hybrides avec PtJAZ6, nous n'avons détecté qu'un seul représentant de cette famille, capable de former des homodimères (Figure V.2). Les protéines 14-3-3 sont impliquées dans la régulation de nombreux processus biologiques, tels que le métabolisme primaire, la transduction de signaux, le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose, le trafic des protéines, la transcription et la réponse au stress (Ponts et Moorhead, 2005; Darling *et al.*, 2005; Morrison, 2009 ; Roberts *et al.*, 2002; Sehnke *et al.*, 2002; Roberts, 2003). Elles peuvent avoir différentes fonctions comme (1) stabiliser des protéines cibles en empêchant leur dégradation ou leur déphosphorylation par des protéases ou des phosphatases, (2) déclencher un changement de conformation pour activer ou inhiber l'activité d'une protéine cible, (3) agir comme des protéines d'échafaudage ou (4) faire naviguer des protéines cibles d'un endroit à l'autre de la cellule (Darling *et al.*, 2005). En système double hybride, les interactions de Pt14-3-3 avec elle-même et avec PtJAZ6 sont plus fortes que l'interaction de PtJAZ6 avec elle-même, ce qui est en accord avec un rôle de protéine d'échafaudage au sein d'un complexe de régulation. Plusieurs publications suggèrent également que les protéines 14-3-3 jouent un rôle dans la réponse immunitaire, notamment chez l'orge, le soja, la tomate et *Arabidopsis* (Seehaus et Tenhaken, 1998; Finnie *et al.*, 2002; Roberts et Bowles, 1999; Yang *et al.*, 2009). Bien que le rôle précis des protéines 14-3-3 dans l'immunité des plantes soit peu connu, il doit avoir son importance. En effet, de récents travaux ont montré que ces protéines peuvent être la cible d'effecteurs tels que HopQ1, sécrété par *P. syringae* au cours de l'infection d'un plant de tomate (Giska *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2013). Chez le peuplier, MiSSP7 est incapable d'interagir avec Pt14-3-3.

Certains de nos résultats vont dans le sens d'un rôle spécifique de PtJAZ6 dans une voie de signalisation contrôlant le développement symbiotique. En effet, le complexe de régulation qu'il forme est différent de ceux précédemment décrits chez *A. thaliana*, généralement dans les feuilles. Par exemple, l'orthologue de la protéine PtMYC (POPTR_0014s09520) n'a pas été identifié chez *A. thaliana* comme interagissant avec AtJAZ6 ni aucun autre récepteur JAZ.

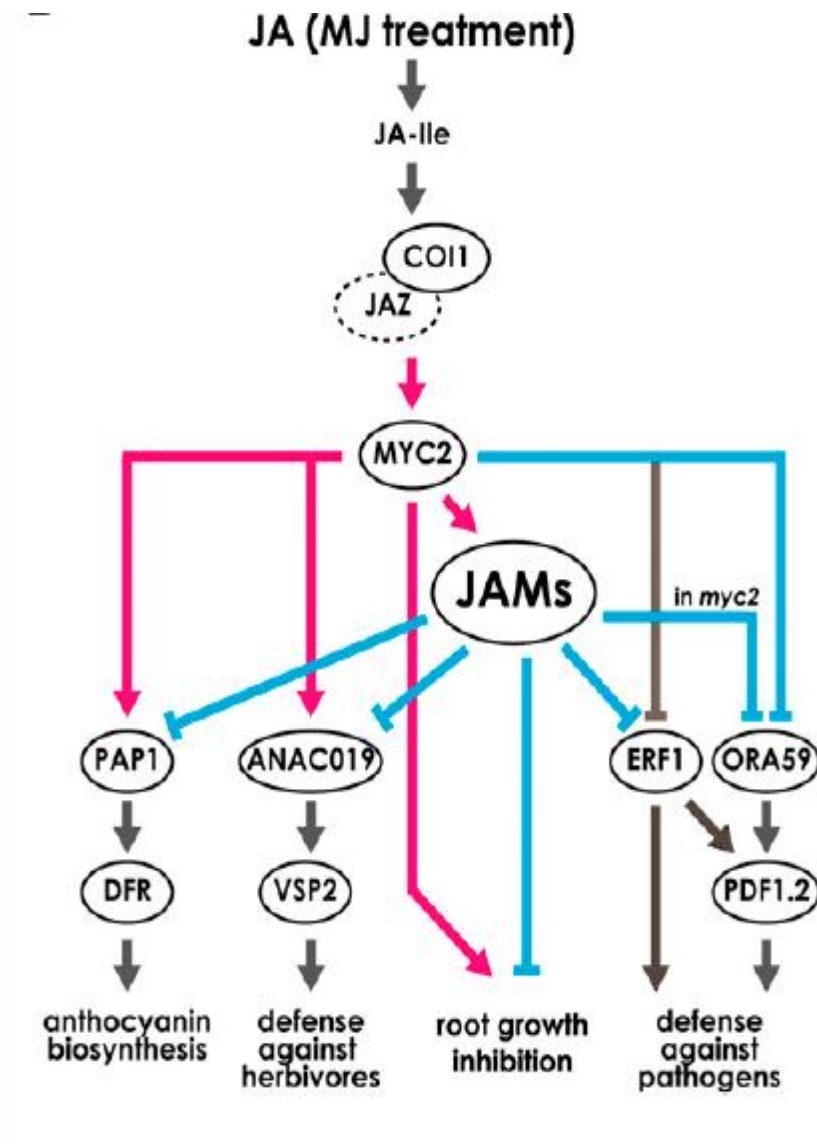


Figure V.3 : Modèle de régulation par les JAMs et MYC2 de la voie de signalisation induite en réponse à l'AJ (Sasaki-Sekimoto et al., 2013). Suite à la reconnaissance d'AJ-Ile par le complexe corécepteur JAZ-COI1, MYC2 est activé et régule à son tour l'expression d'autres facteurs de transcriptions dont les JAMs. Ces derniers répriment l'expression des gènes cibles de MYC2. Les flèches rose et bleus montrent respectivement les régulations positives et négatives mises en évidence dans le papier de Sasaki-Sekimoto et al., (2013) tandis que les flèches grises illustrent des régulation mises en évidence dans des travaux antérieurs. La répression d'ORA59 par les JAMs n'a été observée que dans les mutants *myc2*.

Néanmoins, PtMYC présente respectivement 63% et 62.2% de similarité avec les facteurs de transcription bHLH AtJAM2 (JASMONATE ASSOCIATED MYC2-LIKE 2, AT1G01260) et AtJAM1 (JASMONATE ASSOCIATED MYC2-LIKE 1, AT2G46510) d'*A. thaliana*. Très récemment, l'utilisation de mutants chez *A. thaliana* a permis de montrer que AtJAM1, AtJAM2 et AtJAM3 sont des régulateurs négatifs des réponses induites par l'AJ, et ce de manière antagoniste à AtMYC2 (Sasaki-Sekimoto *et al.*, 2013 ; Nakata *et al.*, 2013). Les auteurs mettent en évidence l'effet négatif des JAMs sur l'inhibition de la croissance racinaire médiée par l'AJ et la mise en place de réactions de défense contre les insectes herbivores, induites par MYC2 en réponse à l'AJ (Sasaki-Sekimoto *et al.*, 2013 ; Nakata *et al.*, 2013 ; Figure V.3). Si une telle régulation existe dans les racines de *P. trichocarpa*, le blocage par MiSSP7 de la voie de signalisation induite par l'AJ n'aurait peut être pas que pour effet d'inhiber les réactions de défense de la plante mais de contrôler son développement racinaire. Cela pourrait contribuer à expliquer l'arrêt de la croissance racinaire observée dès les premières étapes de la mycorhization (Felten *et al.*, 2009, 2010). Toutefois, nos résultats ne nous permettent pas d'affirmer que PtJAZ6 n'interagit qu'avec PtMYC au cours du développement symbiotique. D'autres facteurs de transcription pourraient être impliqués. En effet, les protéines JAZ sont connues pour interagir avec de nombreux TFs dont certains sont connus pour être impliqués dans les voies de signalisation hormonales de l'AS ou de l'ET (Pauwels et Goossens, 2011). Ainsi la diversité des TFs qui interagissent avec les récepteurs JAZ et la complexité des régulations contrôlant la voie de signalisation induite par l'AJ sont encore loin d'être élucidées. Nous avons également montré que PtMYC est capable de dimériser, mais n'interagit pas avec Pt14-3-3 (Figure V.2). La formation de dimères et le fait que les TFs JAMs aient plutôt un rôle de répresseur chez *A. thaliana* pourrait expliquer que PtMYC n'autoactive pas l'expression des gènes rapporteurs en levure.

V.1.3. *L. bicolor* utilise MiSSP7 pour bloquer la voie de signalisation JA-dépendante et favoriser la colonisation des racines par le champignon

Dans le modèle d'interaction entre plante et champignon pathogène, les voies de signalisation dépendantes de l'AJ et de l'ET inhibent généralement la colonisation des agents pathogènes nécrotrophes et des insectes nuisibles tandis que la voie de signalisation médiée par l'AS régule la mise en place des réactions de défense contre les microorganismes biotrophes et hémibiotrophes (Cohen *et al.*, 1993; McDowell et Dangl, 2000; Thomma *et al.*, 2000; Thomma *et al.*, 2001, b; Kunkel et Brooks, 2002).

Plusieurs études ont démontré l'effet négatif de la voie de signalisation dépendante de l'AS sur le taux d'infection et de nodulation par les *Rhizobia*, microorganismes mutualistes (Martinez-Abarca *et al.*, 1998 ; Stacey *et al.*, 2006 ; Van Spronsen *et al.*, 2003 ; Peleg-Grossman *et al.*, 2009). Elles ont cependant développé des mécanismes efficaces pour contrôler la concentration de la plante hôte en AS et favoriser la symbiose, *via* l'utilisation de facteurs Nod (Martinez-Abarca *et al.*, 1998 ; Mitra et Long, 2004 ; Oldroyd et Downie, 2008 ; Pieterse *et al.*, 2009). De façon similaire, les champignons mycorhiziens à arbuscule répriment les réactions de défense dépendantes de l'AS grâce à l'utilisation de facteurs Myc (Blilou *et al.*, 1999 ; Medina *et al.*, 2003 ; Lopez-Raez *et al.*, 2010), ce qui se traduit par une accumulation de l'AJ dans les racines mycorhizées (Hause *et al.*, 2002 ; Isayenkov *et al.*, 2005 ; Lopez-Raez *et al.*, 2010 ; Stumpe *et al.*, 2005). Dans ces interactions, le rôle de AJ dans le contrôle de la colonisation fongique *via* la mise en place de réactions de défense a plusieurs fois été proposé (Gutjahr et Paszkowski, 2009; Hause *et al.*, 2007; Lopez-Raez *et al.*, 2010). Toutefois, les résultats obtenus sont très controversés et semblent dépendre de la plante modèle utilisée. Par exemple l'application exogène de 5µM d'AJ sur des feuilles d'*Allium sativum* favorise la colonisation par le champignon symbiotique (Regvar *et al.*, 1996), alors que l'application exogène de concentrations plus élevées et / ou plus fréquente d'AJ sur des feuilles de *Tropaeolum majus*, *Carica papaya*, *Cucumis sativus* et *Solanum lycopersicum* réduit significativement la colonisation par *G. intraradices* (Ludwig-Müller *et al.*, 2002; Herrera-Medina *et al.*, 2008). Par ailleurs, des expériences de génétique (utilisation de mutants *lox3* et *coi1*) montrent que la voie de signalisation induite par l'AJ n'a pas d'effet sur la colonisation des racines de *Nicotiana attenuata* par *G. intraradices*. A l'inverse, les mutants de tomate *jar1*, *spr2* et *defl* affectés dans la voie de biosynthèse de l'AJ présentent un taux de mycorhization moins important que le cultivar sauvage (Leon-Morcillo *et al.*, 2012). Toutefois, Landgraf et ses collaborateurs (2012) ont montré que chez certaines plantes hôtes comme *Medicago truncatula*, la voie de signalisation dépendante de l'AJ favorise la colonisation par *G. intraradices*. Par ailleurs, le champignon endophyte *Piriformospora indica* induit la surexpression des gènes de biosynthèse de l'AJ dans les racines, suggérant que l'activation de la voie de signalisation induite par l'AJ est peut être une stratégie répandue, utilisée par les plantes pour contrôler la colonisation par des champignons endophytes bénéfiques.

La voie de signalisation ET dépendante semble avoir un effet similaire sur le contrôle de la colonisation des racines de la plante hôte par des *Rhizobia* (Penmetsa et Cook, 1997; Vasse *et al.*, 1993; Varma-Penmetsa *et al.*, 2008), des champignons mycorhiziens à arbuscules (Kloppholz *et al.*, 2011) ainsi que des champignons endophytes bénéfiques (Camehl *et al.*, 2010).

Dans le système *L. bicolor* – *P. trichocarpa*, l'application exogène de AJ et MeAJ sur des racines de peuplier au cours d'un test de mycorhization *in vitro* inhibe la formation du réseau de Hartig (Chapitre II, Figure 4). De plus, une réduction de l'expression de *PtJAZ6* par RNAi chez le peuplier réduit la capacité de *L. bicolor* à coloniser les racines, alors qu'une sur-expression de *PtJAZ6* complémente au moins partiellement la capacité à former le réseau de Hartig des mutants *missp7* RNAi de *L. bicolor* (Chapitre II, Figure 4). Ainsi, *PtJAZ6* semble jouer un rôle essentiel dans le contrôle de la colonisation des racines de peuplier par *L. bicolor*. Il reste à démontrer si la variation de l'expression d'autres récepteurs JAZ du peuplier a des effets similaires sur le potentiel de colonisation de *L. bicolor* ou si *PtJAZ6* joue un rôle spécifique lors de la colonisation des racines par un champignon ectomycorhizien. Par ailleurs, l'analyse des transcriptomes de racines de peupliers transgéniques surexprimant MiSSP7 et de racines de peupliers cultivés en présence du peptide synthétique MiSSP7 (Plett *et al.*, 2011a) montre l'induction d'un ensemble de gènes connus pour être induits par l'AS. Toutes ces expériences nous ont permis d'émettre **l'hypothèse que l'interaction entre MiSSP7 et PtJAZ6 bloque la voie de signalisation médiée par l'AJ.**

Plusieurs modèles peuvent être émis pour expliquer comment l'interaction MiSSP7-PtJAZ6 bloquerait la voie de signalisation médiée par l'AJ :

(i) À l'instar de la coronatine, MiSSP7 pourrait se lier à *PtJAZ6* au niveau du site de liaison de JA-Ile (Figure V.4A). Cette hypothèse est corroborée par le fait qu'une concentration élevée en coronatine (molécule mimant AJ-Ile) diminue la force de l'interaction entre MiSSP7 et *PtJAZ6* (inhibition compétitive; Chapitre II, Figure 3) et que MiSSP7 est capable de bloquer l'effet d'une application exogène de MeJA (précurseur de la voie de biosynthèse de JA) sur le peuplier et *N. benthamiana* (Chapitre II, Figure 1). En effet, bien que l'application de 10 nM de MeJA sur des racines de peuplier inhibe la formation du réseau de Hartig par *L. bicolor*, l'application conjointe de 15 μ M de MiSSP7 et 10 nM de MeJA rétablit la capacité du champignon à former un réseau.

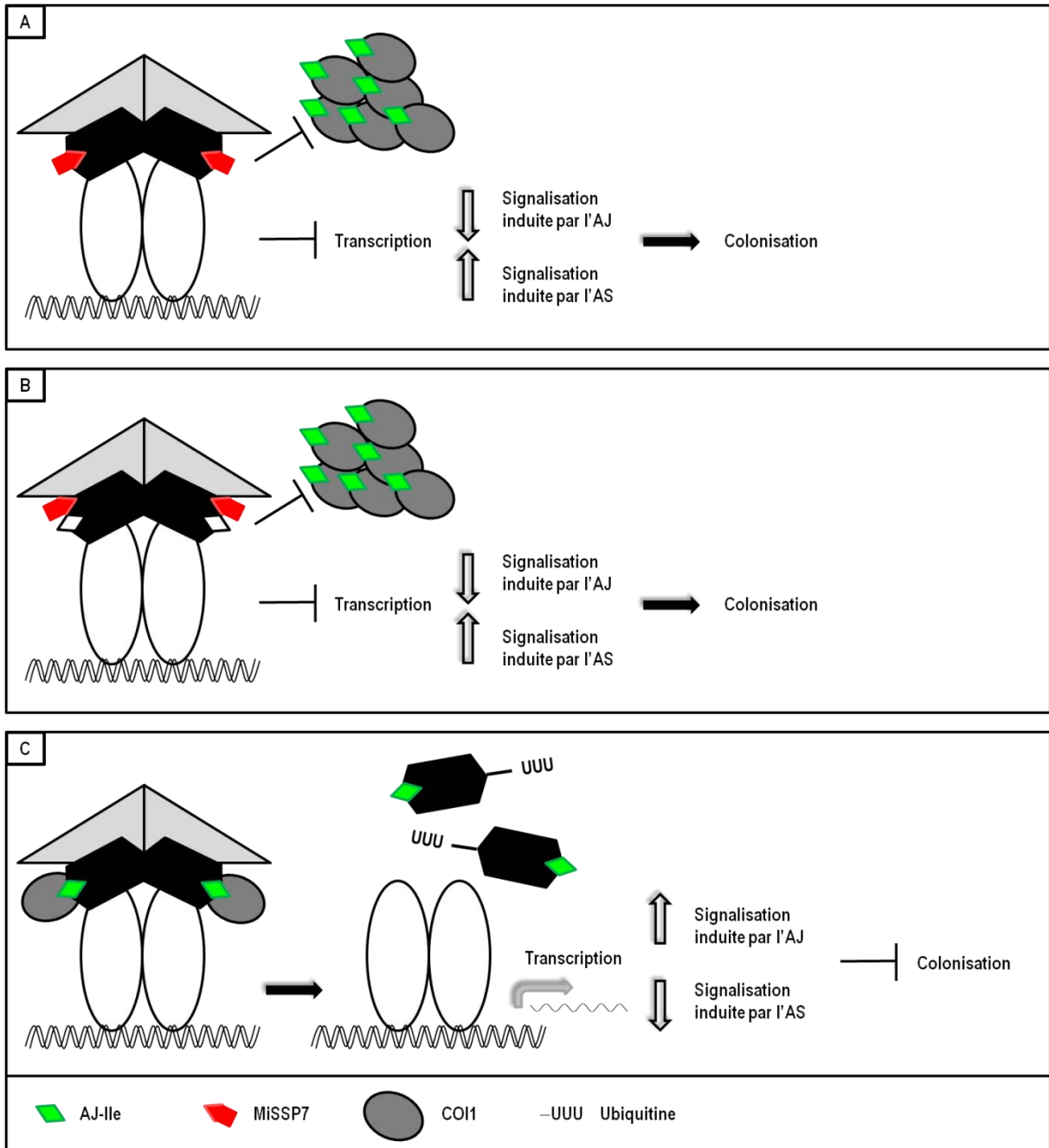


Figure V.4 : modélisation du mécanisme par lequel MiSSP7 bloque la voie de signalisation induite par l'AJ. A) MiSSP7 bloque la fixation d'AJ-Ile et maintient la répression de PtJAZ6 sur PtMYC favorisant la signalisation induite par l'AS et la colonisation par *Laccaria*. B) MiSSP7 bloque la fixation de COI1 et maintient la répression de PtJAZ6 sur PtMYC favorisant la signalisation induite par l'AS et la colonisation par *Laccaria*. C) En l'absence de MiSSP7, le complexe corécepteur PtJAZ6-PtCOI1 fixe l'AJ-Ile et induit la dégradation de PtJAZ6. PtMYC régule l'expression de ses gènes cibles ce qui conduit à une inhibition de la voie de signalisation induite par l'AS et de la colonisation par *L. bicolor*.

De même, le prétraitement de feuilles de tabac avec MeJA+H₂O ou MeJA+MeJA avant infiltration de *P. syringae* diminue la croissance des bactéries tandis que le prétraitement avec MeJA+MiSSP7 l'augmente en comparaison avec le traitement contrôle (H₂O+H₂O) (Chapitre II, Figure 3). Des expériences de compétition de fixation entre Ja-Ile et MiSSP7 sur PtJAZ6 sont envisagées pour tester ce modèle.

(ii) MiSSP7 pourrait également bloquer l'interaction de PtJAZ6 avec une autre protéine, qui aurait pour fonction d'ubiquitinyler le récepteur JAZ et d'entraîner sa dégradation *via* le protéasome (Figure V.4B). Chez *Arabidopsis*, le turnover des récepteurs JAZ est contrôlé par ubiquitinylation *via* la protéine AtCOI1 (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007). Chez le peuplier, il existe deux orthologues d'AtCOI1 (At2g39940) que nous avons respectivement nommées PtCOI1 (POPTR_0008s06460) et PtCOI2 (POPTR_0010s20030). Les séquences protéiques de PtCOI1 et PtCOI2 présentent respectivement 75.2 % et 75 % de similarité avec AtCOI1. Notre analyse en double-hybride montre que PtJAZ6 est capable d'interagir uniquement avec PtCOI1 en présence de coronatine (Chapitre II, Figure 2). Deux résidus arginine (R205 et R206) sont essentiels à l'interaction des récepteurs JAZ avec AtCOI1 chez *A. thaliana* (Melotto *et al.*, 2008). Les deux protéines JAZ, AtJAZ7 et AtJAZ8, qui ne sont pas capable d'interagir avec AtCOI1 ne possèdent pas ces deux résidus (Chung *et al.*, 2010). L'étude de la séquence protéique de PtJAZ6 a montré que ces deux résidus sont bien présents (R208 et R209) contrairement à PtJAZ5. Les tests d'interaction entre PtJAZ5 et PtCOI sont en cours et devraient donc nous permettre de conclure sur l'importance de ces résidus. Afin de vérifier si MiSSP7 bloque l'interaction de PtJAZ6 avec PtCOI1, il est indispensable de tester l'interaction de PtJAZ6 avec PtCOI1 en présence et en absence de MiSSP7, en présence de coronatine. Le système Y2H n'est pas adapté pour tester des interactions multiples entre protéines. Toutefois, ajouter du peptide MiSSP7 dans le milieu pourrait être envisagé. Des méthodes alternatives sont envisageables comme l'utilisation du BiFC, par exemple.

(iii) Le troisième modèle possible impliquerait que la fixation de MiSSP7 à PtJAZ6 entraîne la dissociation du complexe de régulation PtJAZ / PtMYC. Néanmoins, cela paraît peu probable car de précédentes études montrent que l'intégrité du complexe PtJAZ / PtMYC est nécessaire à la répression des gènes de défense (Chini *et al.*, 2007), une répression qui, au vu de nos résultats, est maintenue par MiSSP7.

Ainsi, les deux premières hypothèses semblent les plus probables. Que ce soit en entrant en compétition avec JA-Ile ou en empêchant PtCOI1 de se fixer à PtJAZ6, MiSSP7 semble stabiliser PtJAZ6 en empêchant sa dégradation et donc la levée de la répression des gènes de réponse à l'AJ. Des études préliminaires en expression transitoire dans les feuilles de tabac mettent en évidence une possible stabilisation de PtJAZ6 en présence de MiSSP7 et d'AJ (Veneault-Fourrey Claire). Néanmoins des mises au point sont encore nécessaires, notamment liées à l'instabilité naturelle des protéines JAZ et en particulier lors de leur surexpression (Chapitre II, Figure 3). Des expériences complémentaires sont aussi en cours pour tester cette stabilité en protoplastes de peuplier. Nous avons montré que PtJAZ6 est capable de former des homodimères et les travaux réalisés chez *Arabidopsis* ont montré que les récepteurs JAZ peuvent former des hétérodimères. La question qui se pose alors est la suivante : Dans quelle mesure MiSSP7 est capable de stabiliser des hétérodimères formés par PtJAZ6 ou PtJAZ5 et d'autres récepteurs JAZ du peuplier ? Quelles sont les conséquences réelles de la fixation de MiSSP7 à PtJAZ6 et / ou PtJAZ5 ?

En plus de démontrer que les micro-organismes pathogènes et symbiotiques utilisent des processus similaires (*via* la sécrétion d'effecteurs comme moyen de communication) pour contrôler les défenses et / ou le développement de leur plante hôte pour favoriser la colonisation, nos résultats montrent que les voies de signalisation hormonales connues pour inhiber le développement d'agents pathogènes biotrophes (Kuč, 1982; Parbery, 1996) pourraient faciliter la croissance *in planta* des champignons ectomycorhiziens. Ainsi, bien que MiSSP7 cible le même type de protéines que les effecteurs d'agents pathogènes, ils contrôlent les voies de signalisation de la plante de façons opposées. Plusieurs questions se posent alors : Est-ce un effet transitoire pour autoriser la colonisation fongique ? Existe-t-il un signal systémique ou est-il localisé ? S'il existe un signal systémique, les plantes transgéniques exprimant MiSSP7 devraient être plus sensibles à des agents pathogènes nécrotrophes.

V.2. D'autres MiSSPs = d'autres effecteurs symbiotique ?

En parallèle de l'étude menée sur MiSSP7, nous avons initié la caractérisation fonctionnelle de plusieurs effecteurs candidats de *L. bicolor* dont MiSSP8 et MiSSP17, deux protéines dont les transcrits sont fortement induits lors de la symbiose entre *L. bicolor* et *P. trichocarpa* (Martin *et al.*, 2008).

V.2.1. MiSSP7, MiSSP8 et MiSSP17 sont secrétées par les voies classiques de sécrétion et sont essentielles à l'établissement de la symbiose

Au cours de ma thèse, nous avons montré que le peptide signal de MiSSP7, MiSSP8 et MiSSP17 est fonctionnel dans la levure (sécrétion classique *via* l'adressage au réticulum endoplasmique) mais pas celui de MiSSP22 (Chapitre IV, Figure 4). Néanmoins, la croissance sur le milieu contrôle (milieu complet) des souches transformées avec les constructions MiSSP7 et MiSSP8 est inférieure à celle du contrôle positif, l'inoculum de départ étant identique (Chapitre IV, Figure 4). Une telle inhibition de croissance n'est pas sans rappeler celle qui est observée pour des levures exprimant des effecteurs cytoplasmiques provenant de bactéries phytopathogènes (Slagowski *et al.*, 2008 ; Kramer *et al.*, 2007 ; Munkvold *et al.*, 2008 ; Salomon et Sessa, 2010). La souche transformée avec la construction MiSSP17 présente une croissance sur milieu sélectif inférieure à celle des souches transformées avec les constructions MiSSP7 et MiSSP8 (Chapitre IV, Figure 4). Cette différence de croissance pourrait s'expliquer par la taille de MiSSP17 (181 aa) et par la présence de nombreuses cystéines au sein de sa séquence protéique pouvant aboutir à la sécrétion d'une invertase moins fonctionnelle.

Les lignées mutantes obtenues par ARN interférence pour *MiSSP8*, *MiSSP17* et *MiSSP22* nous ont permis de montrer qu'une réduction importante des transcrits codant MiSSP8 et MiSSP17 entraîne une diminution importante du pouvoir de mycorhization tandis que celle des transcrits MiSSP22 n'a pas d'effet (Chapitre IV, Figure 3). Nous avons ici une belle corrélation entre sécrétion des effecteurs et rôle essentiel dans le développement symbiotique.

V.2.2. Rôle(s) putatif(s) de MiSSP8

Les expériences de localisation subcellulaire de MiSSP8 (peptide synthétique couplé à la 5, 6-carboxyfluorescein (FAM) et sur-expression transitoire en feuilles de tabac ont permis de conclure que MiSSP8 est un effecteur localisé à la paroi et à la membrane plasmique (Chapitre IV, Figure 5), suggérant un rôle de MiSSP8 dans l'établissement de l'interface de biotrophie.

A l'issue d'un crible en système double hybride, deux protéines interagissant avec MiSSP8 ont été mises en évidence : (i) une protéine de peuplier POPTR_0019s14190 faisant partie de la famille des USP (Universal Stress Protein) et (ii) la protéine Lb252734 de *L. bicolor*, similaire à une protéine de capsid CAP64 de *Cryptococcus neoformans* (Chapitre IV, Figure 6). Cette protéine est essentielle à la virulence de *C. neoformans* (Chang *et al.*, 1996) et les mutants *cap* présentent des compositions en polysaccharides de leur capsule différentes de celle d'une souche sauvage suggérant un rôle important de ces protéines soit dans l'export de certains polysaccharides, soit dans la structuration des polysaccharides de la capsule. Des expériences récentes ont montré que MiSSP8 est capable de se fixer à des composés pariétaux (cellulose, chitine et chitosane). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que MiSSP8 forme avec Lb252734 un complexe et constitue autour du champignon une sorte de « capsule » destinée à protéger le champignon des agressions éventuelles du peuplier au cours de la formation du réseau de Hartig. Cette hypothèse se rapprocherait des effecteurs AVR4 de *C. fulvum* et Mgl LysM de *Mycosphaerella* qui se lient à la chitine des parois cellulaires fongiques pour la protéger des chitinases de la plante hôte.

De plus, l'analyse de la séquence protéique de MiSSP8 met en évidence un motif répété 4 fois DWRRD, conservé chez différentes souches de *L. bicolor*. De façon intéressante, l'orthologue de MiSSP8 chez *L. amethystina* possède deux répétitions supplémentaires de ce motif. Ces résultats suggèrent qu'à l'instar de certains effecteurs Avh de *Phytophthora* (Jiang *et al.*, 2008), AvrBs3 et AvrBs3-like de *Xanthomonas campestris* et *Ralstonia solanacearum* (Szurek *et al.*, 2001; Heuer *et al.*, 2007) ou encore de SP7 de *G. intraradices* (Kloppholz *et al.*, 2011), MiSSP8 possède un motif répété dont le nombre de répétitions varie au cours de l'évolution et qui pourrait être essentiel à sa fonction. Le rôle de ces motifs dans la fixation de MiSSP8 avec des composés pariétaux (cellulose, chitine et chitosane) est actuellement testé (Thèse Clément Pellegrin).

V.2.3. Rôle(s) putatif(s) de MiSSP17

La protéine fusion de MiSSP17 native avec la GFP co-localise avec un marqueur du réticulum endoplasmique. Cette localisation peut refléter la sécrétion de MiSSP17 par la plante ou son entrée dans la cellule végétale après sa sécrétion. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de sécrétion ou d'endocytose pourrait nous permettre de le vérifier (Chapitre IV, Figure 5).

Concernant MiSSP17, ce crible a permis l'identification de POPTR_0008s03810 codant une phénylalanine ammonium lyase (Chapitre IV, Figure 6). PAL2 est une enzyme impliquée dans les voies de biosynthèse des composés phénoliques dont le rôle dans la résistance des plantes aux maladies a été étudié (Chen *et al.*, 2000; Cools et Ishii 2002). Elle est à l'origine de la synthèse de phytoalexines, composés antimicrobiens, (Li et Ouyang 1990; Mansfield 2000; Soyly *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005; Chandrashekar et Satyanarayana 2006) mais est également impliquée dans la synthèse d'acide salicylique. Chez *A. thaliana*, l'AS peut être synthétisé au moyen de deux voies enzymatiques distinctes à partir de chorismate (Garcion et Métraux, 2006; Wildermuth, 2006). Ainsi, le chorismate peut être transformé en AS *via* l'isochorismate grâce à un processus en deux étapes impliquant l'Isochorismate Synthase (ICS) et l'Isochorismate Pyruvate Lyase (IPL). Mais, dérivé de la L-phénylalanine, il peut être transformé en AS *via* des intermédiaires benzoate ou de l'acide coumarique par une série de réactions enzymatiques catalysées initialement par la Phénylalanine Ammonium Lyase (PAL). La voie métabolique ICS contribue à 95% de la production d'AS chez *A. thaliana* (Chen *et al.*, 2009). Toutefois, le quadruple mutant d'*A. thaliana pal1 pal2 pal3 pal4* accumule des niveaux substantiellement plus faibles en AS par rapport à la plante sauvage et est plus sensible à une souche virulente de la bactérie pathogène *P. syringae* (Huang *et al.*, 2010). Plusieurs autres études ont suggéré qu'une forte activité de l'enzyme PAL est importante pour la synthèse d'AS induite par les agents pathogènes chez les plantes. Des plants de tabac mutants RNAi pal inoculés par le virus TMV présentent un niveau d'AS libre quatre fois inférieur à celui des plantes témoins (Elkind *et al.*, 1990; Pallas *et al.*, 1996) et la réponse systémique acquise (SAR) n'est pas déclenchée. De plus, l'ajout d'inhibiteur de la PAL, l'acide 2-aminoindane-2-phosphonique (AIP), réduit l'accumulation de SA induite par l'infection par des agents pathogènes et leurs éliciteurs chez la pomme de terre, le concombre et *A. thaliana* (Meuwly *et al.*, 1995; Coquoz *et al.*, 1998; Mauch-Mani et Slusarenko, 1996). Chez *A. thaliana*, le traitement avec l'AIP rend les plantes totalement sensibles à *Hyaloperonospora parasitica* et l'ajout d'AS restaure la résistance. Cela suggère que la production de précurseurs d'AS par la PAL joue un rôle majeur dans la résistance au mildiou chez *A. thaliana* (Mauch-Mani et Slusarenko, 1996). Ainsi, ces résultats indiquent que la PAL joue un rôle important dans la synthèse d'AS, même si la voie enzymatique de l'ICS reste la voie majeure de synthèse.

Nous pouvons émettre l'hypothèse que MiSSP17 pourrait inhiber l'activité de PtPAL2 directement ou indirectement en maintenant sa localisation dans les vésicules du réticulum endoplasmique. Un tel effet serait d'autant plus intéressant que nous avons précédemment démontré que MiSSP7 réprime les réactions de défense de la plante en bloquant la voie de signalisation induite par l'AJ, ce qui conduit à la surexpression de gènes impliqués dans la voie de signalisation de l'AS qui est antagoniste de l'AJ. Ainsi *L. bicolor* contrôlerait plusieurs voies de signalisation hormonales afin de favoriser le développement symbiotique.

L'analyse de la séquence protéique de MiSSP17 met en évidence un domaine CFEM conservé et unique au règne fongique. Ce domaine est caractérisé par la présence de huit cystéines espacées de manière précise (Kulkarni *et al.*, 2003). Bien que l'espacement des résidus cystéines soit similaire à celui des 8 cystéines trouvées chez les hydrophobines, la caractérisation de la protéine avec domaine CFEM Pth11 de *Magnaporthe oryzae* a démontré que hydrophobines et PTH11 n'ont pas les mêmes caractéristiques biochimiques et donc probablement pas les mêmes fonctions (Deng et Dean, 2008). PTH11 est essentielle à la pathogénie de *M. oryzae* sur le riz (Xue *et al.*, 2002). L'expression des gènes codant les protéines CFEM au cours de l'infection par *B. graminis* (Grell *et al.*, 2003), *M. grisea* (Xue *et al.*, 2002), ou *Melampsora spp.* (Joly *et al.*, 2010) a conduit à proposer un rôle général de ces protéines CFEM dans la pathogénie, mais sans preuve fonctionnelle directe. Chez le champignon *Candida albicans*, les protéines à domaine CFEM sont nécessaires pour former un biofilm (Lamarre *et al.*, 2000; Garcera *et al.*, 2003) et certaines sont requises pour l'acquisition du fer à partir de protéines de l'hôte (Ding *et al.*, 2011; Sorgo *et al.*, 2013). Dans le cas de MiSSP17, un nouveau rôle non encore décrit pour des protéines de type CFEM a été proposé.

V.2.4. Evolution des effecteurs de symbiose

En accord avec la théorie d'une « course aux armements » entre les acteurs du système immunitaire du côté de la plante et les effecteurs du côté de l'agent pathogène, les séquences nucléotidiques codant ces effecteurs présentent, dans de nombreux cas, des signatures d'évolution diversifiante ou accélérée (Dodds *et al.*, 2006; Guttman *et al.*, 2006; Win *et al.*, 2007; Brunner *et al.*, 2009). Cette pression de sélection positive (aussi appelée sélection diversifiante) a été mise en évidence chez de nombreux effecteurs d'agents pathogènes (Pedersen *et al.*, 2012; Hacquard *et al.*, 2012; Wicker *et al.*, 2013).

Au contraire, nous ne savons rien des pressions de sélection s'opérant sur les gènes codant des effecteurs de symbiose. L'analyse des séquences des gènes codant MiSSP7, MiSSP8 et MiSSP17 chez plusieurs souches de *L. bicolor* ainsi que chez son proche parent *L. amethystina* a révélé que ces MiSSPs subissent, à l'inverse des effecteurs pathogènes, une pression de sélection négative (encore appelée sélection purificatrice; Chapitre IV, Figure 7). Cela peut s'expliquer par le fait que les deux partenaires ont intérêt à maintenir ce type d'interaction. D'une part, parce que le champignon aide la plante à s'épanouir dans un environnement qui lui est plutôt défavorable. D'autre part, parce que les champignons symbiotiques sont généralement plus démunis que leurs rivaux dans le sol pour dégrader la matière organique d'origine végétale. Ainsi, de la même manière qu'une course aux armements permanente entre plante et pathogène favorise une sélection diversifiante chez les effecteurs pathogènes, l'équilibre et le mutualisme qui caractérisent la symbiose favoriseraient une sélection purificatrice chez les effecteurs symbiotiques. Néanmoins, ces résultats devront être confirmés en analysant un plus grand nombre de souches. De plus, ce type d'approche devra être conduit sur d'autres effecteurs de symbiose dès lors que ceux-ci seront identifiés. Les programmes extensifs de séquençage des génomes de champignons mutualistes et saprotrophes devraient permettre d'affiner ce type d'analyse.

V.3. Le simple hybride a permis la découverte d'une nouvelle classe de protéines sécrétées chez *L. bicolor* possédant une fonction d'activateur transcriptionnel

L'utilisation du simple hybride nous a permis de mettre en évidence une nouvelle classe de protéines sécrétées (entre 250 et 400 acides aminés) capable d'activer la transcription, les TASP (Chapitre III, Tableau 3, Tableau 5). Les protéines TASP pourraient constituer un nouveau type d'effecteur sécrété par *L. bicolor* afin de contrôler sa plante hôte au cours du développement de l'ECM. Certaines bactéries phytopathogènes telles que *Xanthomonas* sécrètent des effecteurs de type TAL (Transcription Activateur-Like) *via* un système de sécrétion de type III lors de l'infection de la plante (Szurek *et al.*, 2001; Heuer *et al.*, 2007). Ces protéines peuvent se lier à des séquences promotrices de leurs plantes hôtes et activer l'expression de gènes afin de promouvoir le développement des bactéries. Toutefois, les TASP ne présentent pas du tout la même structure que les TAL effecteurs. En effet, ces derniers se composent d'un motif NLS d'adressage au noyau, d'un domaine d'activation de la transcription et d'un domaine central constitué de répétitions de 34 acides aminés capables de se fixer à une séquence d'ADN (Szurek *et al.*, 2001).

Les TASPes possèdent vraisemblablement un domaine d'activation de la transcription puisqu'elles sont capables de l'activer et un ou plusieurs motifs NLS potentiels. Néanmoins aucun domaine de liaison à l'ADN connu n'a pu être identifié. Cela suggère la présence d'un domaine non encore identifié ou qu'une autre protéine est nécessaire pour activer la transcription de gènes cibles. L'analyse de leur expression au cours du développement symbiotique a montré qu'elles sont très fortement exprimées tout au long du processus de la mycorhization. Cela diffère considérablement de ce que nous savons des effecteurs (Ellis *et al.*, 2009). Peut-être agissent-elles sur les autres microorganismes qui entourent le champignon et non sur la plante ?

Conclusions et perspectives

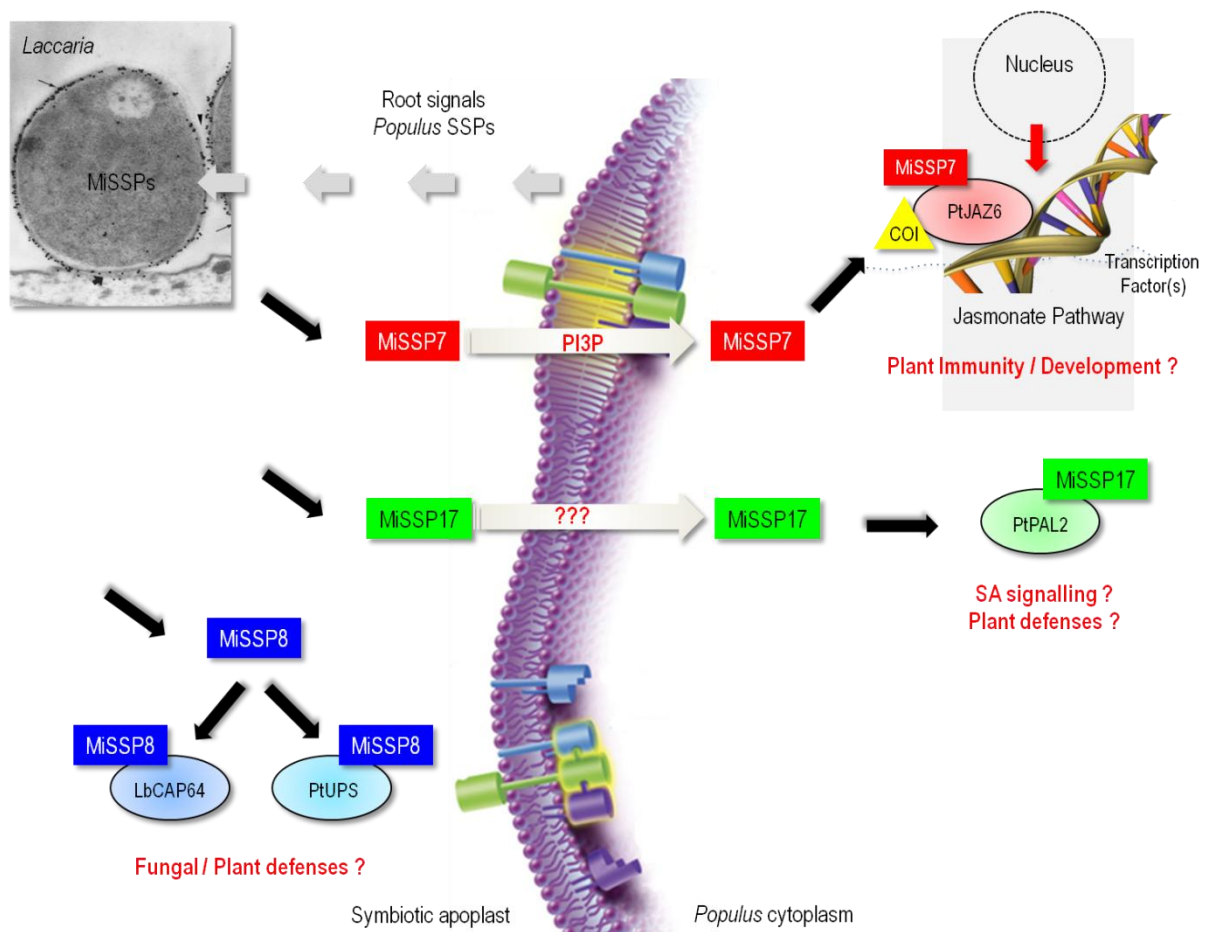


Figure 1 : Schéma récapitulatif des principales connaissances acquises sur MiSSP7, MiSSP8 et MiSSP17 avant et pendant ma thèse.

Dans le chapitre I, nous avons montré que MiSSP7 favorise la colonisation des tissus végétaux. Dans les premiers stades du développement symbiotique, MiSSP7 est sécrété par le champignon puis transporté dans la plante où il se localise dans le noyau et se lie aux récepteurs JAZs, PtJAZ6 et PtJAZ5. La liaison de MiSSP7 à PtJAZ6 bloquerait sa dégradation de telle sorte que la transcription médiée par la protéine MYC est bloquée, de même que la voie de signalisation dépendante de l'AJ en aval de PtJAZ6 (Figure V.5). Il en résulterait une induction de la voie de signalisation dépendante de l'AS et la colonisation des racines de la plante par le champignon *L. bicolor*. Ainsi, MiSSP7 régule le développement symbiotique en bloquant la voie de signalisation dépendante de l'AJ. Ces résultats sont une preuve que les organismes pathogènes et mutualistes ont sélectionné des effecteurs qui ciblent et contrôlent des voies de signalisation similaires chez la plante hôte afin de coloniser les tissus végétaux et d'accéder aux nutriments qui y sont stockés.

Les perspectives à court terme sont :

- D'étudier la capacité de PtJAZ6 et PtJAZ5 à interagir avec les autres récepteurs JAZs exprimés dans la racine au cours du développement symbiotique. En effet, chez *A. thaliana*, AtJAZ5 et AtJAZ6 sont connus pour interagir avec d'autres protéines JAZs dont les orthologues PtJAZ1, PtJAZ2, PtJAZ8, PtJAZ10 et PtJAZ12 sont exprimés dans l'ECM (Pauwels et Goossens, 2011).
- De vérifier si PtJAZ5 et PtJAZ6 sont capables d'interagir avec d'autres facteurs de transcription tels que ceux listés par Pauwels et Goossens (2011).

Les perspectives à long terme sont :

- De démontrer si MiSSP7 est en compétition avec JA-Ile ou empêche la fixation de PtCOI1 à PtJAZ6. Nos résultats suggèrent, en effet, que MiSSP7 bloque la voie de signalisation dépendante de l'AJ en stabilisant le complexe de régulation formé par PtJAZ6 et d'autres protéines nucléaires, même si nous n'en avons pas la preuve directe.
- D'identifier les gènes cibles du facteur de transcription PtMYC afin de mieux comprendre comment ils interviennent dans l'inhibition du développement symbiotique. Pour ce faire, nous pourrions analyser et comparer des données transcriptomiques obtenues dans différentes conditions, à partir de racines mycorhizées / non mycorhizées, en présence et en absence de précurseurs ou d'inhibiteurs de la voie de signalisation dépendante de l'AJ.

Nous pourrions également utiliser ce qui est connu des facteurs de transcription MYC dans la littérature, notamment chez la plante modèle *A. thaliana*. Enfin, nous pourrions envisager de faire des expériences de Chromatine Immunoprécipitation (Ch-IP) sur de l'ADN génomique de peuplier.

- De définir dans quelle mesure l'interaction de MiSSP7 avec PtJAZ5 et PtJAZ6 modifie la voie de signalisation dépendante de l'AJ et plus largement les voies de signalisation dépendantes de l'ET et de l'AS. Il existe de multiples connections entre les différentes voies de signalisation hormonales qui font que l'activation ou l'inhibition de l'une d'elle a des répercussions sur les deux autres (Pleterse *et al.*, 2009). La surexpression ou la répression de PtJAZ5, PtJAZ6 ainsi que des autres récepteurs JAZ combinée à des tests de mycorhization *in vitro* et des analyses transcriptomiques pourront nous permettre de savoir dans quelle mesure la voie de signalisation dépendante de l'AJ contrôle le développement symbiotique. De même, l'utilisation de mutants de peuplier pour des protéines impliquées dans les voies de signalisation hormonales dépendantes de l'ET et de l'AS pourront nous permettre de savoir dans quelle mesure ces voies de signalisation favorisent ou inhibent la colonisation des racines par *L. bicolor*. La transformation du peuplier et l'obtention de lignées stables étant un processus long, il sera par exemple possible de travailler avec des racines de peuplier transformées avec *A. rhizogenes* 15834 (Chabaud *et al.*, 2006; Plett *et al.*, en préparation).

Dans le chapitre II, nous avons montré que MiSSP8 et MiSSP17 sont sécrétées par *L. bicolor* via un adressage au réticulum endoplasmique et qu'elles sont essentielles au développement symbiotique. Des hypothèses sur le(s) rôle(s) putatif(s) de ces deux protéines ont été émises. MiSSP8 pourrait être impliquée dans la protection du champignon contre les défenses de la plante alors que MiSSP17 pourrait être impliquée dans le contournement des réponses de défense (Figure V.5).

Les perspectives à court terme sont :

- D'étudier le polymorphisme des MiSSPs au cours de l'évolution chez un nombre plus important de souches de *L. bicolor*, des champignons saprotrophes et autres champignons mycorhiziens.
- De confirmer rapidement les interactants identifiés pour MiSSP8 et MiSSP17 en Y2H par d'autres méthodes comme la Co-IP *in planta*, le pull down, le FRET ou le BiFC.

Les perspectives à long terme sont :

- De déterminer avec quelle affinité MiSSP8 se fixe sur les composés pariétaux du champignon et/ou de la plante.
- D'obtenir des peupliers transgéniques surexprimant MiSSP8 et MiSSP17 (avec et sans peptide signal) afin d'approfondir nos connaissances sur leur fonction biologique.
- Enfin, déterminer l'impact de l'expression de MiSSP8 et MiSSP17 (avec et sans peptide signal) dans le tissu végétal sur la résistance de la plante à des agents pathogènes est donc nécessaire. Certaines des cibles potentielles de MiSSP8 et MiSSP17 suggèrent un rôle dans le contournement des réactions de défense de la plante. Nous pourrions, par exemple, mesurer la virulence d'agents pathogènes biotrophes (*Ustilago Maydis*) ou hémibiotrophes (*Magnaporthe oryzae*) sur ces plants (Bolton *et al.*, 2009) et analyser l'expression des gènes de défense chez des peupliers surexprimant MiSSP8 et MiSSP17.

Dans le chapitre III, nous avons réalisé un inventaire exhaustif des facteurs de transcription régulés de manière significative dans l'ECM et les FBs de *L. bicolor*. Il s'agit de la première étape d'un projet plus vaste visant à caractériser les TFs essentiels au développement des ECMs et / ou des FBs afin de mieux comprendre les reprogrammations génétiques qui se produisent au cours de la formation des mycorhizes et des fructifications. En outre, le système simple hybride en levure nous a permis d'identifier chez *L. bicolor* un nouveau type de protéines sécrétées possédant une activité transcriptionnelle, les TASP. A l'instar des MiSSPs, ces protéines pourraient être des effecteurs symbiotiques capables de contrôler l'immunité ou le métabolisme de l'hôte et de promouvoir la symbiose. Les perspectives sont là encore multiples et les techniques développées au sein du laboratoire pour l'analyse des MiSSPs pourront être utilisées pour étudier leur localisation et leurs cibles potentielles.

Fiches techniques

Le clonage Gateway

PRINCIPE

Le système « Gateway », commercialisé par Invitrogen, permet l'insertion rapide et fiable d'une séquence d'intérêt dans un vecteur d'entrée (BP recombinaison) puis dans un vecteur de destination (LR recombinaison) par recombinaisons spécifiques de sites. Dès lors que l'on possède un vecteur d'entrée, l'insert est transférable à toute une gamme de vecteurs de destination dont le choix va dépendre de ce que l'on souhaite étudier (**Figure1**). Chaque vecteur possède entre ses sites *att* une cassette *ccdB* codant une petite protéine toxique pour *Escherichia coli*. Ainsi, seuls les vecteurs recombinés sont sélectionnés sur milieu sélectif (sélection positive).



Figure 1 : Représentation schématique du système Gateway, des vecteurs d'entrée et de destination et des techniques d'analyse fonctionnelle pour lesquelles ces vecteurs sont utilisés.

LES VECTEURS GATEWAY

Les vecteurs Gateway sont propagés et amplifiés à l'aide de la souche *E. coli* DB3.1 résistante à la toxine CcdB. Selon les besoins, deux vecteurs d'entrée ont été utilisés : pDONR207 et pDONR222

Les vecteurs Gateway dont nous disposons au laboratoire ainsi que les techniques d'analyse fonctionnelle qui y sont associées sont détaillés dans le **tableau 1** ci-dessous :

Tableau 1 : Liste des vecteurs Gateway et des constructions utilisés.

Nom du vecteur	Milieu sélectif LB+Antibiotique ($\mu\text{g/ml}$)	Technique d'analyse fonctionnelle
pDONR222 (Vecteur d'entrée)	LB+Kan50	-
pDONR207 (Vecteur d'entrée)	LB+Gent10	-
pDEST TM 22 (Vecteur de destination)	LB+Amp100	Double hybride en levure
pDEST TM 32 (Vecteur de destination)	LB+Gent10	Double hybride et mono hybride en levure
pNGFP (Vecteur de destination)	LB+Chl15	Test DivIVA
pCGFP (Vecteur de destination)	LB+Chl15	Test DivIVA
pNDIV (Vecteur de destination)	LB+Amp100	Test DivIVA
pCDIV (Vecteur de destination)	LB+Amp100	Test DivIVA
pSUC-GW (Vecteur de destination)	LB+Amp100	Test de sécrétion en levure
pSDK3 (Vecteur de destination)	LB+Amp100	Production de protéine
pSDK4 (Vecteur de destination, <i>GFP</i>)	LB+Amp100	Production de protéine
pSDK5 (Vecteur de destination, <i>mCherry</i>)	LB+Amp100	Production de protéine
pSDK6 (Vecteur de destination, <i>CFP</i>)	LB+Amp100	Production de protéine
pSDK7 (Vecteur de destination, <i>YFP</i>)	LB+Amp100	Production de protéine
pSDK8 (Vecteur de destination, <i>GST</i>)	LB+Amp100	Production de protéine
pMDC43 (Vecteur de destination, <i>GFP</i>)	LB+Kan50	Expression transitoire de fusion GFP en tabac
pMDC83 (Vecteur de destination, <i>GFP</i>)	LB+Kan50	Expression transitoire de fusion GFP en tabac

LES AMORCES GATEWAY

Pour cloner un gène d'intérêt en système Gateway, les amorces doivent contenir 18-20 nucléotides spécifiques du gène et les sites de recombinaison spécifique *attB1* et *attB2* (**Tableau 2**). Dans le cas des vecteurs de la série pSDK, une base est supprimée afin de maintenir le bon cadre de lecture entre le gène d'intérêt et une « étiquette ».

Tableau 2 : Exemples d'amorces Gateway.

Type d'amorce	Sequence 5'→3'
Amorce sens	GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCG ADNc
Amorce antisens	GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC ADNc
Amorce sens (pSDK)	GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCG ADNc
Amorce antisens (pSDK)	GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT ADNc

PROTOCOLE

Les réactions de BP/LR recombinaisons

La composition des réactions de BP et de LR recombinaison est décrite dans le **tableau 3**.

Tableau 3 : Composition des réactions de BP et LR recombinaison.

Composition du mix	BP réaction	LR réaction
attB-ADNc amplifié	40ng	-
pDONOR	75ng	40ng
pDESTINATION	-	75ng
Tampon TE, pH 8.0	Jusqu'à 4µl	Jusqu'à 4µl
BP/LR Clonase™ II enzyme mix	1µl	1µl

Les réactions sont incubées 3 h à 25°C.

Arrêt des réactions de BP/LR recombinaison

En fin de recombinaison, les réactions sont arrêtées par ajout de 0.5µl de protéinase K et incubation 10 minutes à 37°C.

Le test de sécrétion en levure (Adapté de Jacobs *et al.*, 1997)

PRINCIPE

Le vecteur Gateway pSUC-GW est utilisé. Le test de sécrétion en levure est basé sur l'expression d'une invertase dépourvue de son peptide signal, et donc incapable de soutenir la croissance de la souche de levures YTK12 mutant nul pour l'invertase *SUC2* (Δ *suc2*) sur un milieu contenant du saccharose comme unique source de carbone (**Figure 1b**) (milieu YPS+Antimycine). Si la protéine d'intérêt, fusionnée en N-terminal de l'invertase dépourvue de son peptide signal, contient un peptide de sécrétion fonctionnel, alors la sécrétion de l'invertase et la capacité de la levure à pousser sur un milieu contenant du saccharose vont être restaurées (**Figure 1c**). Ce test permet de valider expérimentalement la sécrétion de protéines contenant un signal-peptide prédit par des algorithmes tels que PSORT, SignalP ou TargetP.

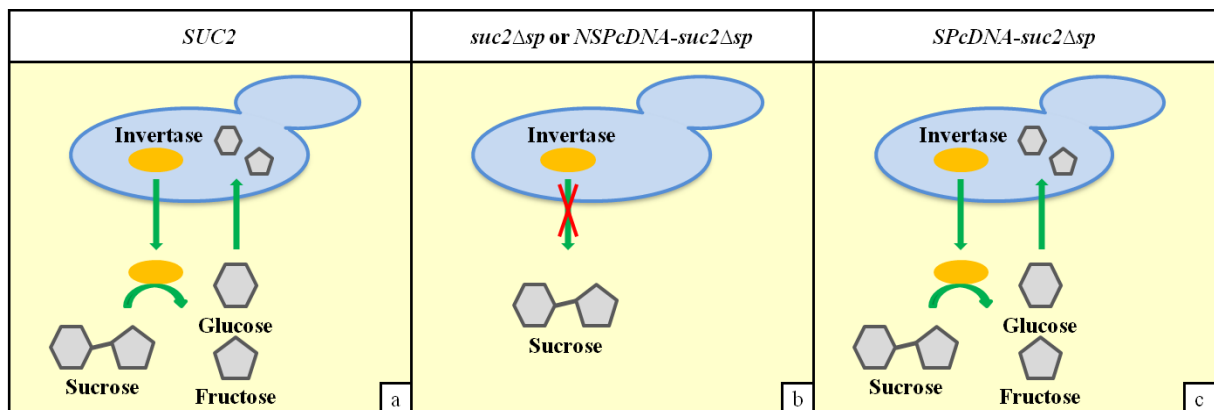


Figure 1: Représentation schématique du test de sécrétion en levure. Chaque colonne représente le résultat de la transformation de la souche YTK12 (Δ *suc2*) avec le gène sauvage de l'invertase *SUC2* (a), le gène muté *suc2* Δ *sp* dépourvu de son peptide signal, fusionné ou non en 5' avec un ADNc codant une protéine qui n'est pas sécrétée (*NSPcDNA*) (b), le gène muté *suc2* Δ *sp* dépourvu de son peptide signal, fusionné en 5' avec un ADNc codant une protéine sécrétée (*SPcDNA*) (c). Les levures pour lesquelles l'invertase n'est pas sécrétée sont incapables d'hydrolyser le sucrose du milieu en fructose et glucose, empêchant leur croissance. La fusion avec une protéine sécrétée ou un peptide signal restaure la sécrétion de l'invertase, l'hydrolyse du saccharose et la croissance des levures.

VECTEURS

Tableau 1 : Liste des vecteurs Gateway et des constructions utilisés.

Nom du vecteur	Souche de levure	Milieu sélectif	Souche de bactérie	Milieu sélectif LB+Antibiotique (μ g/ml)
pDONR207 (Vecteur d'entrée)	-	-	BD3.1	LB+Gen10
pSUC-GW (Vecteur de destination)	YTK12	SD-W	BD3.1	LB+Amp100
Pep-pSUC (Control +)	YTK12	SD-W	DH5 α	LB+Amp100
ADNc-pSUC (Construction à tester)	YTK12	SD-W	DH5 α	LB+Amp100

MATERIEL BIOLOGIQUE

La souche *Saccharomyces cerevisiae* utilisée est YTK12 (*MATa*, *suc2* Δ 9, *trp1* Δ , *ade2-101*, *ura3-52*). Elle est maintenue sur milieu YAPD solide et cultivée à 30°C. La souche YTK2 transformée avec le vecteur contrôle Pep-pSUC et les constructions ADNc-pSUC à tester est cultivée sur milieu SD-W.

PROTOCOLE

- Après transformation des levures YTK12 avec le vecteur d'intérêt, prélever un transformant et inoculer 5ml de milieu SD-W. Incuber sur la nuit à 30°C, à 200 rpm.
- Le jour suivant, mesurer la DO_{600nm} de chaque culture saturante et l'ajuster à 2 dans un volume final de 1 ml de milieu SD-W.
- Diluer de 10 en 10 jusqu'à une dilution 10 000x. Pour chaque clone et chaque dilution, déposer 2 μ l sur milieu YPS+60 ng/ml Antimycine A (milieu test) et sur milieu SC-W (milieu contrôle). Incuber 5-7 jours à 30°C.

MILIEUX ET SOLUTIONS

Tableau 2: Composition des milieux YAPD et YPS+60 ng/ml Antimycine A

Compounds	YAPD (milieu complet)	YPS (milieu de selection)
Adenine hemisulfate	40mg.l ⁻¹	-
Peptone	20 g l ⁻¹	20 g l ⁻¹
Extrait de levures	10 g l ⁻¹	10 g l ⁻¹
Bacto agar	20 g l ⁻¹	20 g l ⁻¹
Le pH est ajusté à 6.5 avant stérilisation à 120°C pour 20 minutes		
Glucose 20 g l ⁻¹ (Stérilisé par filtration)	2 g l ⁻¹	-
Sucrose 20 g l ⁻¹ (Stérilisé par filtration)	-	2 g l ⁻¹
Antimycine A	-	60 μ g l ⁻¹

Tableau 3: Composition du milieu SD-W solide et liquide.

Compounds	SD-W
Adenine hemisulfate	40mg l ⁻¹
L-Uracile	40mg l ⁻¹
L-Histidine hydrochloride	40mg l ⁻¹
L-Leucine	40mg l ⁻¹
SC 5X (Stérilisé à l'autoclave)	200ml
Bacto agar	+/-20g l ⁻¹
Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes	
Glucose 20 g l ⁻¹ (Stérilisé par filtration)	2 g l ⁻¹

Tableau 4: Composition de la solution SD5X.

Compounds	SD5X
Drop out mix	3.5 g l ⁻¹
Yeast Nitrogen Base without amino acids (Sigma)	33.5 g l ⁻¹

Le pH est ajusté à 5.6 avant stérilisation à 120°C pendant 20 minutes

Tableau 5: Composition du Drop out mix.

Composés	Drop out mix
Adenine Hemisulfate	2g
L-Arginine	2g
L-Isoleucine	2g
L-Lysine	2g
L-Methionine	2g
L-Phenylalanine	3g
L-Serine	2g
L-Threonine	2g
L-Tyrosine	2g
L-Valine	9g

Expression transitoire de fusions GFP par agro-infiltration sur des feuilles de tabac (*Nicotiana Benthamiana*) (Adapté de Curtis et Grossniklaus, 2003)

PRINCIPE

Afin de localiser *in planta* les effecteurs de *Laccaria bicolor* et de générer des plants transgéniques de peuplier exprimant ces mêmes protéines, nous avons utilisé les vecteurs binaires développés par Curtis et Grossniklaus (2003). Les cartes des vecteurs (dérivés du vecteur de clonage pCambia ADN-T et compatibles avec la technologie GATEWAY), sont accessibles sur le lien suivant :

http://botserv1.uzh.ch/home/grossnik/curtisvector/index_2.html.

Plus précisément, nous avons utilisé les vecteurs pMDC43 et pMDC83 permettant l'expression de protéines de fusion avec la protéine à fluorescente verte (GFP) d'*Aequorea victoria* (soit à l'extrémité N-terminale, soit à l'extrémité C-terminale de notre protéine d'intérêt). La localisation subcellulaire de nos protéines d'intérêt a été effectuée sur feuilles de *Nicotiana benthamiana* transitoirement transformées via *Agrobacterium tumefaciens* (Figure 1).

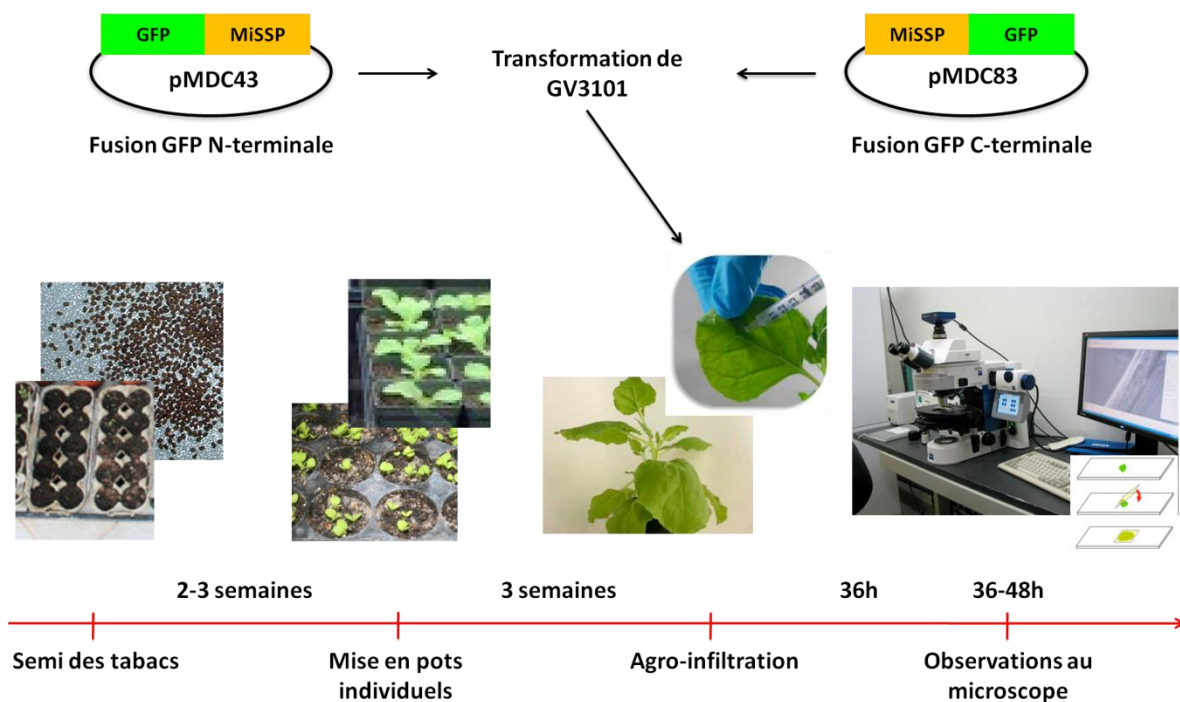


Figure 1 : Principales étapes du test d'expression transitoire en tabac.

VECTEURS

Tableau 1 : Liste des vecteurs Gateway et des constructions utilisés. (Nelson *et al.*, Plant Journal (2007) 51, 1126-1136).

Nom du vecteur	Souche d'agrobactérie	Milieu sélectif LB+Antibiotique (µg/ml)	Souche de bactérie	Milieu sélectif LB+Antibiotique (µg/ml)
pDONR207 (Vecteur d'entrée)	-	-	BD3.1	Gent10
pMDC43 (Vecteur de destination)	GV3101	LB+Rif100 +Gen10+Kan50	BD3.1	Kan50
pMDC83 (Vecteur de destination)	GV3101	LB+Rif100 +Gen10+Kan50	BD3.1	Kan50
pMDC43-ADNc (Construction à tester)	GV3101	LB+Rif100 +Gen10+Kan50	DH5α	Kan50
pMDC83-ADNc (+/- Peptide signal, Construction à tester)	GV3101	LB+Rif100 +Gen10+Kan50	DH5α	Kan50
ER-rk CD3-959* (Marqueur du réticulum endoplasmique, <i>mCherry</i>)	GV3101	LB+Rif100 +Gen10+Kan50	DH5α	Kan50
G-rk CD3-967* (Marqueur du Golgi, <i>mCherry</i>)	GV3101	LB+Rif100 +Gen10+Kan50	DH5α	Kan50
vac-rk CD3-975* (Marqueur de la vacuole, <i>mCherry</i>)	GV3101	LB+Rif100 +Gen10+Kan50	DH5α	Kan50
Pm-rk CD3-1007* (Marqueur de la membrane plasmique, <i>mCherry</i>)	GV3101	LB+Rif100 +Gen10+Kan50	DH5α	Kan50

MATERIEL BIOLOGIQUE

Agrobacterium tumefaciens :

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisée est GV3101, souche dérivée de C58 curée de son plasmide Ti d'origine, complétée de pMP90 (Hellens *et al.*, 2000; Koncz *et al.*, 2006). Elle est maintenue sur milieu YEB (**Tableau 1**) solide supplémenté avec de la Rifampicine 100 µg.ml⁻¹ et de la Gentamycine 10 µg.ml⁻¹ et cultivée à 28°C. Les souches GV3101 transformées avec les constructions GFP PMDC43/MiSSPs et PMDC83/+SP-MiSSPs, les vecteurs contrôles et les marqueurs des différents organelles sont cultivés sur le LB+ Rifampicine + Gentamycine + Kanamycine (50 µg.ml⁻¹).

Nicotiana benthamiana

Le tabac *Nicotiana benthamiana* est conservé au laboratoire sous forme de graines, à 4°C et à l'obscurité.

PROTOCOLE :

Culture des tabacs

- Semer les graines de tabac sur du terreau (5-6 graines par pot). Incuber 2-3 semaines dans une chambre phytotronique à 20°C avec une photopériode de 16h et une humidité relative de 80 %.
- Quand les plantes ont trois feuilles, les transférer dans des pots individuels. Incuber trois semaines supplémentaires jusqu'à ce que les plants de tabac aient 3-4 feuilles bien développées. Ils sont prêts pour une agroinfiltration.

NB: Les tabacs sont quotidiennement arrosés. Quand des inflorescences apparaissent, elles sont immédiatement retirées afin de maximiser le développement foliaire. En effet, dès que les plants de tabac ont fleuri, ils ne sont plus utilisables pour l'agro-infiltration.

Agro-infiltration des feuilles de tabac

- Le jour avant l'infiltration, inoculer 5 ml de milieu YEB supplémenté avec de la Rifampicine 100 µg.ml⁻¹, de la Gentamycine 10 µg.ml⁻¹ et de la Kanamycine 50 µg.ml⁻¹ avec les agrobactéries transformées. Incuber sur la nuit à 28°C, à 150 rpm.
- Le matin suivant, centrifuger les cultures à 8000 g, à température ambiante pendant 5 minutes. Eliminer le surnageant et resuspendre les culots dans 10 ml de solution d'infiltration (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, pH5.6, 200 µM Acétosyringone).

- Ajuster la DO_{600nm} à 0.5 et incuber pendant 2 h à 28°C et à l'obscurité, à 80 rpm afin d'armer les agrobactéries.
- Infiltrer les solutions bactériennes sur le dessous des feuilles de tabac à l'aide d'une seringue de 1 ml sans aiguille. Faire trois répétitions biologiques.
- Incuber pendant 36-48 h les tabacs agroinfiltrés dans une mini-serre (afin d'éviter toute contamination par les bactéries transformées), dans une chambre phytotronique à 20°C avec une photopériode de 16 h et une humidité relative de 80 %.

NB1 : L'agro-infiltration est une étape critique qui nécessite que les stomates des feuilles soient bien ouverts. Les plants doivent donc être sous illumination au moins 1 heure avant l'expérimentation. Il faut également laisser quelques minutes aux tabacs pour s'acclimater sur la paillasse, lorsqu'ils sont sortis des phytotrons.

NB2 : Le taux de transformation est accru si les plants de tabac sont laissés à la lumière quelques heures après transformation.

Observation au microscope apotome ou confocal

- Après 36-48 h d'incubation, découper de petits fragments de feuilles infiltrés en évitant les grandes nervures de la feuille.
- A l'aide d'une seringue sans aiguille de 10 ml et d'eau milliQ, mettre les échantillons sous vide afin de faciliter la pénétration de l'eau dans les tissus et d'améliorer l'analyse microscopique.
- Monter les lames avec de l'eau ou du glycérol à 20 %, la face inférieure de la feuille vers soi et analyser les échantillons au microscope.

NB1 : En fonction du fluorochrome utilisé, la GFP pour les protéines fusions étudiées ou la mCherry pour les marqueurs de la membrane plasmique et de différents organelles, plusieurs filtres d'excitation peuvent être utilisés pour l'analyse microscopique.

NB2 : La plasmolyse des cellules épidermiques peut-être obtenue en plaçant les morceaux de feuille dans 2 à 4 % NaCl pendant 15 minutes. Les morceaux de feuille sont ensuite montés entre lame et lamelle dans le même milieu.

NB3 : L'eau pour l'infiltration peut-être remplacée par de la perfluorodécane afin d'augmenter la résolution notamment pour les cellules du mésophylle.

MILIEUX ET SOLUTIONS

Tableau 2 : Composition du milieu YEB solide et liquide.

Compounds	YEB
Extrait de Boeuf	5 g l ⁻¹
Extrait de levure	1 g l ⁻¹
Peptone	5 g l ⁻¹
Sucrose	5 g l ⁻¹
MgCl ₂	0.5 g l ⁻¹
Bacto agar	+/-15 g l ⁻¹

Tests de mycorhization *in vitro* avec le peuplier 717 1B4

PRINCIPE

Le test de mycorhization *in vitro* avec le peuplier *Populus tremula* x *Populus alba* (génotype 717-1B4) est un moyen rapide et efficace d'étudier le pouvoir de mycorhization de souches de champignons ectomycorhiziens mutants et sauvages dans différentes conditions selon la problématique étudiée. Il permet également d'étudier le comportement du peuplier en réponse au champignon. Les principales étapes du protocole de mycorhization *in vitro* sont décrites dans la **figure 1**. Protocole adapté de Richter *et al.*, 2009.

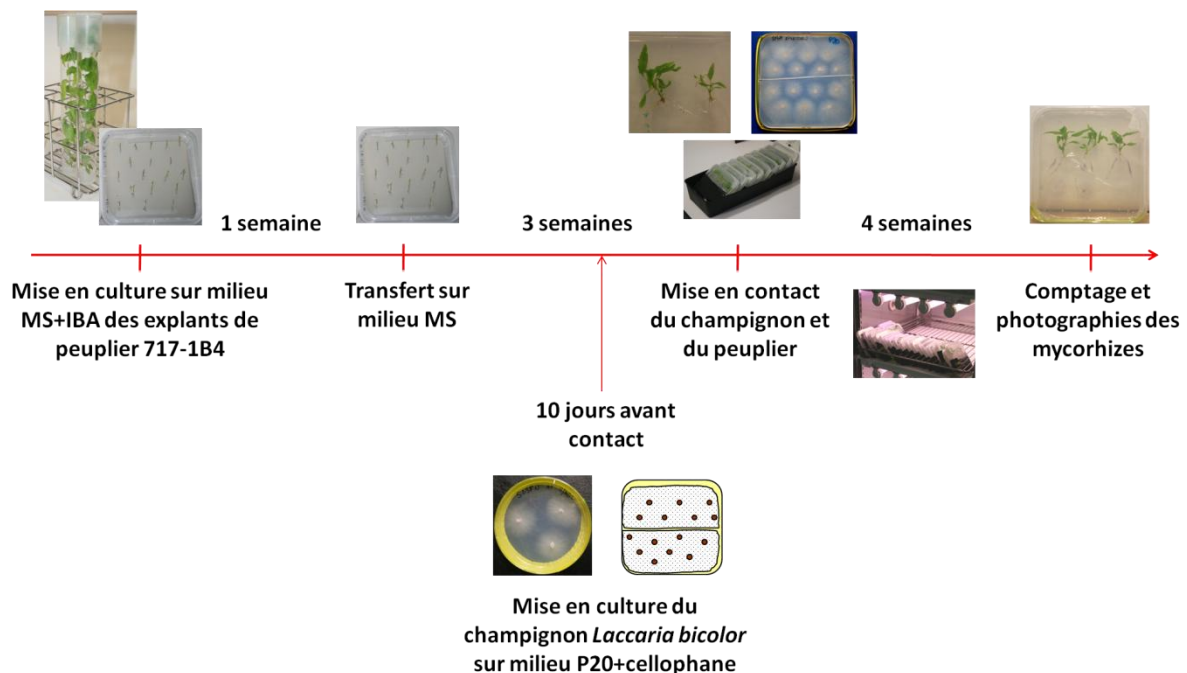


Figure 1 : Schéma représentant les principales étapes du protocole de mycorhization *in vitro*.

MATERIEL BIOLOGIQUE

Champignons :

Les souches de *Laccaria bicolor* utilisées sont la souche dicaryotique sauvage S238N (Maire) Orton (Di Battista *et al.*, 1996), les mutants ev7 et ev9 (S238N transformée avec le vecteur vide pHg/pSILBA γ (Kemppainen and Pardo, 2010), et les mutants d'ARN interférent MiSSP8, MiSSP13, MiSSP17 et MiSSP22. Tous les mutants utilisés nous ont été fournis par Minna J. Kemppainen and Alejandro G. Pardo du Laboratoire de Mycologie Moléculaire, Département de Science et Technologie, Université Nationale de Quilmes et Conseil National d'Investigations Scientifiques et Techniques (CONICET). Roque Sáenz Peña 352, (B1876BXD) Bernal, Province de Buenos Aires, Argentina. S238N est propagé sur milieu Pachlewski modifié P5 (Pachlewski and Pachlewskia, 1974; Deveau *et al.*, 2007) et cultivé à 22-24°C, dans le noir (**Figure2**). Les mutants sont propagés sur milieu Pachlewski modifié P5 supplémenté avec de l'Hygromycine 150 μ g/ml et cultivé à 25 °C, dans le noir.



Figure 2 : Photo d'une culture du champignon *L. bicolor* sur milieu P5 après 15 jours d'incubation à 22-24°C à l'obscurité.

Peuplier

Le peuplier utilisé pour les expérimentations *in vitro* est un hybride *Populus tremula x Populus alba* (Clone INRA 717-1-B4). Il est propagé *in vitro* sur milieu MS (Murashige and Skoog, 1962) dans de longs tubes de culture en verre et cultivé dans une chambre phytotronique à 24°C avec une photopériode de 16 h (**Figure 3**).

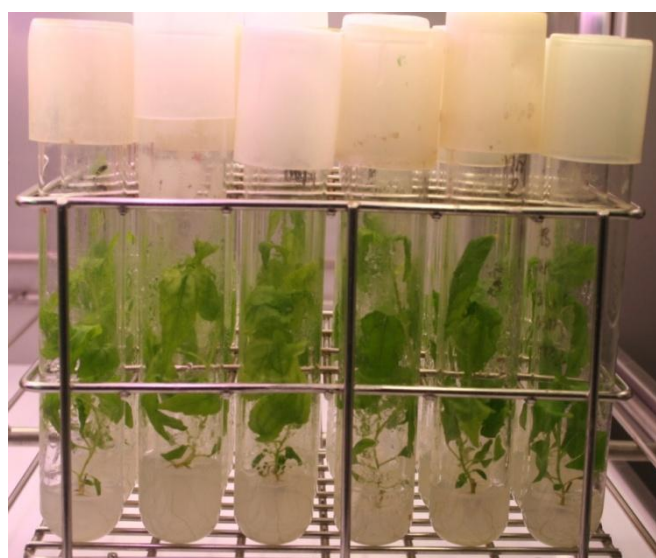


Figure 3 : Photo d'une culture de peuplier *Populus tremula x P. alba* clone 717-1-B4 sur milieu MS après 6 semaines d'incubation en chambre phytotronique

PROTOCOLE

Préparation de membranes de cellophane

- Découper les membranes de cellophane sur les bords et par le milieu en deux moitiés de taille similaires (10*5 cm environ).
- Faire bouillir les membranes pendant 20 minutes dans de l'eau milliQ contenant 1 g.l⁻¹ d'EDTA. Cette étape a pour but de perméabiliser les membranes et les débarrasser des impuretés.
- Rincer quatre fois les membranes à l'eau milliQ et les autoclaver deux fois dans un récipient contenant un fond d'eau afin d'éviter qu'elles ne dessèchent.

Préparation des explants de peuplier

- Travailler avec des peupliers d'environ 10 cm de hauteur sous une haute à flux laminaire.

- Sortir le peuplier du tube de culture à l'aide de pinces stériles et retirer toutes les feuilles de la tige principale.
- Couper la tige au niveau des entre-nœuds afin d'obtenir des explants de 1 à 2 cm.
- Piquer les explants sur milieu MS+IBA solide avec un angle de 45° (Environ 25 boutures de peuplier par boîtes, **Figure 4**).
- Fermer les boîtes avec du parafilm et les incuber pendant 7 jours dans une chambre de culture à 24°C avec une photopériode de 16 h. Les boîtes sont inclinées selon un angle de 45°
- Après 7 jours d'incubation, transférer les explants sur milieu MS (Environ 10 boutures par boîte avec un angle de 45°C).
- Mettre les boîtes à incuber dans une chambre de culture pendant 3 semaines jusqu'à ce que des racines de 2 à 3 cm apparaissent. Les conditions de cultures sont les mêmes que précédemment.



Figure 4 : Photo d'une culture d'explants de peuplier sur milieu MS+IBA.

Préparation des cultures de champignon sur cellophane

- Préparer les cultures de champignon sur cellophane 10 jours avant que les boutures de peuplier ne soient prêtes.
- Placer deux demi-cellophanes par boîte de milieu P20
- Placer sur chaque demi-cellophane 7 petits inocula de champignon
- Fermer hermétiquement les boîtes et les incuber en position horizontale dans une chambre de culture à 22-24°C, à l'obscurité. Après 10 jours d'incubation, la boîte doit être recouverte de mycélium (**Figure 5**).

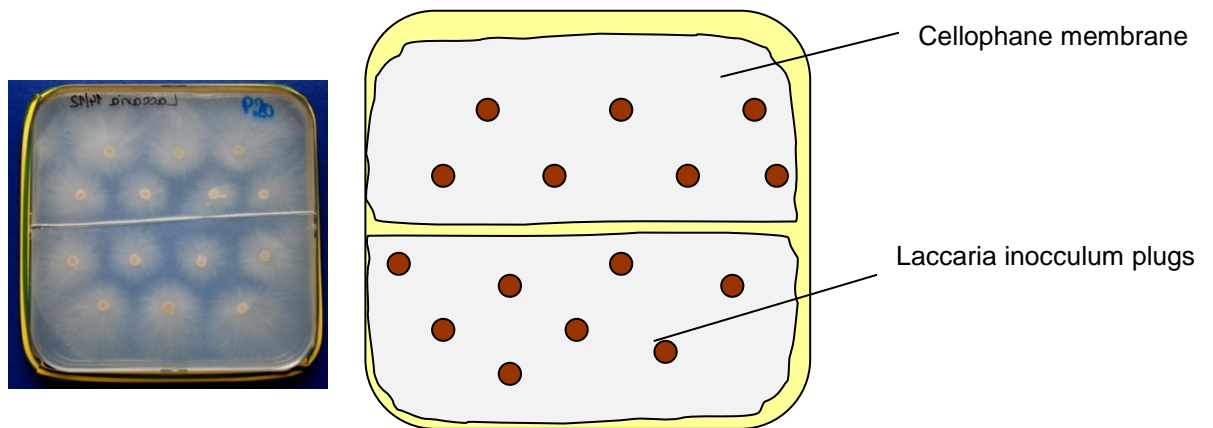


Figure 5 : Photo d'une culture du champignon *L. bicolor* sur milieu P20+cellophane après 10 jours d'incubation à 22-24°C à l'obscurité.

Mise en contact du champignon et du peuplier

- Placer une demi-cellophane par boîte de milieu P20+MES
- Transférer doucement 3 boutures de peuplier sur les membranes en évitant de transférer de l'agar avec les racines.
- Avant de procéder au contact avec le champignon, retirer les morceaux d'agar des inocula fongiques à l'aide d'un scalpel
- Transférer la membrane recouverte de mycélium sur les racines de peuplier, coté mycélium contre les racines.
- Fermer les boîtes avec en haut du parafilm, sur les côtés du sparadrap et en bas du scotch d'isolation électrique. Recouvrir la partie inférieure des boîtes avec un petit sac opaque afin de protéger les racines et le champignon de la lumière.
- Incuber les boîtes pendant 4 semaines dans une chambre de culture à 20°C avec une photopériode de 16 h. Les boîtes sont inclinées avec un angle de 45°.

NB: Du MES est ajouté dans le milieu P20 utilisé pour les contacts car *L. bicolor* sécrète des acides organiques qui acidifient le milieu. L'ajout du MES permet de stabiliser le pH et d'éviter d'induire des réactions de stress chez la plante.

Un réseau de Hartig peut être observé après 1 à 2 semaines de contact.

MILIEUX ET SOLUTIONS

- Pour le champignon

Tableau 1: Composition des milieux solides P5, P20 et P20+MES.

Composés	P5	P20	P20+MES
Di-NH ₄ -tartrate	0.5 g l ⁻¹	0.5 g l ⁻¹	0.5 g l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1 g l ⁻¹	1 g l ⁻¹	1 g l ⁻¹
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.5 g l ⁻¹	0.5 g l ⁻¹	0.5 g l ⁻¹
Maltose	5g l ⁻¹	-	-
Glucose D+	20 g l ⁻¹	1 g l ⁻¹	1 g l ⁻¹
MES disodium salt	-	-	1 g l ⁻¹
Solution Kanieltra 1000x	1 ml l ⁻¹	1 ml l ⁻¹	1 ml l ⁻¹
Solution Thiamine 100 mg/l	1 ml l ⁻¹	1 ml l ⁻¹	1 ml l ⁻¹
Agar	20 g l ⁻¹	20 g l ⁻¹	20 g l ⁻¹
pH	5.5	5.5	5.8
Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes			
Hygromycine 100 g l ⁻¹	+/- 1.5 ml l ⁻¹	-	-

- Pour le peuplier

Tableau 2: Composition du milieu solide MS.

Composés	MS
Macroéléments (Sigma REF)	50 ml l ⁻¹
Microéléments (Sigma REF)	100 ml l ⁻¹
Glucose	1 g l ⁻¹
MES	1 g l ⁻¹
Agar	10 g l ⁻¹
Le pH est ajusté à 5.8 avant stérilisation à 120°C pendant 20 minutes	
Vitamines 100x	10 ml l ⁻¹
Vitamines Gamborgs 1000x	1 ml l ⁻¹
IBA stock solution 1 mg ml ⁻¹	+/- 2 mL l ⁻¹

NB : Préparation de la solution d'IBA : 50 mg d'IBA sont dissous dans quelques gouttes d'éthanol 100% avant d'être amené à un volume final de 50 ml avec de l'eau milliQ (solution stock à 1 mg/mL). La solution stock est stérilisée par filtration et conservée à 4°C, à l'obscurité. Des cristaux peuvent se former à froid. C'est pourquoi, il est nécessaire de sortir la solution stock du frigo 15 minutes avant utilisation.

Tableau 3 : Composition de la solution de Vitamines 100X.

Composés	Vitamines 100X
L-Glutamine	20 g l ⁻¹
Ca-Panthoténate	0,1 g l ⁻¹
L-Cystéine chlorhydrate	0,1 g l ⁻¹
Biotine (Solution stock à 0.1 g l ⁻¹)	10 ml l ⁻¹
Préparées dans de l'eau ultrapure et stérilisées par filtration.	
Aliquotées par 10 ml et conservées à -20°C.	

Tableau 4 : Composition de la solution de vitamines Gamborgs 1000X.

Composés	Vitamines Gamborgs 1000X
Myo-inositol	100 g l ⁻¹
Acide Nicotinique	1 g l ⁻¹
Pyridoxine	1 g l ⁻¹
Thiamine	10 g l ⁻¹
Solution prête à l'emploi et conservée à 4°C.	

Tableau 5 : Composition des solutions de macro- et micro-éléments.

Composés	Macroéléments	Microéléments
Nitrate d'ammonium	1650 mg l ⁻¹	-
Acide borique	-	6,2 mg l ⁻¹
Chlorure de calcium anhydre	332.2 mg l ⁻¹	-
Chlorure de Cobalt * 6 H ₂ O	-	0.025 mg l ⁻¹
Sulfate Cuprique * 5 H ₂ O	-	0.025 mg l ⁻¹
Na ₂ -EDTA	-	37.3 mg l ⁻¹
Sulfate ferreux * 7 H ₂ O	-	27.8 mg l ⁻¹
Sulfate de magnésium	180.7 mg l ⁻¹	-
Sulfate de manganèse * H ₂ O	-	16.9 mg l ⁻¹
Acide molybdique (Sels de sodium) * 2 H ₂ O	-	0.25 mg l ⁻¹
Iodure de potassium	-	0.83 mg l ⁻¹
Nitrate de potassium	1900 mg l ⁻¹	-
Phosphate de potassium monobasique	170 mg l ⁻¹	-
Sulfate de zinc * 7 H ₂ O	-	8.6 mg l ⁻¹

Solution prête à l'emploi et conservée à 4°C.

NB : Les milieux P20, P20+MES, MS et MS+IBA sont coulés dans des boîtes carrées de 12*12cm.

Tests de mycorhization en serre avec *Laccaria bicolor* et la plante hôte *Populus trichocarpa* ou *Pseudotsuga menziesii* (Pin de Douglas)

PRINCIPE

A l'inverse du test de mycorhization *in vitro*, le test de mycorhization en serre se rapproche un peu plus des conditions naturelles d'où son intérêt. Cependant, sa mise en place et l'obtention de mycorhizes est plus long (Figure 1).



Figure 1 : Schéma représentant les principales étapes du protocole de mycorhization en serre.

MATERIEL BIOLOGIQUE

Champignon

Les souches de *Laccaria bicolor* utilisées sont la souche dicaryotique sauvage S238N (Maire) Orton (Di Battista *et al.*, 1996), les mutants ev7 et ev9 (S238N transformée avec le vecteur vide pHg/pSILBA γ (Kemppainen and Pardo, 2010), et les mutants d'ARN interférent MiSSP8, MiSSP13, MiSSP17 et MiSSP22. Tous les mutants utilisés nous ont été fournis par Minna J. Kemppainen and Alejandro G. Pardo du Laboratoire de Mycologie Moléculaire, Département de Science et Technologie, Université Nationale de Quilmes et Conseil National d'Investigations Scientifiques et Techniques (CONICET). Roque Sáenz Peña 352, (B1876BXD) Bernal, Province de Buenos Aires, Argentina. S238N est propagé sur milieu Pachlewski modifié P5 (Pachlewski and Pachlewskia, 1974; Deveau *et al.*, 2007) et cultivé à 22-24 °C, dans le noir. Les mutants sont propagés sur milieu Pachlewski modifié P5 (Tableau 1) supplémenté avec de l'Hygromycine 150 μ g/ml et cultivé à 25 °C, dans le noir.

Plante hôte

Le peuplier utilisé pour les expérimentations en serre est *Populus trichocarpa*. Il est disponible sous forme de boutures de 15 cm qui sont récoltées chaque année en février-mars et stockées dans le noir à -6°C.

Le pin utilisé pour les expérimentations en serre est *Pseudotsuga menziesii*. Il est disponible sous forme de graines achetées dans le commerce (ONF, Sècherie de la Joux, VG2-LA-LUZETTE-VG).

PROTOCOLE

Préparation des boutures de peuplier

- Sortir les boutures dormantes de peuplier de la chambre froide et les laisser se réchauffer lentement.
- Si nécessaire, redécouper les boutures de façon à ce qu'elles mesurent environ 15 cm.

NB : Il est possible de faire pré-enraciner pendant deux semaines les boutures dormantes dans une solution hydroponique (2.5 mM KNO₃, 0.8 mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄ 7H₂O, 2.3 mM Ca(NO₃)₂ 4H₂O, 23 μ M H₃BO₃, 4.6 μ M MnCl₂ 4H₂O, 0.4 μ M ZnSO₄ 7H₂O, 0.09 μ M H₈Mo₂NH₇, 0.18 μ M CuSO₄ 5H₂O, 20 μ M FeNaEDTA).

C'est très utile lorsque l'on souhaite faire une cinétique et que l'on a besoin que le champignon soit en contact avec les racines dès le temps zéro.

Préparation des graines de pin Douglas

Trois à six semaines avant de procéder au contact, vernaliser les graines en les plaçant à 4°C, à l'obscurité, dans un environnement humide (enveloppées dans de l'essuie-tout ou un tissu humide).

NB : Au-delà de six semaines, il y a un risque de voir se développer des moisissures ou des champignons.

Une alternative si la vernalisation n'a pas été faite, est d'incuber les graines dans de l'eau pendant 24 h à 37-40°C mais le pourcentage de germination est souvent moins important.

Préparation des inocula fongiques et mise en contact avec la plante hôte

- Trois mois avant de procéder au contact avec le champignon ectomycorhizien, préparer les inocula fongiques.
- Préparer un mélange de tourbe tamisée/ vermiculite (environ ¼ de tourbe tamisée et ¾ de vermiculite). Aliquoter le mélange par 1 L dans des bocaux en verre munis de bouchons ventilés (Le couvercle du bocal est percé d'un trou bouché avec du coton). Stériliser les bocaux pendant 20 minutes à 120°C.
- Ajouter 650 mL de milieu P5 et stériliser à nouveau pendant 20 minutes à 120°C.
- Ensemencer les bocaux avec 4-5 inocula de champignon poussé sur milieu P5 solide. Idéalement, il faut essayer de mettre des inocula au fond, autour du bocal et sur le dessus. La taille des inocula dépend du champignon à propager mais dans le cas de *L. bicolor*, plus il est petit et mieux le champignon pousse.
- Mettre les bocaux à incuber pendant 3 mois dans le noir à 22-24°C. Au cours de la période d'incubation, il est recommandé d'homogénéiser le mélange, une à deux fois, afin de favoriser la croissance du champignon.

Mise en contact du champignon et du peuplier

- Bien mélanger 1 L d'inoculum avec 9 L de Terragreen bien humidifié. (Il s'agit d'une roche contenant de l'attapulgite commercialisée après broyage sous le nom de « Oil Dri » de Georgie (U.S. Special, 3-30 GB)). Le mélange doit être le plus homogène possible. Le pourcentage de champignon doit être compris entre 5-10% car une dose d'inoculum plus importante peut inhiber la formation des mycorhizes.
- Partager le mélange entre 10-12 pots de 1 L (pour le peuplier) ou remplir des plaques (pour le pin Douglas)
- Planter les boutures de peuplier dans les pots ou bien déposer 3-4 graines par godet pour le pin Douglas.
- Mettre les pots à incuber en Serre S2 pendant 3 mois selon les conditions suivantes : 21°C pendant la journée avec une photopériode de 16 h et 18°C pendant la nuit. L'arrosage dépend de l'intensité lumineuse à l'extérieur. Les contacts réalisés avec S238N peuvent également être incubés en serre froide, pendant la période estivale.
- Après un mois de croissance, fertiliser les plants de peuplier une fois par semaine avec 20 mL de solution nutritive (0.8 mM KNO₃, 0.8 mM Ca(NO₃)₂ 4H₂O, 0.3 mM NaH₂PO₄, 0.3 mM MgSO₄ 7H₂O, 20 µL de solution Kanieltra; conservée à 4°C, dans le noir).

NB 1: Un manque d'eau ou un excès d'eau inhibe la mycorhization.

NB 2 : La fertilisation n'est pas utile pour les Pin de Douglas.

NB 3 : Avec S238N, après 3 mois d'incubation, 40 à 60% de mycorhizes fonctionnelles sont attendus.

MILIEUX ET SOLUTIONS

Tableau 1 : Composition des milieux P5 solide et liquide.

Composés	P5
Di-NH ₄ -tartrate	0.5 g l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1 g l ⁻¹
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.5 g l ⁻¹
Maltose	5g l ⁻¹
Glucose D+	20 g l ⁻¹
Solution Kanieltra 1000x	1 ml l ⁻¹
Solution Thiamine 100 mg/l	1 ml l ⁻¹
Agar	+/-20 g l ⁻¹
pH	5.5
Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes	
Hygromycine 100 g l ⁻¹	+/- 1.5 ml l ⁻¹

Construction de banques d'ADNc en levure (Plett *et al.*, 2011)

VECTEURS

Tableau 1 : Liste des vecteurs Gateway utilisés.

Nom du vecteur	Technique d'analyse fonctionnelle	Milieu sélectif	Souche de bactérie	Milieu sélectif LB+Antibiotique (µg/ml)
pDONR222 (Vecteur d'entrée)	-	-	DB3.1/DH10T1 ^R	LB+Kan50
pDEST TM 22 (Vecteur de destination)	Double hybride en levure	SD-W	DB3.1/DH10T1 ^R	LB+Amp100
pDEST TM 32 (Vecteur de destination)	Double hybride et mono hybride en levure	SD-L	DB3.1/DH10T1 ^R	LB+Gent10

AMORCES

Tableau 2 : Liste des amorces Gateway utilisées.

Nom	Séquence (5'-3') ¹	Température d'hybridation	Forward / Reverse	Application
AttB1-Smart I	GGACAACCTTGTACAAAA AAGTTGGAGAGGGCGGG	Non applicable	F	Construction librairie d'ADNc
AttB2-Smart I FL	ACAACCTTGTACAAGAAA GTTGGGTACT(30)VN	Non applicable	R	Construction librairie d'ADNc (librairie pleine longueur)
AttB1-Smart II	TCGTCGGGGACAACCTTGT ACAAAAAGTTGG	Non applicable	F	Construction librairie d'ADNc
AttB2-Smart II	GGCGGCCGCACAACCTTG TACAAGAAAGTTGGGT	Non applicable	R	Construction librairie d'ADNc

MATERIEL BIOLOGIQUE

La souche *Escherichia coli* DB3.1 est utilisée pour propager les vecteurs Gateway vides.

La souche *E. coli* DH10T1^R (*F*- *mcrA* Δ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *endA1* *araD139* Δ (*ara*, *leu*)7697 *galU* *galK* λ - *rpsL* *nupG* *tonA*) est utilisée pour propager les banques d'entrée et de destination. Les bactéries électro-compétentes sont achetées chez Invitrogen et conservées à -80°C.

Les 2 souches sexuellement compatibles de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées sont MaV103 (*MATa*, *leu2-3,112*, *trp1-901*, *his3* Δ 200, *ade2-101*, *gal4* Δ , *gal80* Δ , *SPAL10::URA3*, *GAL1::lacZ*, *HIS3*_{UAS} *GAL1::HIS3@LYS2*, *can1*^R, *cyh2*^R) et MaV203 (*MATa*, *leu2-3,112*, *trp1-901*, *his3* Δ 200, *ade2-101*, *gal4* Δ , *gal80* Δ , *SPAL10::URA3*, *GAL1::lacZ*, *HIS3*_{UAS} *GAL1::HIS3@LYS2*, *can1*^R, *cyh2*^R) Elles sont maintenues sur milieu YAPD solide et cultivées à 30°C.

PROTOCOLE

Construction de banques d'ADNc (Figure 1)

Les banques d'ADNc sont construites à l'aide d'un protocole qui combine les technologies des kits SMART™ PCR cDNA synthesis (Clontech), Clone Miner cDNA Library Construction (Invitrogen) et ProQuest™ Two Hybrid System (Invitrogen). Ce protocole est schématisé en figure 1. Il s'agit ici de reprendre les principales étapes suivies, d'insister sur les points importants et de notifier les modifications apportées.

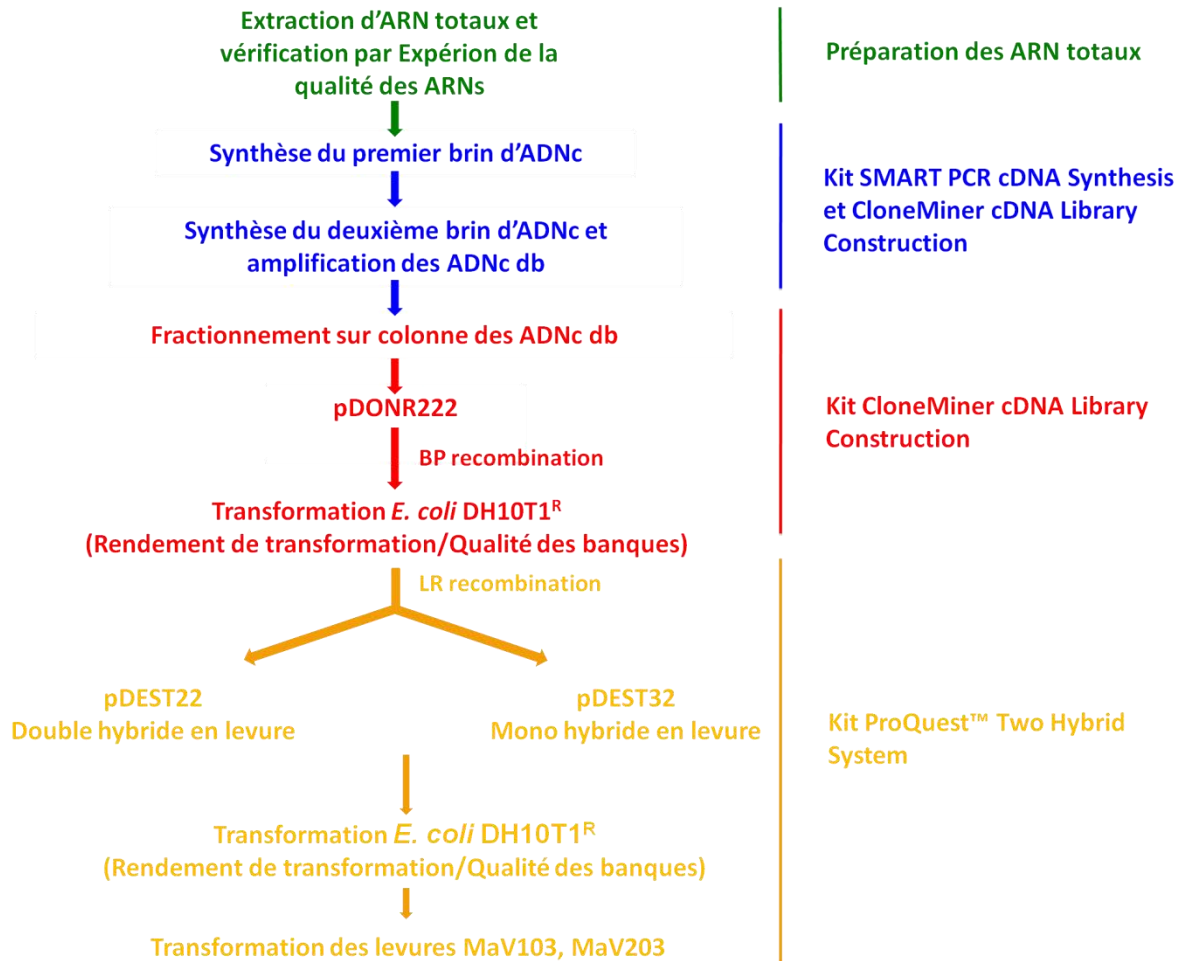


Figure 1 : Schéma représentant la démarche expérimentale suivie lors de la construction des banques d'ADNc en levure.

- 200-500 ng d'ARNs totaux sont utilisés comme matrice pour amplifier les ARNm.

NB : Il est impératif de vérifier la qualité des ARNs totaux extraits par Expériorion afin de vérifier qu'ils ne soient pas dégradés.

- La synthèse du premier brin est réalisée comme décrit dans le kit Clone Miner cDNA Library Construction (Invitrogen, voir les instructions du manuel) à l'aide d'amorces modifiées, compatibles avec le système Gateway et inspirées du kit SMART™ PCR cDNA synthesis (Clontech). Lors de la synthèse du premier brin d'ADNc, l'amorce Biotin-attB2-Oligo(dT) (30 pmol/μL) est remplacée par l'amorce AttB2-Smart I FL (30 pmol/μL) au cours de la réaction d'amorçage et l'eau DEPC est remplacée par l'amorce AttB1-Smart I (30 pmol/μL) au cours de la réaction de synthèse (**Tableau 2**).
- La synthèse du deuxième brin et l'amplification des ADNc doubles brins (ADNc db) obtenus sont réalisées comme décrit dans le kit SMART™ PCR cDNA synthesis (Clontech, voir les instructions du manuel). Les amorces AttB1-Smart II et AttB2-Smart II remplacent les amorces PCR Primer II A et T7 Extension Primer (**Tableau 2**).

NB : L'amplification finale des ADNc db est contrôlée sur gel afin de choisir un nombre de cycles PCR qui permette de s'approcher de la phase de saturation tout en restant dans la phase exponentielle d'amplification. Cela permet une amplification optimale des ADNc db et évite une modification de la population initiale en ADNc db.

- La purification des produits PCR (ADNc db) par fractionnement sur colonne et la BP recombinaison dans le vecteur d'entrée Gateway pDONR222 sont réalisées comme décrit dans le kit CloneMiner™ cDNA Library Construction (Invitrogen). Une réaction classique de BP recombinaison se compose de 250 ng de pDONR222 et de 75-100 ng d'ADNc purifiés dans un volume final de 10 µL.
- Afin d'amplifier la banque d'entrée, la réaction de BP recombinaison est utilisée pour transformer des bactéries électro-compétentes *E. coli* DH10T1^R (Invitrogen). 5.10⁵ à 1.10⁶ UFC (Unités Formant Colonie) sont utilisées pour ensemercer 200 mL de milieu LB+Kan50. Lorsque la DO₆₀₀=1 (environ 8-10 h), les cultures sont centrifugées et l'ADN constituant la banque d'entrée extrait à l'aide du kit S.N.A.P.™ Midiprep (Invitrogen). L'ADN extrait est conservé à -20°C.

NB : Après transformation des bactéries *E. coli* DH10T1^R par la banque d'entrée, la qualité de la banque et sa représentativité sont vérifiées en testant 50-100 colonies pour la taille de l'ADNc contenue par PCR.

- Une LR recombinaison est ensuite réalisée afin de transférer la banque d'entrée dans les vecteurs de destination pDEST™32 et pDEST™22 (Gateway® LR clonase® II Enzyme mix, ProQuest™ Two Hybrid System Manual, Invitrogen), permettant respectivement des analyses de type mono- ou double-hybride en levure. Une réaction classique de LR recombinaison se compose de 250 ng de banque d'entrée, 250 ng de vecteur de destination et 2 µL de LR clonase II, dans un volume final de 10 µL.
- Afin d'amplifier les banques de destination, les produits de la réaction de LR recombinaison sont utilisés pour transformer des bactéries électro-compétentes *E. coli* DH10T1^R (Invitrogen). 5.10⁵ à 1.10⁶ UFC (Unités Formant Colonie) sont utilisées pour ensemercer 200 mL de milieu LB+Gent10 ou Amp100 selon qu'il s'agit de la banque en pDEST™32 ou pDEST™22. Lorsque la DO₆₀₀ atteint 1 (environ 8-10 h), les cultures sont centrifugées et l'ADN extrait à l'aide du kit S.N.A.P.™ Midiprep (Invitrogen), constituant ainsi les banques de destination. L'ADN extrait est conservé à -20°C.

NB : Après transformation des bactéries *E. coli* DH10T1^R par les banques de destination, la qualité des banques et leur représentativité sont vérifiées en testant 50-100 colonies pour la taille des ADNc clonés par PCR.

Transformation des levures par les banques (Adapté de Gietz and Schiestl, 2002)

- Inoculer avec une pointe d'embout (2 à 3 mm³) la souche de levure à transformer (MaV103 pour les banques d'ADNc clonés dans pDEST™32 ou MaV203 pour les banques d'ADNc clonés dans pDEST™22) dans 10 mL de milieu YPAD 2X et incuber à 30°C sous agitation (200 rpm) sur la nuit.

NB : La souche de levure doit être fraîchement repiquée.

- Le lendemain, déterminer la DO₆₀₀ au spectrophotomètre (8.10⁶ cellules/mL correspondent à une DO de 1 à 600 nm)
- Transférer dans 50 mL de milieu YPAD 2X (volume nécessaire à 10 transformations) le volume nécessaire de culture pour obtenir une DO₆₀₀=0,6. (Vol à prélever = (0,6x50)/DO₆₀₀).
- Incuber à 30°C, à 200 rpm jusqu'à obtenir un titre de 2.10⁷ cellules/ mL ce qui correspond à une DO₆₀₀ maximum de 2,4 (4 cycles, environ 4 h).
- Faire bouillir l'ADN de sperme de saumon (ss-DNA) pendant 5 min puis le placer dans la glace. Préparer le PEG 3350 50 % (sous agitation).
- Une fois que la culture a atteint une DO₆₀₀=2,4, centrifuger les cellules à 3000 rpm à 4°C pendant 5 min.
- Eliminer le surnageant et laver 3 fois les cellules avec 15 mL d'H₂O milliQ stérile.
- Resuspendre le culot dans 500 µL d'ADN de sperme de saumon (ss-ADN). Bien vortexer l'ADN de sperme de saumon avant ajout.
- Ajouter 2450 µL PEG 3350 50 % et mélanger
- Ajouter 360 µL LiAc 1.0 M et mélanger
- Ajouter 140 µL H₂O milliQ stérile jusqu'à obtenir un volume final de 3600 µL et mélanger.
- Aliquoter le mélange par 360 µL dans des tubes Eppendorf stériles de 1,5 mL (volume nécessaire pour une transformation) (**Tableau 3**).
- Ajouter 5 µL banque de destination+ H₂O milliQ stérile (200-1000 ng de banque) dans chaque tube et mélanger.
- Pré-incuber à 30°C pendant 60 min puis vortexer.
- Incuber à 42°C pendant 60 min. Mélanger toute les 15 min.
- Amener chaque tube à un volume de 1 mL avec de l'eau milliQ stérile et mélanger.
- Etaler 150 µL sur le milieu sélectif approprié et incuber à 30°C pendant 5-7 j (boîtes de 145 mm). Pour faciliter l'étalement, il est possible d'ajouter 1850 µL d'eau milliQ stérile aux 150 µL de transformation.

NB 1 : La concentration optimale en PEG 3350 aboutissant à une haute efficacité de transformation doit être déterminée expérimentalement et doit être définie pour toute nouvelle solution de PEG 3350 50 % préparée. Pour cela des transformations tests sont réalisées avec 215 µL, 230 µL, 245 µL, 260 µL, et 275 µL de PEG et l'efficacité de transformation est déterminée pour chacune d'entre elles.

NB 2 : Il est préférable de travailler avec des solutions PEG 3350 50 % et d'acétate de lithium 1 M fraîches.

NB 3 : En général, 10-15 transformations par banque sont réalisées pour obtenir 5.10^5 à 1.10^6 colonies et avoir une bonne représentabilité de la banque. Il est donc nécessaire de préparer 60-80 boîtes de milieu sélectif.

Tableau 3 : Volume de solutions nécessaire pour réaliser 1, 5 et 10 transformations de levures.

Composés	Quantité par réaction	Quantité pour 5 réactions	Quantité pour 10 réactions
ADN de sperme de saumon bouilli (ss-ADN) 2 mg/ml	50 µl	250 µl	500 µl
PEG 3350 50 %	260 µl	1300 µl	2600 µl
Acétate de lithium (LiAc) 1.0 M	36 µl	180 µl	360 µl
H ₂ O milliQ stérile	14 µl	70 µl	140 µl
Volume final	360 µl	1800 µl	3600 µl

- Après 3-4 jours d'incubation à 30°C, les levures sont récoltées à l'aide d'un râteau et d'eau milliQ stérile. Trois lavages avec 4 mL d'eau milliQ sont réalisés pour chaque boîte et les eaux de rinçage sont récupérées dans des Falcons 50 mL. Au cours de la récolte, ils sont stockés dans la glace en attendant la centrifugation.
- Centrifuger les levures à 3000 rpm à 4°C pendant 15 min puis éliminer le surnageant.
- Resuspendre les culots dans 15 mL d'eau milliQ stérile, regrouper les culots et centrifuger les cellules à 3000 rpm à 4°C pendant 15 min. Répéter l'opération autant de fois qu'elle est nécessaire pour finir avec un seul culot.
- Déterminer approximativement le volume du culot et ajouter un volume équivalent de solution glycérolée (65 % glycérol, 0.1 M MgSO₄, 25 mM Tris-HCl, pH8.0).
- Resuspendre les cellules, aliquoter par 100 µL et conserver les banques à -80°C.

MILIEUX ET SOLUTIONS

Tableau 4 : Composition du milieu LB solide et liquide

Compounds	LB
Bactotryptone	10 g l ⁻¹
Extrait de levure	5 g l ⁻¹
NaCl	10 g l ⁻¹
Agar	+/-20 g l ⁻¹
Le pH est ajusté à 7.5 avant stérilisation à 120°C pendant 20 minutes	

Tableau 5 : Composition des milieux YAPD solide et YAPD 2X liquide.

Composés	YAPD	YAPD 2X
Adénine hémisulfate	40mg.l ⁻¹	40mg.l ⁻¹
Peptone	20 g l ⁻¹	20 g l ⁻¹
Extrait de levure	10 g l ⁻¹	10 g l ⁻¹
Glucose	20 g l ⁻¹	20 g l ⁻¹
Sucrose	-	-
Bacto agar	20 g l ⁻¹	-

Le pH est ajusté à 3.5, 4.5 ou 5.6 avant stérilisation à 120°C pendant 20 minutes

Tableau 6 : Composition de la solution SD5X.

Composés	SD5X
Drop out mix	3.5 g l ⁻¹
Yeast Nitrogen Base without amino acids (Sigma)	33.5 g l ⁻¹

Le pH est ajusté à 5.6 avant stérilisation à 120°C pendant 20 minutes

Tableau 7: Composition du Drop out mix.

Composés	Drop out mix
Adénine Hémisulfate	2g
L-Arginine	2g
L-Isoleucine	2g
L-Lysine	2g
L-Méthionine	2g
L-Phénylalanine	3g
L-Sérine	2g
L-Thréonine	2g
L-Tyrosine	2g
L-Valine	9g

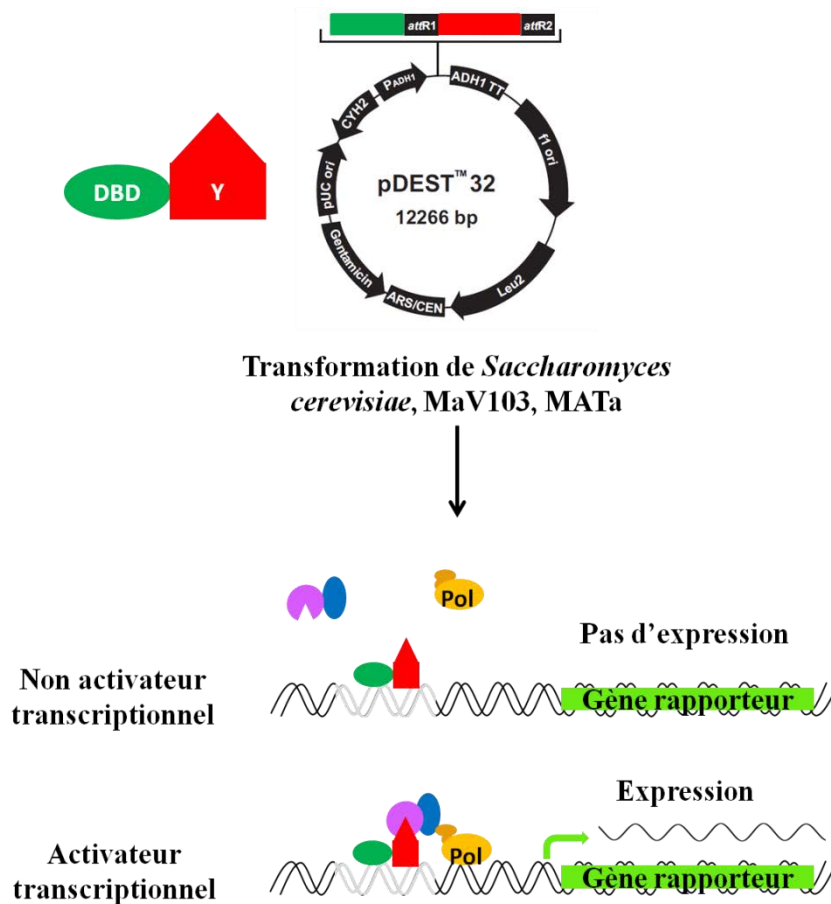
Tableau 8 : Composition des milieux SD solide et liquide.

Composés	SD-L	SD-W
Adénine hémisulfate	40mg l ⁻¹	40mg l ⁻¹
L-Uracile	40mg l ⁻¹	40mg l ⁻¹
L-Histidine hydrochloride	40mg l ⁻¹	40mg l ⁻¹
Bacto agar	+/-20g l ⁻¹	+/-20g l ⁻¹
Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes		
L-Leucine 4 mg ml ⁻¹ (stérilisée par filtration)	-	10ml
L-Tryptophan 4 mg ml ⁻¹ (stérilisée par filtration)	10ml	-
SC 5X	200ml	200ml
Glucose 20% (stérilisée par filtration)	100ml	100ml

Le système simple hybride en levure (Adapté de Titz *et al.*, 2006)

PRINCIPE

Il existe des techniques d'analyse fonctionnelle qui permettent de corroborer la prédiction *in silico* des facteurs de transcription. L'une de ces analyses tire parti des fonctions distinctes et indépendantes jouées par les domaines d'un facteur de transcription (domaines de liaison à l'ADN (DBD) et domaines d'activation de la transcription (AD)) et s'appuie sur une version modifiée du système double hybride en levure. Il s'agit du simple hybride en levure encore appelé «piège à activateur de la transcription», dans lequel les ADNc d'un organisme d'intérêt (ADNc de différents tissus ou stades du cycle de vie) sont fusionnés en aval d'un DBD (GAL4-DBD) (Ye *et al.*, 2004; Titz *et al.*, 2006). Lorsque la séquence testée code un activateur de la transcription, l'expression de trois gènes rapporteurs est activée. Un schéma résumant le principe du simple hybride en levure est présenté en **figure 1**.



DBD, DNA Binding Domain; AD, Activation domain; Pol, DNA polymerase.

Figure 1 : Principe du système simple hybride en levure.

VECTEURS

Tableau 1 : Liste des vecteurs Gateway et des constructions utilisés. M, Mycorrhiza ; R, Roots ; FLM/FB, Free Living Mycelium/Fruiting Bodies.

Nom du vecteur	Souche de levure	Milieu sélectif	Souche de bactérie	Milieu sélectif LB+Antibiotique (µg/ml)
pDONR222 (Vecteur d'entrée)	-	-	BD3.1	LB+Kan50
pDEST TM 32 (Vecteur de destination)	MaV103/MaV203	SD-L	BD3.1	LB+Gent10
pDEST TM 22-RalGDS-wt (Proie)	MaV103/MaV203	SD-W	DH5α	LB+Amp100
pDEST TM 22-RalGDS-m1 (Proie)	MaV103/MaV203	SD-W	DH5α	LB+Amp100
pDEST TM 22-RalGDS-m2 (Proie)	MaV103/MaV203	SD-W	DH5α	LB+Amp100
pDEST TM 32-Krev1 (Appât)	MaV103/MaV203	SD-L	DH5α	LB+Gent10
pDEST TM 32-BanqueM (Proie)	MaV103	SD-L	DH5α	LB+Amp100
pDEST TM 32-BanqueR (Proie)	MaV103	SD-L	DH5α	LB+Amp100
pDEST TM 32-BanqueFLM/C (Proie)	MaV103	SD-L	DH5α	LB+Amp100

MATERIEL BIOLOGIQUE

Les 2 souches sexuellement compatibles de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées sont MaV103 (*MATα*, *leu2-3,112*, *trp1-901*, *his3Δ200*, *ade2-101*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *SPAL10::URA3*, *GAL1::lacZ*, *HIS3_{UAS GAL1}::HIS3@LYS2*, *can1^R*, *cyh2^R*) et MaV203 (*MATα*, *leu2-3,112*, *trp1-901*, *his3Δ200*, *ade2-101*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *SPAL10::URA3*, *GAL1::lacZ*, *HIS3_{UAS GAL1}::HIS3@LYS2*, *can1^R*, *cyh2^R*). Elles sont maintenues sur milieu YAPD solide et cultivées à 30°C. Les souches transformées utilisées ainsi que leur milieu de culture sont détaillées dans le **tableau 2** ci-dessous.

Tableau 2: Liste des souches de levure transformées et de leur milieu de culture. M, Mycorrhiza ; R, Roots ; FLM/FB, Free Living Mycelium/Fruiting Bodies.

Nom de la souche transformée	Vecteur	Milieu de culture
wt (Contrôle forte interaction)	pDEST TM 22-RalGDS-wt pDEST TM 32-Krev1	SD-L-W
m1 (Contrôle faible interaction)	pDEST TM 22-RalGDS-m1 pDEST TM 32-Krev1	SD-L-W
m2 (Contrôle négatif)	pDEST TM 22-RalGDS-m2 pDEST TM 32-Krev1	SD-L-W
MaV203+32 (Contrôle négatif)	pDEST TM 32	SD-L
MaV103+32-BanqueM (Prey)	pDEST TM 32-BanqueM	SD-L
MaV103+32-BanqueR (Prey)	pDEST TM 32-BanqueR	SD-L
MaV103+32-BanqueFLM/C (Prey)	pDEST TM 32-BanqueFLM/C	SD-L

PROTOCOLE

Dans le système simple hybride utilisé, l'expression de 3 gènes rapporteurs *lacZ*, *His3* et *URA3* sera testée chez des levures haploïdes contenant une protéine de la banque.

Le test simple hybride

- Transformer la souche de levure MaV103 avec la banque d'ADNc clonée dans pDEST32 à tester et étaler l'équivalent d'environ 500 000 clones sur milieu sélectif SD-Leu- His + 25 mM 3AT agar medium.
- Incuber pendant 5-7 jours à 30°C.

- Collecter des colonies isolées dans des microplaques de 384 puits contenant 80 μL de milieu SD-L et incuber à 30°C sur la nuit.
- A l'aide d'un répliqueur, ensemercer pour chaque microplaque, une boîte de milieu SD-L-H+3-AT 25 mM et incuber pendant 5-7 jours à 30°C.
- Toujours à l'aide d'un répliqueur, repiquer les colonies capables de croître sur milieu SD-L-H+3-AT 25 mM (3 boîtes pour chaque boîtes de départ) jusqu'à ce qu'une croissance homogène soit obtenue. Incuber pendant 5-7 jours à 30°C.
- Procéder aux tests des trois gènes rapporteurs avec des colonies fraîchement repiquées afin de déterminer la force de l'activation. Un exemple est présenté en figure 2.
- L'activation du gène rapporteur *His3* en présence de différentes concentrations de 3-AT permet de tester le degré d'activation. Ensemercer les colonies fraîchement repiquées sur milieu SD-L (Contrôle positif), SD-L-H+3AT 25 mM et SD-L-H+3AT 100 mM (Test). Vérifier la croissance des colonies après 2 et 4 jours d'incubation à 30°C pour 25 et 100 mM de 3AT. Les clones formant de larges et petites colonies sur 100 mM de 3AT sont classés comme de forts (+++) et moyens (++) activateurs respectivement. Les colonies incapables de croître sur 100 mM de 3AT mais capables de croître sur 25 mM de 3AT sont classées comme de faibles activateurs (+). Les colonies incapables de croître sur aucun des deux milieux sont considérées comme des faux positifs (-)
- Pour le test avec le gène rapporteur *URA3*, ensemercer les colonies fraîchement repiquées sur milieu SD-L (Contrôle positif) et SD-L-U (Test). Incuber pendant 4-5 jours à 30°C. En fonction de la taille des colonies obtenues sur le milieu test et en se référant au milieu contrôle, classer les activateurs potentiels comme de faux positifs (-), de faibles (+), de moyens (++) et de forts (+++) activateurs transcriptionnels.
- Pour le test avec le gène rapporteur *LacZ* (production de β -Galactosidase), ensemercer les colonies fraîchement repiquées sur milieu YAPD pH5.6 recouvert d'une membrane de nitrocellulose. Incuber à 30°C pendant 1-2 jours et procéder au test X-Gal comme décrit par Walhout *et al.*, 2001. Après 24 h d'incubation à 37°C, les colonies sont classées en fonction de leur couleur : pas d'activation (- ; blanche), faible (+ ; verte), moyenne (++ ; bleu clair), et forte activation (+++ ; bleu foncé) du gène rapporteur *LacZ* codant la β -galactosidase.
- Les colonies présentant un score $\geq ++$ pour au moins deux des trois gènes rapporteurs et $\geq +$ pour le gène rapporteur restant sont considérées comme de forts activateurs transcriptionnels.

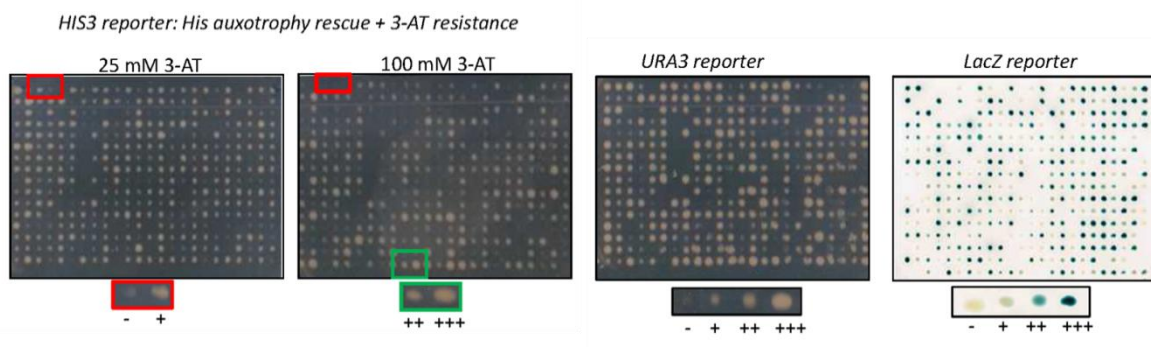


Figure 2 : Exemple de crible simple hybride réalisé afin de déterminer la force des activateurs potentiels.

Test d'activation du gène codant le β -galactosidase (test X-Gal)

- Pour chaque microplaque testée, préparer une boîte de Pétri vide contenant deux filtres de papier Whatman (Whatman, Catalog No. 1454125) et préparer 6 mL de tampon Z (16.1 g.L^{-1} $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ou 8.52 g.L^{-1} anhydre), 5.5 g.L^{-1} $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (ou 4.8 g.L^{-1} anhydre), 0.75 g.L^{-1} KCl, 0.246 g.L^{-1} $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ou 0.12 g.L^{-1} anhydre), pH7.0, Stérilisé à 120°C pendant 20 minutes) contenant 11 μL de 2-mercaptoethanol et 100 μL de X-Gal à 4 % (dissout dans du diméthylformamide).
- Ajouter le tampon Z dans les boîtes. Veiller à ce que le papier Whatman soit bien imbibé et retirer les bulles d'air à l'aide de pinces.
- Récupérer les levures ensemercées la veille ou l'avant-veille (selon la rapidité de croissance) sur une boîte de milieu YAPD contenant une membrane de nitrocellulose.

- A l'aide de pinces, retirer la membrane de nitrocellulose de la boîte et la placer 10 secondes dans de l'azote liquide.
- Placer précautionneusement la membrane dégelée sur le papier Whatman en évitant les bulles. Incuber les boîtes à 37°C sur la nuit.
- Prendre des photos après 4 h et 24 h d'incubation.

NB: Toutes ces étapes doivent être réalisées sous une hotte chimique.

MILIEUX ET SOLUTIONS

Tableau 3 : Composition du milieu YAPD solide.

Compounds	YAPD
Adenine hemisulfate	40 mg.l ⁻¹
Peptone	20 g l ⁻¹
Yeast Extract	10 g l ⁻¹
Glucose	20 g l ⁻¹
Sucrose	-
Bacto agar	20 g l ⁻¹

Le pH est ajusté à 3.5, 4.5 ou 5.6 avant stérilisation à 120°C pendant 20 minutes

Tableau 4: Composition du Drop out mix.

Composés	Drop out mix
Adenine Hemisulfate	2g
L-Arginine	2g
L-Isoleucine	2g
L-Lysine	2g
L-Methionine	2g
L-Phenylalanine	3g
L-Serine	2g
L-Threonine	2g
L-Tyrosine	2g
L-Valine	9g

Tableau 5 : Composition de la solution SD5X.

Composés	SD5X
Drop out mix	3.5 g l ⁻¹
Yeast Nitrogen Base without amino acids (Sigma)	33.5 g l ⁻¹

Le pH est ajusté à 5.6 avant stérilisation à 120°C pendant 20 minutes

Tableau 6 : Composition des milieux SD solide et liquide.

Composés	SD-L-W	SD-L	SD-L-U	SD-L-H
Adenine hemisulfate	40mg l ⁻¹	40mg l ⁻¹	40mg l ⁻¹	40mg l ⁻¹
L-Uracile	40mg l ⁻¹	40mg l ⁻¹	-	40mg l ⁻¹
L-Histidine hydrochloride	40mg l ⁻¹	40mg l ⁻¹	40mg l ⁻¹	-
Bacto agar	+/-20g l ⁻¹	+/-20g l ⁻¹	+20g l ⁻¹	+20g l ⁻¹
Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes				
L-Leucine 4 mg ml ⁻¹ (stérilisée par filtration)	-	-	-	-
L-Tryptophane 4 mg ml ⁻¹ (stérilisé par filtration)	-	10ml	-	-
SC 5X	200ml	200ml	200ml	200ml
Glucose 20% (stérilisé par filtration)	100ml	100ml	100ml	100ml
3 Amino-Triazole 1M	-	-	-	25ml

NB: 25 mM de 3Amino-Triazole 1 M (25 mg.L⁻¹) sont classiquement ajoutés dans le milieu sélectif SD-L-W-H afin d'éliminer l'expression basale du gène rapporteur *His3*. Toutefois, la concentration en 3Amino-Triazole 1 M dans le milieu est souvent augmentée lors du test d'auto activation ou du crible simple- hybride afin de déterminer la force de l'auto activation.

Le système double hybride en levure (Adapté de Soellick *et al.*, 2001)

PRINCIPE

Le système double hybride en levure est une méthode génétique qui permet d'étudier *in vivo* les interactions protéine-protéine chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Il exploite le fait que les facteurs de transcription se composent de deux domaines, un domaine de liaison à l'ADN (DBD) et un domaine d'activation de la transcription (AD). Dans un cribble double hybride, deux catégories de protéines hybrides sont construites. La première X, qualifiée d'appât, est fusionnée en N-terminal avec le DBD du facteur de transcription GAL4. La seconde Y, qualifiée de proie, est fusionnée en N-terminal avec l'AD du facteur de transcription GAL4. Dans notre cas, ce sont des banques d'ADNc qui servent de proies. Un schéma résumant le principe du double hybride en levure est présenté en **figure 1**.

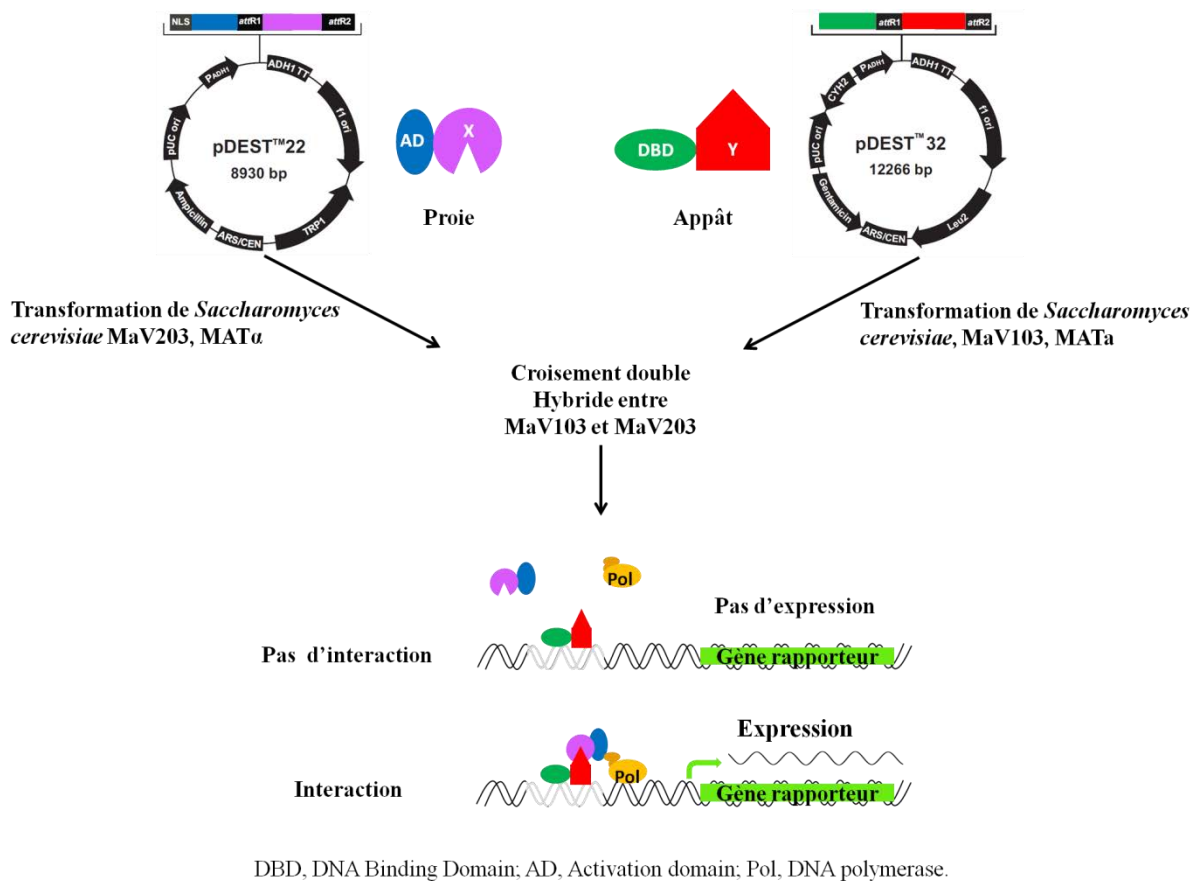


Figure 1 : Principe du système double hybride en levure.

VECTEURS

Tableau 1 : Liste des vecteurs Gateway et des constructions utilisés. M, Mycorrhiza ; R, Roots ; FLM/FB, Free Living Mycelium/Fruiting Bodies.

Nom du vecteur	Souche de levure	Milieu sélectif	Souche de bactérie	Milieu sélectif LB+Antibiotique (µg/ml)
pDONR222 (Vecteur d'entrée)	-	-	BD3.1	LB+Kan50
pDEST TM 22 (Vecteur de destination)	MaV103/MaV203	SD-W	BD3.1	LB+Amp100
pDEST TM 32 (Vecteur de destination)	MaV103/MaV203	SD-L	BD3.1	LB+Gent10
pDEST TM 22-RalGDS-wt (Proie)	MaV103/MaV203	SD-W	DH5α	LB+Amp100
pDEST TM 22-RalGDS-m1 (Proie)	MaV103/MaV203	SD-W	DH5α	LB+Amp100
pDEST TM 22-RalGDS-m2 (Proie)	MaV103/MaV203	SD-W	DH5α	LB+Amp100
pDEST TM 32-Krev1 (Appât)	MaV103/MaV203	SD-L	DH5α	LB+Gent10
pDEST TM 22-BanqueM (Proie)	MaV203	SD-W	DH5α	LB+Amp100
pDEST TM 22-BanqueR (Proie)	MaV203	SD-W	DH5α	LB+Amp100
pDEST TM 22-BanqueFLM/FB (Proie)	MaV203	SD-W	DH5α	LB+Amp100
pDEST TM 32-ADNc (Appât)	MaV103	SD-L	DH5α	LB+Gent10

MATERIEL BIOLOGIQUE

Les 2 souches sexuellement compatibles de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées sont MaV103 (*MATa*, *leu2-3,112*, *trp1-901*, *his3Δ200*, *ade2-101*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *SPAL10::URA3*, *GAL1::lacZ*, *HIS3_{UAS}_{GAL1}::HIS3@LYS2*, *can1^R*, *cyh2^{Ro}*) et MaV203 (*MATa*, *leu2-3,112*, *trp1-901*, *his3Δ200*, *ade2-101*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *SPAL10::URA3*, *GAL1::lacZ*, *HIS3_{UAS}_{GAL1}::HIS3@LYS2*, *can1^R*, *cyh2^R*). Elles sont maintenues sur milieu YAPD solide et cultivées à 30°C. Les souches transformées utilisées ainsi que leur milieu de culture sont détaillés dans le **tableau 2** ci-dessous.

Tableau 2: Liste des souches de levures transformées et de leur milieu de culture. M, Mycorrhiza ; R, Roots ; FLM/FB, Free Living Mycelium/Fruiting Bodies.

Nom de la souche transformée	Vecteur	Milieu de culture
wt (Contrôle forte interaction)	pDEST TM 22-RalGDS-wt pDEST TM 32-Krev1	SD-L-W
m1 (Contrôle faible interaction)	pDEST TM 22-RalGDS-m1 pDEST TM 32-Krev1	SD-L-W
m2 (Contrôle négatif)	pDEST TM 22-RalGDS-m2 pDEST TM 32-Krev1	SD-L-W
MaV203+22 (Contrôle négatif)	pDEST TM 22	SD-W
MaV203+32 (Contrôle négatif)	pDEST TM 32	SD-L
MaV203+22+32(Contrôle négatif)	pDEST TM 22 pDEST TM 32	SD-L-W
MaV203+22+32-ADNc (Contrôle négatif)	pDEST TM 22 pDEST TM 32-ADNc	SD-L-W
MaV203+22-BanqueM (Proie)	pDEST TM 22-BanqueM	SD-W
MaV203+22-BanqueR (Proie)	pDEST TM 22-BanqueR	SD-W
MaV203+22-BanqueFLM/FB (Proie)	pDEST TM 22-BanqueFLM/C	SD-W
MaV103+32-ADNc (Appât)	pDEST TM 32-ADNc (Gène d'intérêt)	SD-L
Zygotes X	pDEST TM 22-ADNcBanque pDEST TM 32-ADNc	SD-L-W

PROTOCOLE

Dans le système double hybride utilisé, l'expression de 3 gènes rapporteurs *lacZ*, *His3* et *URA3* sera testée chez des zygotes diploïdes contenant l'appât et une proie.

Test d'auto activation (Figure2)

Avant de débiter un croisement double hybride, il est essentiel de vérifier que l'appât (notre gène d'intérêt) ne possède pas de domaine d'activation de la transcription et n'active pas seul la transcription des gènes rapporteurs.

- Pour chaque appât à tester ainsi que pour chaque contrôle (wt, m1, m2, MaV203+22, MaV203+32, MaV203+22+32), prélever un clone et inoculer 5 mL de milieu SD-L-W (ou SD-W et SD-L selon le contrôle utilisé). Incuber une nuit à 30°C sous agitation à 200 rpm.
- Le jour suivant, mesurer la DO_{600} de chaque culture saturante et l'ajuster à une $DO=1$ dans un volume final de 1 mL de milieu SD-L-W (ou SD-W et SD-L selon le contrôle utilisé).
- Diluer de 10 en 10 jusqu'à atteindre une dilution 10 000x. Pour chaque clone et chaque dilution, déposer 2 μ L de culture sur les milieux SD, SD-L, SD-W, SD-L-W, SD-L-W-U, SD-L-W-H, SD-L-W-H+3AT 25 mM, SD-L-W-H+3AT 50 mM, SD-L-W-H+3AT 75 mM, SD-L-W-H+3AT 100 mM, SD-L-W-H+3AT 150 mM et SD-L-W-H+3AT 200 mM. Incuber 3-5 jours à 30°C.
- Prendre des photos après 3 et 5 jours d'incubation.
- Procéder également à un test X-gal (voir protocole ci-dessous) et prendre des photos après 4 h et 24 h d'incubation.

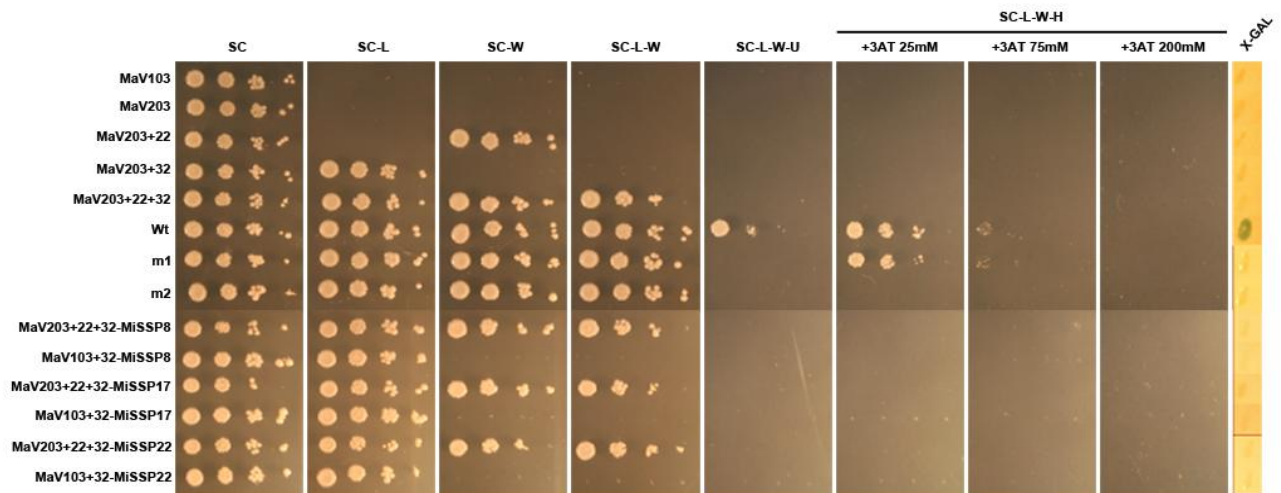


Figure2 : Exemple du test d'autoactivation réalisé avec MiSSP8, MiSSP17 et MiSSP22 comme appât. wt, contrôle forte interaction ; m1, contrôle faible interaction ; m2, MaV203+22, MaV203+32, MaV203+22+32, absence d'interaction = contrôles négatifs.

Si les résultats sont négatifs pour les trois gènes rapporteurs, le crible double hybride pour le gène d'intérêt peut débiter.

Double hybride

Étape 1 : Mise en culture des levures Mav203 exprimant les banques d'ADNc (proie) (Figure 3)

- Aux alentours de midi, décongeler doucement 100 μ L de Banque X-AD dans la glace. Les banques sont conservées à -80°C en présence de glycérol.
- Inoculer 80 μ L de banque dans un erlenmeyer contenant 100 mL de milieu SD-W. Généralement la DO_{600} obtenue est égale à 0,3.
- Utiliser cette suspension pour préparer quatre cultures de DO_{600} respectives 0.3, 0.15, 0.075 et 0.375 dans un volume final de 50 mL.
- Incuber les cultures à 30°C, 200 rpm, sur la nuit. Le lendemain, la DO_{600} des cultures est en général comprise entre 1 et 2.5.

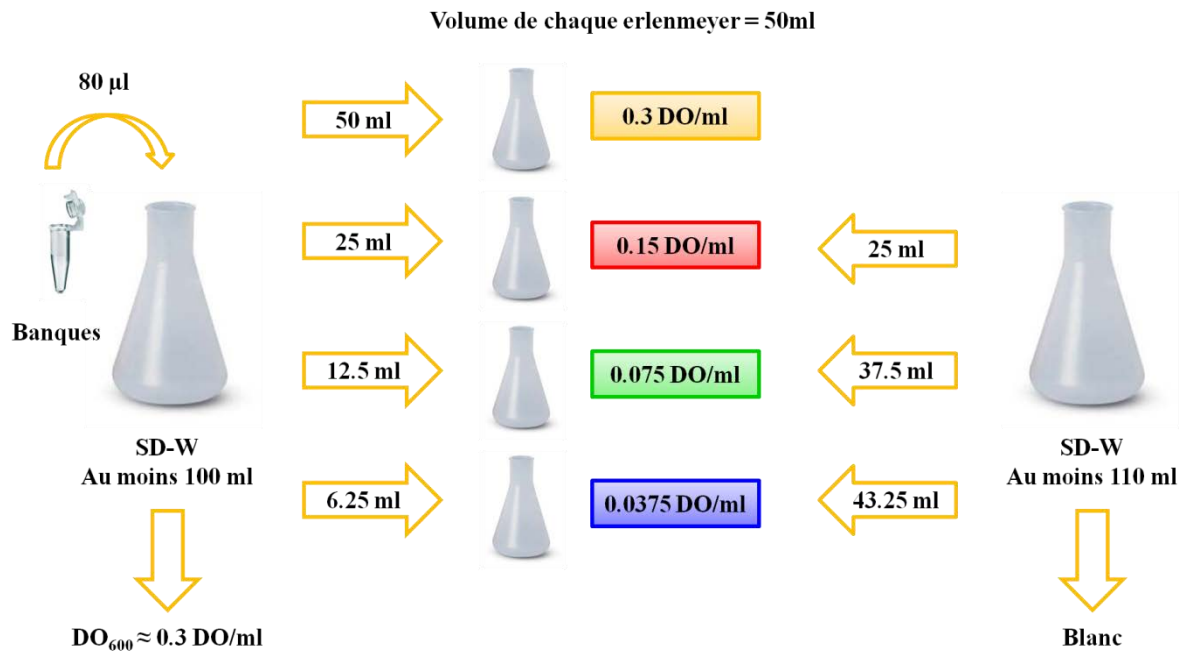


Figure 3 : Mise en culture de la proie.

Etape 2 : Mise en culture des levures Mav103 exprimant le gène d'intérêt (appât) (**Figure 4**)

- Diluer un léger frottis d'appât dans 1 mL d' H₂O dans un eppendorf stérile.
- Diluer 10x puis 100x en veillant à bien homogénéiser la suspension cellulaire entre chaque étape puis mesurer la DO₆₀₀ de ces deux dilutions.
- Sur la base de la concentration mesurée, préparer un erlenmeyer contenant 60 mL de milieu SD-L ensemencé à une DO₆₀₀ de 0,01.
- Utiliser la suspension précédente pour préparer quatre cultures de DO₆₀₀ respectives 0.01, 0.005, 0.0025 et 0.00125 dans un volume final de 30 mL.
- Incuber les cultures à 30°C, 200 rpm, sur la nuit. Le lendemain, la DO₆₀₀ des cultures est en général comprise entre 0.5 et 2.

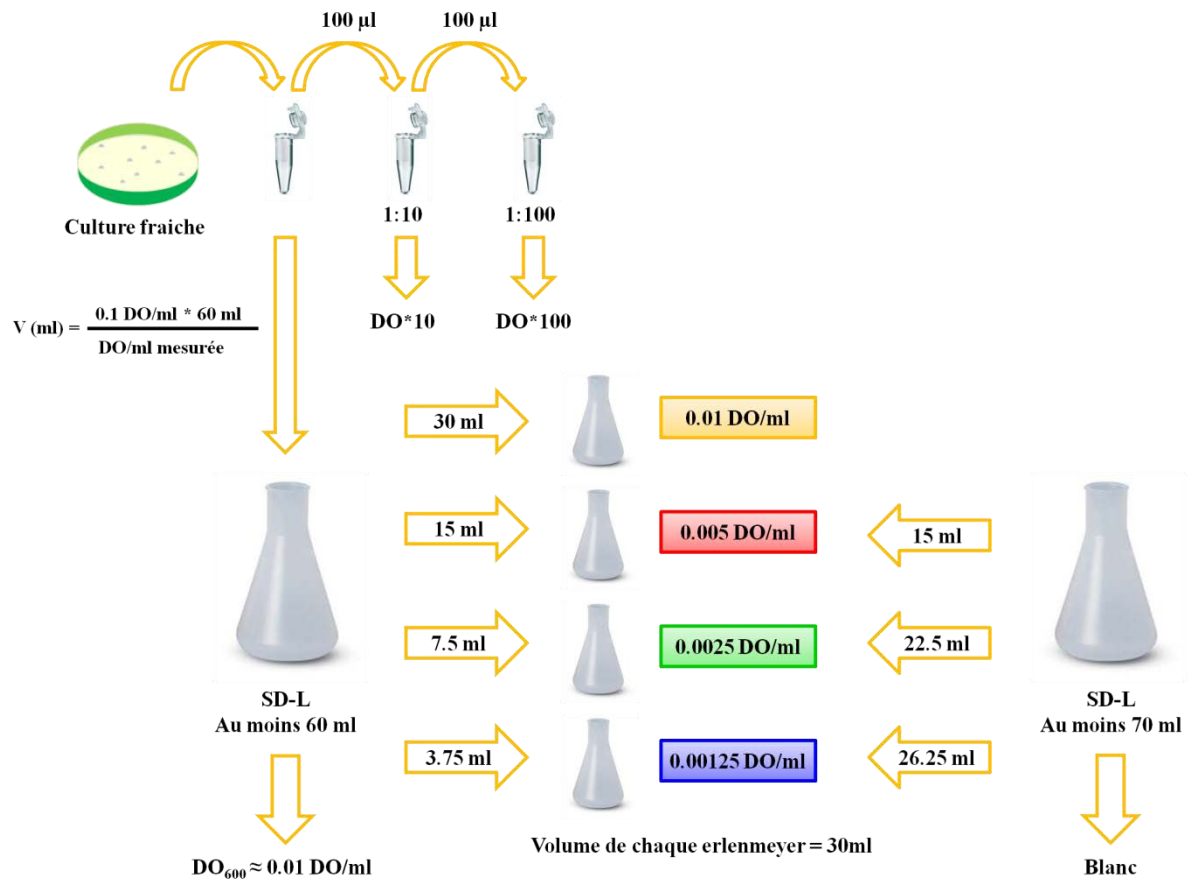


Figure 4 : Mise en culture de l'appât.

Etape 3 : Obtention des zygotes (Figure 5)

- Une fois la phase exponentielle de culture atteinte, mélanger 30 OD₆₀₀ d'appât et 20 OD₆₀₀ de proies dans un falcon de 50 mL et centrifuger pendant 15 minutes à 4°C, à 4000 rpm. Partir des cultures dont la DO₆₀₀ est comprise entre 1.5 et 2.5.
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 3 mL de milieu YAPD pH3.5. Un pH acide permet d'induire la production de phéromones indispensables au croisement des deux levures de type sexuel compatible.
- Dans un tube eppendorf, prélever 10 µL de culture dans 990 µL d'eau stérile (dilution 100x). Incuber le reste de la culture à 30°C, à 200 rpm pendant 105 minutes.
- Pendant ce temps, porter la dilution 100x jusqu'à une dilution 10 000x, de 10 en 10 et étaler 100 et 200 µL de la dernière sur milieu SD-W. Il s'agit ici de quantifier le nombre de levures de type sexuel α avant croisement.
- Préparer le système de filtration sous vide de chez Millipore (Le système est en verre et doit être stérilisé à 120°C pendant 20 minutes avant utilisation. De même pour les filtres de nitrocellulose millipore 0.45 µm, 4.7mm). Avant de procéder à la filtration, il est important de bien placer le filtre au centre du système de filtration, d'éliminer les bulles et mauvais plis et de rincer le système en filtrant 50 mL d'eau stérile.
- Après la période d'incubation, amener le volume de la culture à 50 mL avec de l'eau milliQ stérile et procéder à la filtration.
- Placer la membrane recouverte de levures sur une boîte de milieu YAPD pH4.5 et incuber à 30°C pendant 4h30 minimum afin de permettre au croisement de se faire. Veiller à ce que le filtre adhère bien au milieu et qu'il n'y ait pas de bulles.
- Après le croisement, resuspendre les cellules dans 3 mL de sorbitol 1 M (stérilisé par filtration) dilués dans 37 mL d'eau milliQ stérile. Puis porter à un volume final de 400 mL (dilution 10x).
- Etaler 4 mL de la dilution 10x sur 5 boîtes de milieu SD-L-W-H + 3-AT 25 mM (boîtes de 145 mm de diamètre), marquées 1:10. Incuber 5-7 jours à 30°C.

- Prélever 40 mL de la solution diluée restante et porter le volume à 120 mL avec de l'eau milliQ stérile. Étaler cette nouvelle solution (dilution 1:30) sur 25 boîtes de milieu SD-L-W-H + 3-AT 25 mM à raison de 4 mL par boîte (boîtes de 145 mm de diamètre). Incuber 5-7 jours à 30°C.
- Pendant que les boîtes sèchent, prélever 100 µL de la dilution 10x et diluer de 10 en 10 jusqu'à une dilution 10000x.
- Étaler 250 µL des dilutions 100x, 1000x et 10000x sur milieu SD-L-W (Zygotes) et 100 µL et 200 µL de la dilution 10000x sur milieu SD-L (Type sexuel a) et SD-W (Type sexuel α) (boîtes de 145 mm de diamètre). Il s'agit de quantifier le nombre de zygotes (10^6 à 10^7 attendus), et de cellules de type sexuel α et a après le croisement afin de déterminer le rendement du croisement. Incuber 5-7 jours à 30°C.

NB : Le milieu sélectif SD-Leu-Trp-His + 3AT 25 mM, sur lequel le croisement est étalé étant peu stringent, il est possible d'étaler directement le croisement sur milieu SD-L-W-U afin de ne conserver que les moyennes et fortes interactions. Cela permet de diminuer considérablement le nombre de colonies à tester et de cribler un nombre plus important de zygotes. Dans ce cas, il est préférable de n'étaler que la suspension cellulaire diluée 10x.

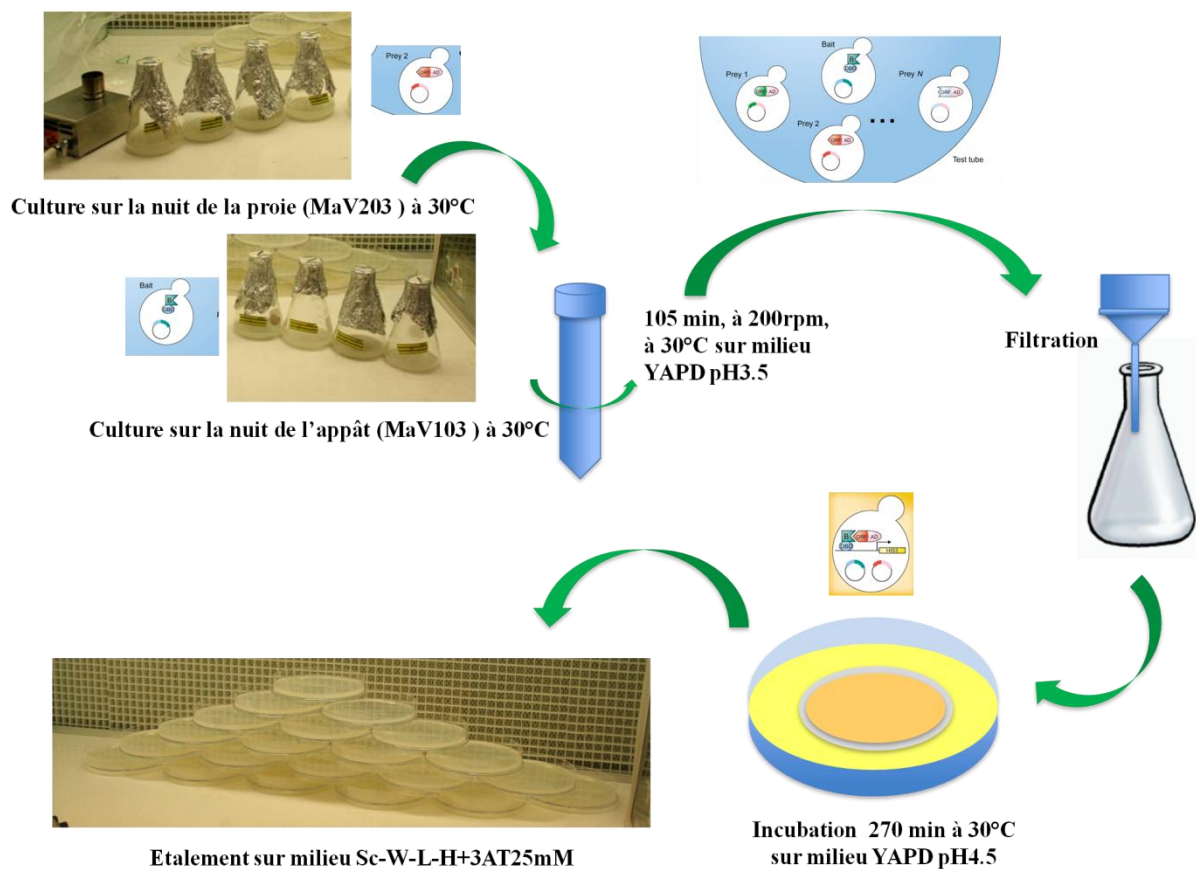


Figure 5 : Principales étapes du croisement double hybride en levure.

Le crible double hybride (Figure 6)

- Collecter des colonies isolées sur milieu sélectif SD-L-W-H + 25 mM 3AT dans des microplaques de 384 puits contenant 80 µL de milieu SD-L-W et incuber à 30°C sur la nuit.
- A l'aide d'un répliqueur, ensemercer pour chaque microplaque, une boîte de SD-L-W, une boîte de SD-L-W-H+3-AT 25 mM et une boîte de SD-L-W-U. Le premier sert de contrôle, le deuxième permet de confirmer l'expression du gène rapporteur *HIS3* et le troisième permet de tester l'expression du deuxième gène rapporteur *URA3*. Ce dernier est beaucoup plus stringent que le premier puisque seules les interactions moyennes et fortes sont révélées. Incuber les boîtes à 30°C pendant 5-7 jours. Prendre des photos après 2 et 5-7 jours.
- Pour le test X-gal, ensemercer à l'aide d'un répliqueur une boîte de YAPD pH5.6 recouverte d'une membrane de nitrocellulose. Incuber à 30°C pendant 1-2 jours et procéder au test X-Gal comme décrit par Walhout *et al.*, 2001. Après 24 h d'incubation à 37°C, les colonies sont classées en fonction de leur

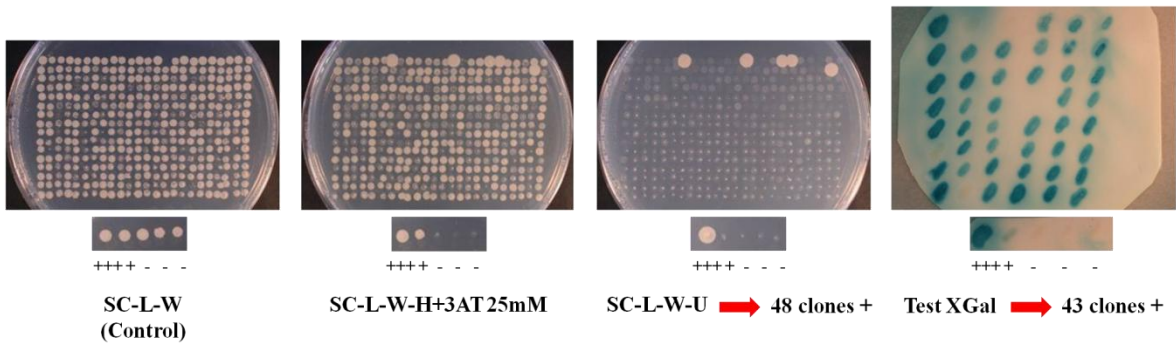
couleur : pas d'activation (- ; blanche), faible (+ ; verte), moyenne (++ ; bleu clair), et forte activation (+++ ; bleu foncé) du gène rapporteur *LacZ* codant la β -galactosidase.

- Les colonies qui poussent sur milieu SD-Leu-Trp-His + 3AT, sur milieu SD -Leu-Trp-Ura et qui présentent un phénotype positif pour le test X-gal sont considérées comme présentant un interactant de la protéine étudiée. Ces colonies sont analysées par PCR et séquençage.

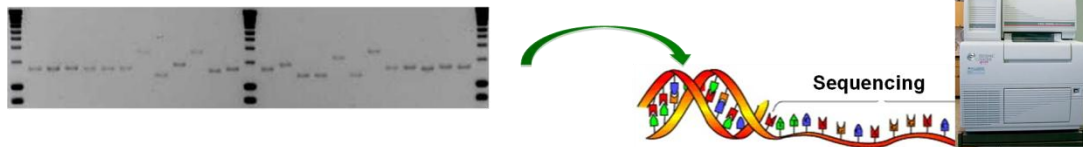
Crible de MiSSP22:

- ➔ > ~2,09.10⁷ de zygotes sont récupérés après croisement double hybride
- ➔ > 1/10 sont étalés sur milieu sélectif SC-L-W-H+3AT25mM
- ➔ ~ 8.10³ ont poussés

- ➔ Crible de >5.10³ colonies



- ➔ PCR et séquençage des clones positifs pour deux ou trois des gènes rapporteurs



- ➔ 3 interactants potentiels

Figure 6 : Exemple du crible réalisé avec MiSSP22 comme appât et détail du nombre d'interactants potentiels obtenus après chaque étape.

Le test X-Gal

- Pour chaque microplaque testée, préparer une boîte de Pétri vide contenant deux filtres de papier Whatman (Whatman, Catalog No. 1454125) et préparer 6 mL de tampon Z (16.1 g.L⁻¹ Na₂HPO₄ 7H₂O (ou 8.52 g.L⁻¹ anhydre), 5.5 g.L⁻¹ NaH₂PO₄ H₂O (ou 4.8 g.L⁻¹ anhydre), 0.75 g.L⁻¹ KCl, 0.246 g.L⁻¹ MgSO₄ 7H₂O (ou 0.12 g.L⁻¹ anhydre), pH7.0, Stérilisé à 120°C pendant 20 minutes) contenant 11 μ L de 2-mercaptoethanol et 100 μ L de X-Gal à 4 % (dissout dans du diméthylformamide).
- Ajouter le tampon Z dans les boîtes. Veiller à ce que le papier Whatman soit bien imbibé et retirer les bulles d'air à l'aide de pinces.
- Récupérer les levures ensemencées la veille ou l'avant-veille (selon la rapidité de croissance) sur une boîte de milieu YAPD contenant une membrane de nitrocellulose.
- A l'aide de pinces, retirer la membrane de nitrocellulose de la boîte et la placer 10 secondes dans de l'azote liquide.
- Placer la membrane dégelée sur le papier Whatman en évitant les bulles. Incuber les boîtes à 37°C sur la nuit.
- Prendre des photos après 4 h et 24 h d'incubation.

NB: Toutes ces étapes doivent être réalisées sous une hotte chimique.

MILIEUX ET SOLUTIONS

Tableau 3 : Composition du milieu YAPD solide.

Compounds	YAPD
Adenine hemisulfate	40 mg.l ⁻¹
Peptone	20 g.l ⁻¹
Yeast Extract	10 g.l ⁻¹
Glucose	20 g.l ⁻¹
Sucrose	-
Bacto agar	20 g.l ⁻¹

Le pH est ajusté à 3.5, 4.5 ou 5.6 avant stérilisation à 120°C pendant 20 minutes

Tableau 4: Composition du Drop out mix.

Composés	Drop out mix
Adenine Hemisulfate	2g
L-Arginine	2g
L-Isoleucine	2g
L-Lysine	2g
L-Methionine	2g
L-Phenylalanine	3g
L-Serine	2g
L-Threonine	2g
L-Tyrosine	2g
L-Valine	9g

Tableau 5 : Composition de la solution SD5X.

Composés	SD5X
Drop out mix	3.5 g.l ⁻¹
Yeast Nitrogen Base without amino acids (Sigma)	33.5 g.l ⁻¹

Le pH est ajusté à 5.6 avant stérilisation à 120°C pendant 20 minutes

Tableau 6 : Composition des milieux SD solide et liquide.

Composés	SD	SD-L	SD-W	SD-L-W	SD-L-W-U	SD-L-W-H
Adenine hemisulfate	40mg l ⁻¹	40mg l ⁻¹	40mg l ⁻¹	40mg l ⁻¹	40mg l ⁻¹	40mg l ⁻¹
L-Uracile	40mg l ⁻¹	40mg l ⁻¹	40mg l ⁻¹	40mg l ⁻¹	-	40mg l ⁻¹
L-Histidine hydrochloride	40mg l ⁻¹	40mg l ⁻¹	40mg l ⁻¹	40mg l ⁻¹	40mg l ⁻¹	-
Bacto agar	+20g l ⁻¹	+/-20g l ⁻¹	+/-20g l ⁻¹	+/-20g l ⁻¹	+20g l ⁻¹	+20g l ⁻¹
Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes						
L-Leucine 4 mg ml ⁻¹ (Filter sterilized)	10ml	-	10ml	-	-	-
L-Tryptophan 4 mg ml ⁻¹ (Filter sterilized)	10ml	10ml	-	-	-	-
SC 5X	200ml	200ml	200ml	200ml	200ml	200ml
Glucose 20% (Filter sterilized)	100ml	100ml	100ml	100ml	100ml	100ml
3 Amino-Triazole 1 M	-	-	-	-	-	25ml

NB: 25 mM de 3Amino-Triazole 1 M (25 ml l⁻¹) sont classiquement ajoutés dans le milieu sélectif SD-L-W-H afin d'éliminer l'expression basale du gène rapporteur *His3*. Toutefois, la concentration en 3Amino-Triazole 1 M dans le milieu est souvent augmentée lors du test d'auto activation ou du crible double hybride afin de déterminer la force de l'auto activation ou de l'interaction.

Mise en évidence d'interaction physique entre deux protéines : le système DivIVA (d'après Edwards *et al.*, 2009)

PRINCIPE

Le système « DivIVA » est une technique *in vivo* de détection des interactions physiques protéine-protéine en système hétérologue *Escherichia coli* et utilisant l'imagerie confocale (Edwards *et al.*, 2009). Elle permet de détecter une large gamme d'interactions et utilise les technologies de clonage de type Gateway. Elle est basée sur la colocalisation de deux protéines d'intérêt X et Y fusionnées respectivement à la protéine DivIVA, une protéine impliquée dans la division cellulaire de *Bacillus subtilis* qui localise exclusivement aux pôles de la cellule bactérienne ou à la GFP. Brièvement, si les deux protéines X et Y n'interagissent pas physiquement, la localisation de la GFP reste cytoplasmique (avec éventuellement une localisation de la fluorescence à un seul pôle de la cellule). A l'inverse, si X et Y interagissent physiquement, la GFP co-localise avec la protéine DivIVA et la fluorescence de la GFP sera détectée aux deux pôles de la cellule bactérienne (**Figure 1**). Au cours de la division cellulaire, un troisième pôle de fluorescence condensé peut apparaître au centre de la cellule. Afin de tester toutes les combinaisons possibles, des fusions N et C-terminales peuvent être réalisées en utilisant les vecteurs pNDIV (Amp^R) et pNGFP (Cm^R) pour les fusions N-terminales et pCDIV (Amp^R) et pCGFP (Cm^R) pour les fusions C-terminales. Les vecteurs pNDIV et pCDIV sont sous la direction du promoteur inducible à l'arabinose P_{BAD} et les vecteurs pNGFP et pCGFP sous la direction du promoteur inducible à l'IPTG T7.

NB : L'expression des fusions GFP est détectée même sans induction à l'IPTG. C'est pourquoi aucune induction à l'IPTG ne sera mentionnée dans le protocole suivant.

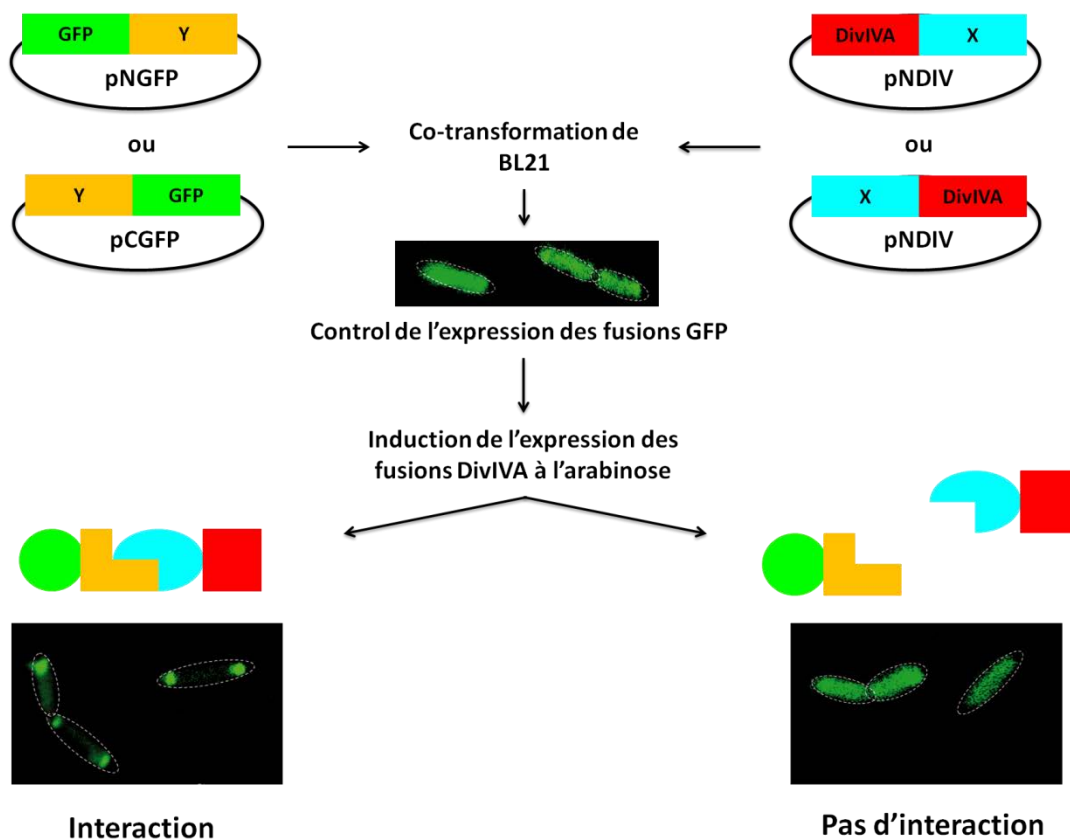


Figure 1 : Principe général et principales étapes du test DivIVA.

VECTEURS

Tableau 1 : Liste des vecteurs Gateway et des constructions utilisés.

Nom du vecteur	Souche de bactérie	Milieu sélectif LB+Antibiotique (µg/ml)	Souche de bactérie	Milieu sélectif LB+Antibiotique (µg/ml)
pDONR207 (Vecteur d'entrée)	-	-	BD3.1	LB+Gen10
pNGFP (Vecteur de destination)	-	-	BD3.1	LB+Chl15
pCGFP (Vecteur de destination)	-	-	BD3.1	LB+Chl15
pNDIV (Vecteur de destination)	-	-	BD3.1	LB+Amp100
pCDIV (Vecteur de destination)	-	-	BD3.1	LB+Amp100
pNGFP-ADNc (construction à tester)	BL21	Chl15	DH5α	LB+Chl15
pCGFP-ADNc (construction à tester)	BL21	Chl15	DH5α	LB+Chl15
pNDIV-ADNc (construction à tester)	BL21	Amp100	DH5α	LB+Amp100
pCDIV-ADNc (construction à tester)	BL21	Amp100	DH5α	LB+Amp100

MATERIEL BIOLOGIQUE :

La souche *E. coli* utilisée est BL21 (DE3, F- *dcm ompT hsdS*(_{τ_B}- *m_B*-) gal [malB⁺]_{K-12}(λ^S). Elle est cultivée à 37°C. Les bactéries co-transformées avec les fusions DivIVA et GFP sont cultivées sur milieu LB supplémenté avec de l'Ampicilline 50 µg.mL⁻¹ et du Chloramphénicol 15 µg.mL⁻¹.

PROTOCOLE

- Inoculer 5 mL de milieu LB supplémenté avec de l'ampicilline 50 µg/mL et du chloramphénicol 15 µg/mL avec les bactéries co-transformées avec les constructions à tester ou les vecteurs contrôles. Incuber sur la nuit à 37°C, à 200 rpm.
- Le jour suivant, contrôler l'expression des fusions GFP à l'aide d'un microscope à fluorescence.
- Ajouter de l'arabinose au milieu de culture à une concentration finale de 2 g.L⁻¹ afin d'induire l'expression des protéines fusions DivIVA. Incuber 1 h à 37°C, à 200 rpm.
- Observer au microscope confocal s'il y a ou non un changement dans la localisation de la fluorescence des protéines fusionnées à la GFP. Une interaction est dite positive si 50 % ou plus des cellules bactériennes observées présentent une localisation polaire de la GFP.

NB: Observer la localisation des protéines fusionnées à la GFP après la culture de nuit permet de vérifier la présence ou non de corps d'inclusions. En effet, ces derniers peuvent résulter d'une surexpression ou d'un mauvais repliement des protéines fusionnées à la GFP. Généralement, ce problème est résolu en abaissant la température des cultures réalisées sur la nuit. Ces observations donnent également des informations sur le profil de localisation des protéines testées, évitant des erreurs d'interprétation.

MILIEUX ET SOLUTIONS

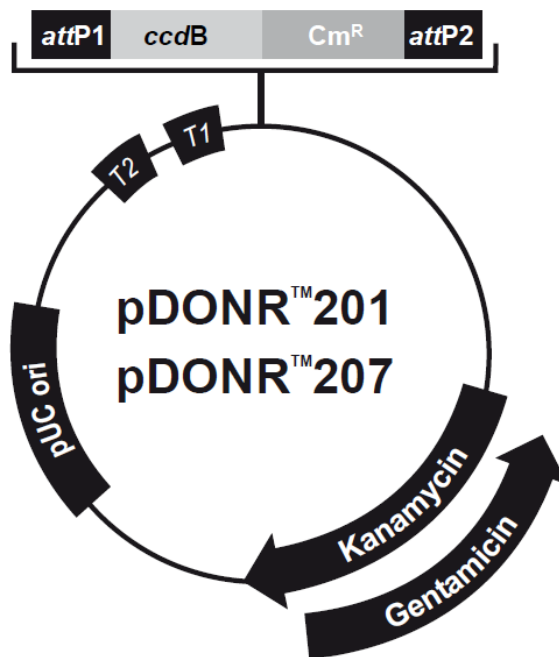
Tableau 2 : Composition du milieu LB solide et liquide.

Composés	LB
Bactotryptone	10 g l ⁻¹
Extrait de levure	5 g l ⁻¹
NaCl	10 g l ⁻¹
Agar	+/-20 g l ⁻¹

Le pH est ajusté à 7.5 avant stérilisation à 120°C pendant 20 minutes

Annexes:
Cartes des vecteurs utilisés

1A

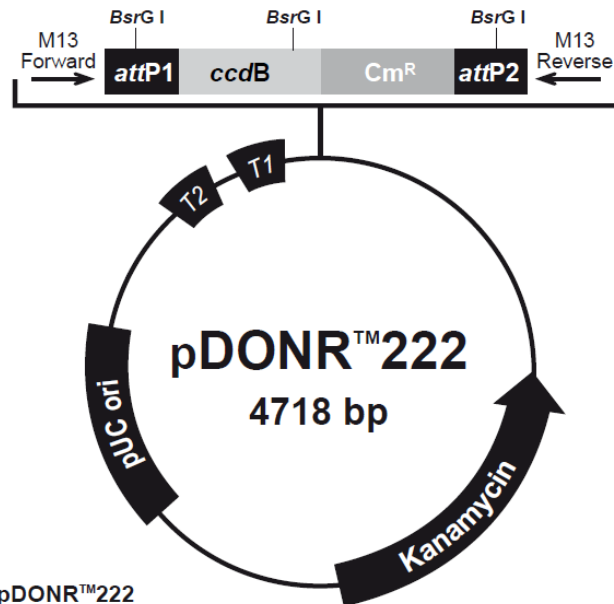


Comments for:

	pDONR™201 4470 nucleotides	pDONR™207 5585 nucleotides
<i>rrnB</i> T2 transcription termination sequence (c):	73-100	73-100
<i>rrnB</i> T1 transcription termination sequence (c):	232-275	232-275
Recommended forward priming site:	300-324	300-324
<i>attP1</i> :	332-563	332-563
<i>ccdB</i> gene (c):	959-1264	959-1264
Chloramphenicol resistance gene (c):	1606-2265	1606-2265
<i>attP2</i> (c):	2513-2744	2513-2744
Recommended reverse priming site:	2769-2792	2769-2792
Kanamycin resistance gene:	2868-3677	---
Gentamicin resistance gene (c):	---	3528-4061
pUC origin:	3794-4467	4909-5582

(c) = complementary strand

1B



Comments for pDONRTM222
4718 nucleotides

rrnB T2 transcription termination sequence: bases 58-85 (c)
rrnB T1 transcription termination sequence: bases 217-260 (c)
M13 Forward (-20) priming site: bases 327-342
attP1: bases 360-591
BsrG I restriction sites: bases 442, 1232, 2689
ccdB gene: bases 987-1292 (c)
Chloramphenicol resistance gene: bases 1612-2295 (c)
attP2: bases 2543-2774 (c)
M13 Reverse priming site: bases 2816-2832
Kanamycin resistance gene: bases 2899-3714 (c)
pUC origin: bases 4045-4718
(c) = complementary strand

Figure 1 : Représentations schématiques des cartes des vecteurs d'entrée Gateway (1A) pDONR201 et pDONR207 et (1B) pDONR222 (Invitrogen).

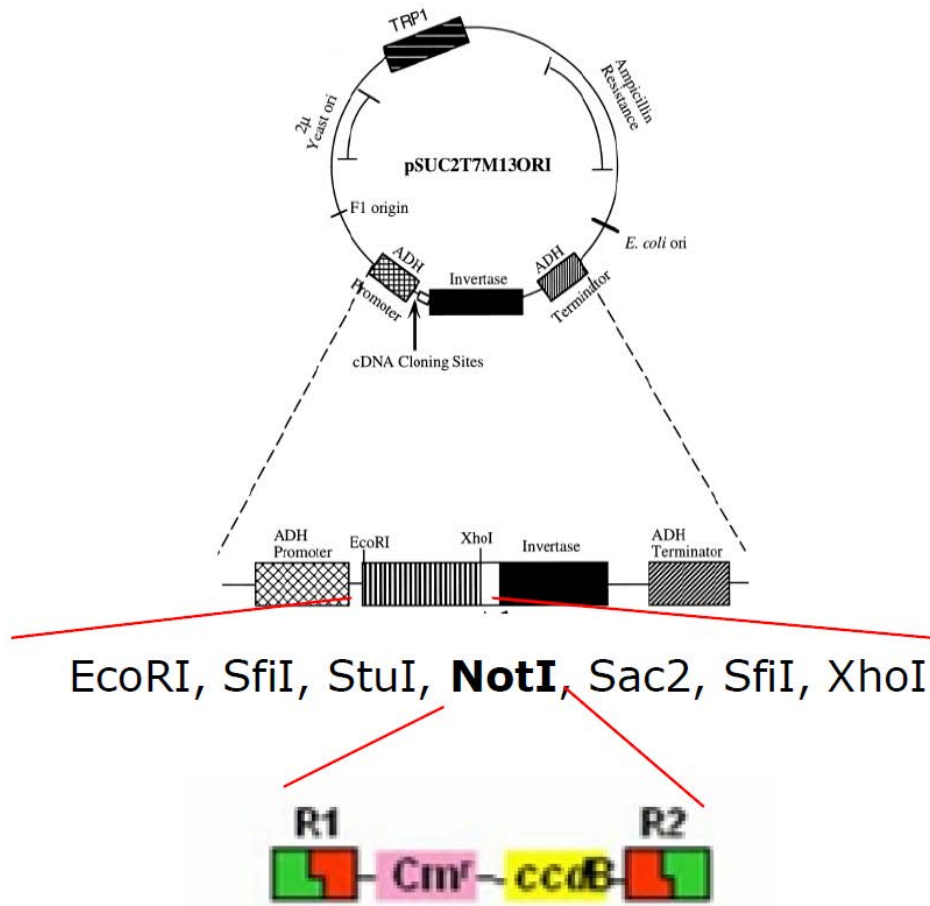
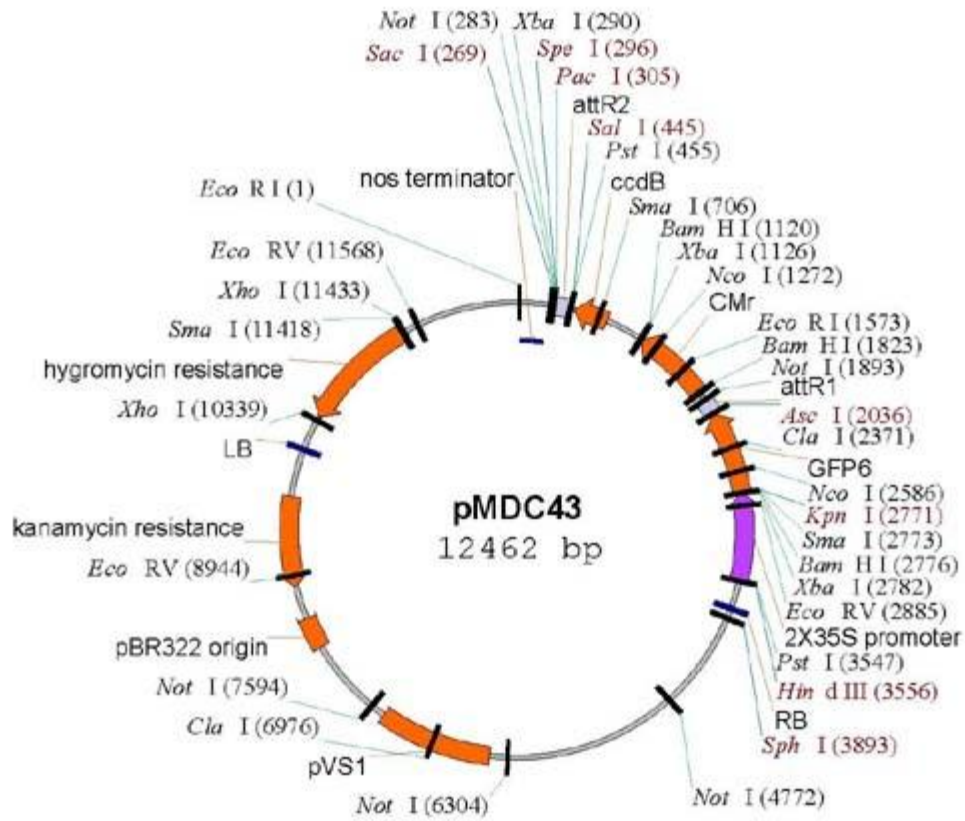


Figure 2 : Représentation schématique de la carte du vecteur de destination Gateway utilisé pour le test de sécrétion en levure (D'après Plett et al., 2011). Le vecteur codant les protéines de fusion SUC2 a été construit à partir du vecteur pSuc2T7M13ORI (Jacobs et al., 1997).

3A



3B

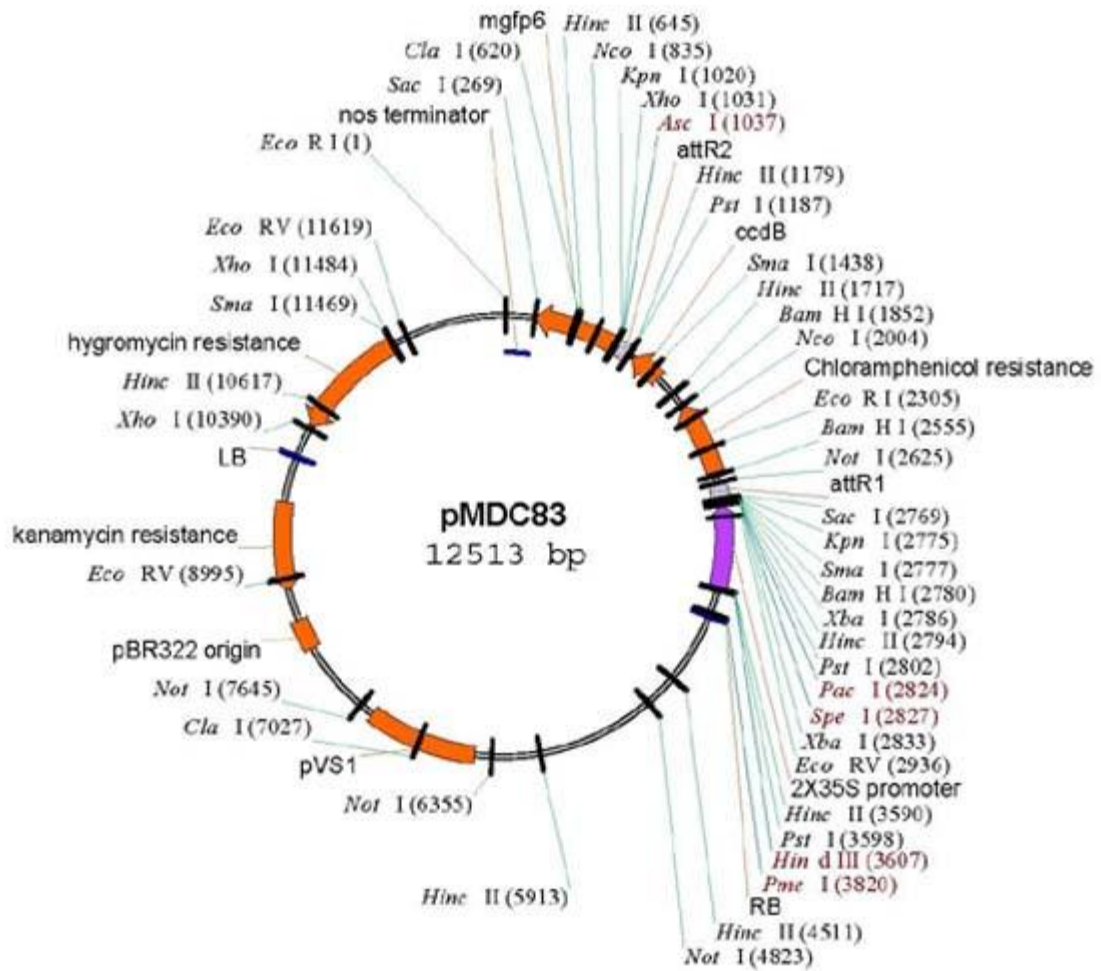
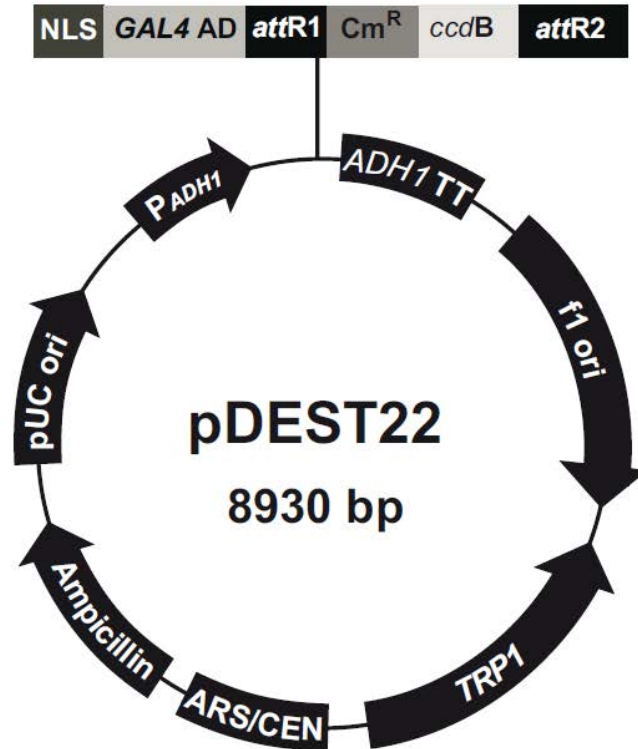


Figure 3 : Représentations schématiques des cartes des vecteurs de destination Gateway (3A) pMDC43 et (3B) pMDC83 utilisés pour faire de l'expression transitoire en tabac de fusions GFP en N-terminale et C-terminale (Curtis and Grossniklaus, 2003).

4A



**Comments for pDEST22
8930 nucleotides**

ADH1 promoter: bases 272-1726

Nuclear localization signal (NLS): bases 1734-1754

GAL4 DNA activation domain: bases 1761-2105

attR1 site: bases 2121-2245

Chloramphenicol resistance (Cm^R) gene: bases 2495-3154

ccdB gene: bases 3495-3800

attR2 site: bases 3841-3965

ADH1 transcription termination region: bases 4203-4360

f1 origin: bases 4687-5142

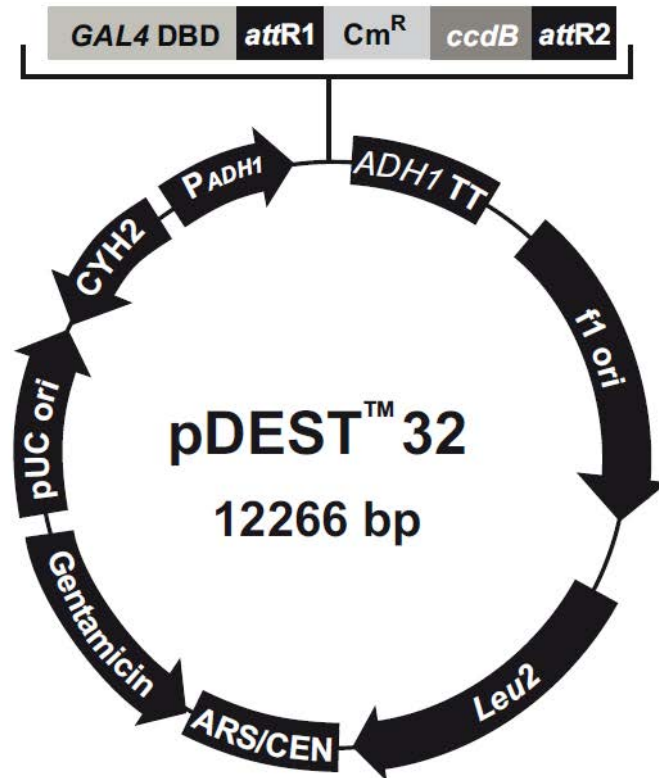
TRP1 gene: bases 5245-5919 (c)

ARS4/CEN6 origin: bases 6455-6972

Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 7104-7964

pUC origin: bases 8109-8782

4B



Comments for pDEST™ 32
12266 nucleotides

ADH1 promoter: bases 103-1557

GAL4 DNA binding domain: bases 1581-2024

attR1 site: bases 2037-2161

Chloramphenicol resistance (*Cm^R*) gene: bases 2411-3070

ccdB gene: bases 3411-3716

attR2 site: bases 3757-3881

ADH1 transcription termination region: bases 4119-4276

f1 origin: bases 4603-5058

Leu2 gene: bases 5767-6861

ARS4/CEN6 origin: bases 7589-8107

Gentamicin resistance gene: bases 8452-8985 (c)

pUC origin: bases 9833-10506

Cycloheximide sensitivity (*CYH2*): bases 11445-11894 (c)

(c) = complementary strand

Figure 4 : Représentations schématiques des cartes des vecteurs de destination Gateway (4A) pDEST22 et (4B) pDEST32 utilisés pour le système double et simple hybride en levure (Invitrogen).

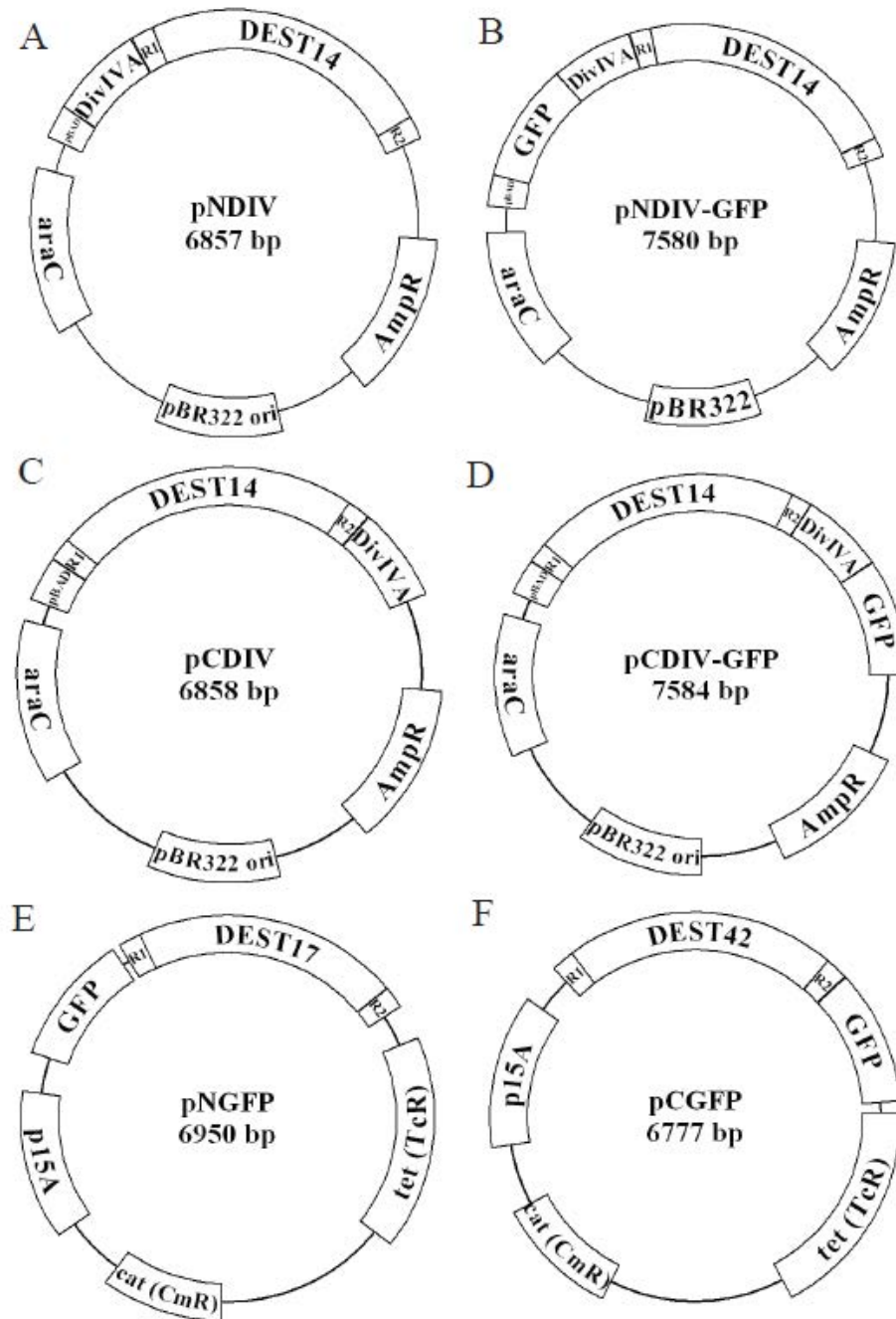


Figure AI.5 : Représentations schématiques des cartes des vecteurs de destination Gateway utilisés pour le système DivIVA (D’après Edwards et al., 2009). (A, B) Vecteurs de fusion de DivIVA et DivIVA-GFP en N-terminale. (C, D) Vecteurs de fusion de DivIVA et DivIVA-GFP en C-terminale. Tous les vecteurs codant les protéines de fusion DivIVA ont été construits à partir du vecteur pBAD24 ayant un promoteur inductible à l’arabinose pBAD. (E) Vecteur de fusion de la GFP en N-terminale. (F) Vecteur de fusion de la GFP en C-terminale. Tous les vecteurs codant les protéines de fusion GFP ont été construits à partir du vecteur pACYC184 ayant un promoteur inductible T7. Les cartes des vecteurs ont été créées à l’aide de pDRAW32 (<http://www.aacalone.com>). P = promoteur.

References bibliographiques

- Abramovitch RB, Anderson JC, and Martin GB: Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006, 7:601-611.
- Abramovitch RB, Janjusevic R, Stebbins CE, Martin GB: Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2006, 103:2851-2856.
- Abramovitch RB, Kim YJ, Chen S, Dickman MB, Martin GB: Pseudomonas type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *EMBO Journal* 2003, 22:60-69.
- Achnine L, Blancaflor EB, Rasmussen S, Dixon RA: Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 2004, 16(11):3098-3109.
- Aguilar JMM, Shby AM, Richards AJM, Loake GJ, Watson MD, Shaw CH: Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards Flavonoid Inducers of the Symbiotic Nodulation Genes. *Journal of General Microbiology* 1988, 134:2741-2746.
- Al-Abras K, Bilger I, Martin F, Le Tacon F, Lapeyrie F: Morphological and physiological changes in ectomycorrhizas of spruce (*Picea excelsa* (Lam.) Link) associated with ageing. *New Phytologist* 1988, 110:535-540.
- Alexander IJ: The significance of ectomycorrhizas in the nitrogen cycle. In: Lee JA, McNeill D, Rorison IH, (eds). In Nitrogen as an Ecological Factor. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications; 1983:69-93.
- Alexander IJ: Ectomycorrhizas – out of Africa? *New Phytologist* 2006, 172:589-591.
- Allen RL, Bittner-Eddy PD, Grenville-Briggs LJ, Meitz JC, Rehmany AP, Rose LE, Beynon JL: Host-parasite coevolutionary conflict between *Arabidopsis* and downy mildew. *Science* 2004, 306:1957-1960.
- Alonso JM, Stepanova AN, Solano R, Wisman E, Ferrari S, Ausubel FM, Ecker JR: Five components of the ethylene-response pathway identified in a screen for weak ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2003, 100:2992–2997.
- Anderson IC, Chambers SM, Cairney JWG: Intra- and interspecific variation in patterns of organic and inorganic nitrogen utilization by three Australian *Pisolithus* species. *Mycological Research* 1999, 103:1579-1587.
- Andrianopoulos A and Timberlake WE: The *Aspergillus nidulans* abaA gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Molecular and Cellular Biology* 1994, 14(4):2503-2515.
- Angot A, Vergunst A, Genin S, Peeters N: Exploitation of eukaryotic ubiquitin signaling pathways by effectors translocated by bacterial type III and type IV secretion systems. *PLoS Pathogens* 2007, 3:e3.
- Arabidopsis* Interactome Mapping Consortium: Evidence for network evolution in an *Arabidopsis* interactome map. *Science* 2011, 333:601–607.
- Aro N, Pakula T, Penttila M: Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 2005, 29:719-739.
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu W-L, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J: MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 2002, 415:977-983.
- Baptista P, Martins A, Pais MS, Tavares RM, Lino-Neto T: Involvement of reactive oxygen species during early stages of ectomycorrhiza establishment between *Castanea sativa* and *Pisolithus tinctorius*. *Mycorrhiza* 2007, 17:185-193.
- Bari R, Jones JDG: Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* 2009, 69:473–488.
- Bartnicki-Garcia S: Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annual Review of Microbiology* 1968, 22:87-108.
- Bassard JE, Mutterer J, Duval F, Werck-Reichhart D: A novel method for monitoring the localization of cytochromes P450 and other endoplasmic reticulum membrane associated proteins: a tool for investigating the formation of metabolons. *FEBS Journal* 2012, 279(9):1576-83.
- Barrett LG, Thrall PH, Dodds PN, van der Merwe M, Linde CC, Lawrence GJ, Burdon JJ: Diversity and evolution of effector loci in natural populations of the plant pathogen *Melampsora lini*. *Molecular Biology and Evolution* 2009, 26:2499-2513.

- Basse CW, Bock K, Boller T: Elicitors and suppressors of the defense response in tomato cells. Purification and characterization of glycopeptide elicitors and glycan suppressors generated by enzymatic cleavage of yeast invertase. *The Journal of Biological Chemistry* 1992, 267:10258-10265.
- Baylis GTS: Fungi, phosphorus and the evolution of root systems. *Search* 1972, 3:257-258.
- Beguiristain TR and Lapeyrie F: Host plant stimulates hypaphorine accumulation in *Pisolithus tinctorius* hyphae during ectomycorrhizal infection while excreted fungal hypaphorine controls root hair development. *New Phytologist* 1997, 136:525-532.
- Beguiristain T, Cote R, Rubini P, Jayallemand C, Lapeyrie F: Hypaphorine accumulation in hyphae of the ectomycorrhizal fungus, *Pisolithus tinctorius*. *Phytochemistry* 1995, 40:1089-1091.
- Bell CD, Soltis DE, and Soltis PS: The age of the angiosperms: a molecular timescale without a clock. *Evolution* 2005, 59:1245-1258.
- Bellion M, Courbot M, Jacob C, Blaudez D, Chalot M: Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters* 2006, 254:173-181.
- Bender CL, Alarcon-Chaidez F, Gross DC: *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1999, 63:266-292.
- Bent AF, Mackey D: Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annual Review of phytopathology* 2007, 45:399-436.
- Berg J, Tymoczko J, Stryer L. In *Biochemistry*. 6th edition. New York, USA: W. H. Freeman; 2006.
- Bhavsar, R.B., Makley, L.N. and Tsonis, P.a. (2010) The other lives of ribosomal proteins. *Human genomics*, 4, 327-344.
- Bleecker AB, Estelle MA, Somerville C, and Kende H: Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 1988, 241:1086-1089.
- Blilou I, Ocampo JA, Garcia-Garrido JM : Resistance of pea roots to endomycorrhizal fungus or *Rhizobium* correlates with enhanced levels of endogenous salicylic acid. *Journal of Experimental Botany* 1999, 50:1663-1668.
- Bidartondo MI, Bruns TD: Extreme specificity in epiparasitic Monotropoideae (Ericaceae): widespread phylogenetic and geographical structure. *Molecular Ecology* 2001, 10:2285-2295.
- Binder BM, Walker JM, Gagne JM, Emborg TJ, Hemmann G, Bleecker AB, Vierstra RD: The *Arabidopsis* EIN3 binding F-Box proteins EBF1 and EBF2 have distinct but overlapping roles in ethylene signaling. *Plant Cell* 2007, 19:509-523.
- Bisson MM, Bleckmann A, Allekotte S, Groth G : EIN2, the central regulator of ethylene signalling, is localized at the ER membrane where it interacts with the ethylene receptor ETR1. *Biochemical Journal* 2009, 424(1):1-6.
- Block A, Li G, Fu ZQ, Alfano JR: Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Current Opinion in Plant Biology* 2008, 11:396-403.
- Boller T, Felix G: A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* 2009, 60:379-406.
- Bolton MD, van Esse HP, Vossen JH, de Jonge R, Stergiopoulos I, Stulemeijer IJE, van den Berg GCM, Borrás-Hidalgo O, Dekker HL, de Koster CG, de Wit PJGM, Joosten MH AJ, Thomma BPHJ: The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Molecular Microbiology* 2008, 69:119-136.
- Bonifacino JS, Traub LM. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem.* 2003;72:395-447.
- Bos JIB, Armstrong MR, Gilroy EM, Boevink PC, Hein I, Taylor RM, Zhendong T, Engelhardt S, Vetukuri RR, Harrower B, Dixelius C, Bryan G, Sadanandom A, Whisson SC, Kamoun S, Birch PRJ: *Phytophthora infestans* effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2010, 107:9909-9914.
- Botton B, Chalot M: Techniques for the Study of Nitrogen Metabolism in Ectomycorrhiza. *Methods in Microbiology* 1991, 23:203-252.

- Bozkurt TO, Schornack S, Win J, Shindo T, Ilyas M, Oliva R, Cano LM, Jones AM, Huitema E, van der Hoorn RA, Kamoun S: *Phytophthora infestans* effector AVRblb2 prevents secretion of a plant immune protease at the haustorial interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2011, 108(51):20832-20837.
- Bozkurt TO, Schornack S, Banfield MJ, Kamoun S: Oomycetes, effectors, and all that jazz. *Current Opinion in Plant Biology* 2012, 15(4):483-492.
- Bradshaw H.D., Ceulemans R., Davis J., Stettler R.: Emerging model system in plant biology: Poplar (*Populus*) as a model forest tree. *Journal of Plant Growth Regulation* 2000, 19: 306-313.
- Branzanti MB, Rocca E, Pisi A: Effect of ectomycorrhizal fungi on chestnut ink disease. *Mycorrhiza* 1999, 9:103-109.
- Bretz JR, Mock NM, Charity JC, Zeyad S, Baker CJ, Hutcheson SW: A translocated protein tyrosine phosphatase of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 modulates plant defence response to infection. *Molecular Microbiology* 2003, 49:389-400.
- Bridges D, Moorhead GB: 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. *Science signalling, Signal Transduction Knowledge Environment* 2005, 2005(296):re10.
- Brodersen P, Petersen M, Bjørn Nielsen H, Zhu S, Newman MA, Shokat KM, Rietz S, Parker J, Mundy J: *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *Plant Journal* 2006, 47:532-546.
- Brown AJ and Casselton LA: Mating in mushrooms: increasing the chances but prolonging the affair. *Trends in Genetics* 2001, 17(7):393-400.
- Brundrett, MC: Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* 2002, 154:275-304.
- Brundrett MC, Piché Y, Peterson RL: A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Canadian Journal of Botany* 1984, 62:2128-2134.
- Brunner AM, Busov VB, Strauss SH: Poplar genome sequence: functional genomics in an ecologically dominant plant species. *Trends in Plant Science* 2004, 9:49-56.
- Brunner PC, Keller N, McDonald BA: Wheat domestication accelerated evolution and triggered positive selection in the beta-xylosidase enzyme of *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS ONE* 2009, 4(11):e7884.
- Bruns TD, Read DJ: *In vitro* germination of non-photosynthetic, myco-heterotrophic plants stimulated by fungi isolated from the adult plants. *New Phytologist* 2000, 148:335-342.
- Burgess T, Dell B, Malajczuk N: Variation in mycorrhizal development and growth stimulation of 20 isolates of *Pisolithus* inoculated onto *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. *New Phytologist* 1994, 127:731-739.
- Burgess T, Dell B, Malajczuk N: In vitro synthesis of *Pisolithus-Eucalyptus* ectomycorrhizae: synchronization of lateral tip emergence and ectomycorrhizal development. *Mycorrhiza* 1996, 6:189-196.
- Burgess T, Laurent P, Dell B, Malajczuk N, Martin F: Effect of fungal-isolate aggressivity on the biosynthesis of symbiosis-related polypeptides in differentiating eucalypt ectomycorrhizas. *Planta* 1995, 195:408-417.
- Burgess TI, Malajczuk N, Grove TS: The ability of 16 ectomycorrhizal fungi to increase growth and phosphorus uptake of *Eucalyptus globulus* Labill. and *E. diversicolor* F. Muell. *Plant and Soil* 1993, 153:155-164.
- Camehl I, Sherameti I, Venus Y, Bethke G, Varma A, Lee J, Oelmüller R: 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* 2010, 185:1062-1073.
- Campbell MM, Ellis BE: Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures. 1. Induction of phenylpropanoid metabolism. *Planta* 1992, 186:409-417.
- Cao H, Bowling SA, Gordon AS, Dong X: Characterization of an *Arabidopsis* Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* 1994, 6(11):1583-1592.
- Casieri L, Ait Lahmidi N, Doidy J, Veneault-Fourrey C, Migeon A, Bonneau L, Courty PE, Garcia K, Charbonnier M, Delteil A, Brun A, Zimmermann S, Plassard C, Wipf D: Biotrophic transportome in mutualistic plant-fungal interactions. *Mycorrhiza* 2013, DOI 10.1007/s00572-013-0496-9.
- Catanzariti AM, Dodds PN, Lawrence GJ, Ayliffe MA, Ellis JG: Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *Plant Cell* 2006, 18:243-256.

- Chabaud M, et al. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation. In *The Medicago truncatula handbook*, U. Mathesius, E.P. Journet, L.W. Sumner eds; 2003.
- Chalot M, Brun A: Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. *FEMS Microbiology Reviews* 1998, 22:21-44.
- Chalot M, Plassard C: Ectomycorrhiza and nitrogen provision to the host tree. In: Polacco JC, Todd CD (eds). *Ecological aspects of nitrogen metabolism in plants*. Wiley, Hoboken, NJ; 2011.
- Chandrashekar A and Satyanarayana KV: Disease and pest resistance in grains of sorghum and millets. *Journal of Cereal Science* 2006, 44(3):287-304.
- Chang P, Kim JY, Kim KW: Concentrations of arsenic and heavy metals in vegetation at two abandoned mine tailings in South Korea. *Environmental Geochemistry and Health* 2005, 27:109-119.
- Chang YC, Penoyer LA, Kwon-Chung KJ: The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. *Infection and immunity* 1996, 64(6):1977-83.
- Chang YC, Wright LC, Tschärke RL, Sorrell TC, Wilson CF, Kwon-Chung KJ: Regulatory roles for the homeodomain and C2H2 Zinc finger regions of *Cryptococcus neoformans* Ste12up. *Molecular Microbiology* 2004, 53(5):1385-1396.
- Chao Q, Rothenberg M, Solano R, Roman G, Terzaghi W, Ecker JR: Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* 1997, 89:1133-1144.
- Chen C, Bélanger RR, Benhamou N, Paulitz TC : Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 2000, 56(1) :13-23.
- Chen LQ, Hou BH, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu XQ, Guo WJ, Kim JG, Underwood W, Chaudhuri B, Chermak D, Antony G, White FF, Somerville SC, Mudgett MB, Frommer WB: Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 2010, 468(7323):527-32.
- Chen YF, Randlett MD, Findell JL, Schaller GE: Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 2002, 277(22):19861-19866.
- Cheng Z, Sun L, Qi T, Zhang B, Peng W, Liu Y, Xie D: The bHLH transcription factor MYC3 interacts with the Jasmonate ZIM-domain proteins to mediate jasmonate response in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 2011, 4:279-288.
- Chen Z, Zheng Z, Huang J, Lai Z, Fan B: Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signaling and Behavior* 2009, 4(6):493-496.
- Chevalier D, Morris ER, Walker JC: 14-3-3 and FHA domains mediate phosphoprotein interactions. *Annual Review of Plant Biology* 2009, 60:67-91.
- Chilvers GA, Douglass PA, Lapeyrie F: A paper-sandwich technique for rapid synthesis of ectomycorrhizas. *New Phytologist* 1986, 103:397-402.
- Chini A, Boter M, Solano R: Plant oxylipins: COI1/JAZs/MYC2 as the core jasmonic acid-signalling module. *FEBS Journal* 2009a, 276:4682-4692.
- Chini A, Fonseca S, Chico JM, Fernández-Calvo P, Solano R: The ZIM domain mediates homo- and heteromeric interactions between *Arabidopsis* JAZ proteins. *Plant Journal* 2009b, 59:77-87.
- Chini A, Fonseca S, Fernández G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, García-Casado G, López-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR, Micol JL, Solano R: The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 2007, 448:666-671.
- Chisholm ST, Dahlbeck D, Krishnamurthy N, Day B, Sjolander K, Staskawicz BJ: Molecular characterization of proteolytic cleavage sites of the *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2005, 102:2087-2092.
- Cholbinski, P., Jastrzebska, Z., Wysocka-Kapcinska, M., Plochocka, D., Gornicka, A., Hopper, A.K. and Zoladek, T. (2011) Yeast ubiquitin ligase Rsp5 contains nuclear localization and export signals. *European journal of cell biology*, 90, 834-843.

- Chung HS, Cooke TF, Depew CL, Patel LC, Ogawa N, Kobayashi Y, Howe GA: Alternative splicing expands the repertoire of dominant JAZ repressors of jasmonate signaling. *Plant Journal* 2010, 63:613–622.
- Chung HS and Howe GA: A critical role for the TIFY motif in repression of jasmonate signaling by a stabilized splice variant of the JASMONATE ZIM-domain protein JAZ10 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2009, 21:131–145.
- Clark KL, Larsen PB, Wang X, Chang C: Association of the *Arabidopsis* CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 1998, 95:5401–5406.
- Cohen Y, Gisi U, Niderman T: Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl ester. *Disease Control and Pest Management* 1993, 83:1054-1062.
- Cohn JR, Martin GB: *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* type III effectors AvrPto and AvrPtoB promote ethylene-dependent cell death in tomato. *Plant Journal* 2005, 44:139-154.
- Colot HV, Park G, Turner GE, Ringelberg C, Crew CM, Litvinkova L, Weiss RL, Borkovich KA, Dunlap JC: A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2006, 103(27):10352-10357.
- Conconi A, Smerdon MJ, Howe GA, Ryan CA: The octadecanoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. *Nature* 1996, 383(6603):826-829.
- Cooke DE, Cano LM, Raffaele S, Bain RA, Cooke LR, Etherington GJ, Deahl KL, Farrer RA, Gilroy EM, Goss EM, Grünwald NJ, Hein I, MacLean D, McNicol JW, Randall E, Oliva RF, Pel MA, Shaw DS, Squires JN, Taylor MC, Vleeshouwers VG, Birch PR, Lees AK, Kamoun S: Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine pathogen. *PLoS Pathogens* 2012, 8(10):e1002940
- Cools HJ and Ishii H: Pre-treatment of cucumber plants with acibenzolar-S-methyl systemically primes a phenylalanine ammonia lyase gene (*PAL1*) for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 2002, 61(5) :273-280.
- Coquoz JL, Buchala A, Metraux JP : The biosynthesis of salicylic acid in potato plants. *Plant Physiology* 1998, 117:1095-1101.
- Cosgrove DJ: Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2005, 6(11):850-61.
- Cui J, Bahrami AK, Pringle EG, Hernandez-Guzman G, Bender CL, Pierce NE, Ausubel FM: *Pseudomonas syringae* manipulates systemic plant defenses against pathogens and herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2005, 102:1791–1796.
- Cullings KW: Single phylogenetic origin of ericoid mycorrhizae within the Ericaceae. *Canadian Journal of Botany* 1996, 74:1896–1909.
- Curtis MD, Grossniklaus U: A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes *in planta*. *Plant Physiology* 2003, 133(2):462-9.
- Damasceno CM, Bishop JG, Ripoll DR, Win J, Kamoun S, Rose JK: Structure of the glucanase inhibitor protein (GIP) family from *Phytophthora* species suggests coevolution with plant endo-beta-1,3-glucanases. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 2008, 21:820-830.
- Damon C, Vallon L, Zimmermann S, Haider MZ, Galeote V, Dequin S, Luis P, Fraissinet-Tachet L, Marmeisse R: A novel fungal family of oligopeptide transporters identified by functional metatranscriptomics of soil eukaryotes. *ISME Journal* 2011, 5:1871–1880.
- Darling DL, Yingling J, Wynshaw-Boris A: Role of 14-3-3 proteins in eukaryotic signaling and development. *Current Topics in Developmental Biology* 2005, 68:281-315.
- Dauphin A, Gerard J, Lapeyrie F, Legue V: Fungal hypaphorine reduces growth and induces cytosolic calcium increase in root hairs of *Eucalyptus globulus*. *Protoplasma* 2007, 231:83-88.
- Davis EL, Hussey RS, Mitchum MG, Baum TJ: Parasitism proteins in nematode-plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 2008, 11:360-366.
- Dawkins R: *The extended phenotype: The long reach of the gene*. Oxford University Press, Oxford, UK; 1999.
- Deakin WJ, Broughton WJ: Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nature Reviews Microbiology* 2009, 7:312-320.

- De Bary A: Comparative Morphology and Biology of the Fungi, Mycetozoa and Bacteria. English translation. Clarendon Press, Oxford, UK; 1887.
- DeBroy S, Thilmony R, Kwack YB, Nomura K, He SY: A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2004, 101:9927-9932
- De Carvalho D: Contribution à l'étude des protéines régulées par la symbiose ectomycorhizienne. Ph.D. Thesis, Ecole Nationale du Génie Rural et Forestier, Nancy, France ; 1994.
- Demianski AJ, Chung KM, Kunkel BN: Analysis of *Arabidopsis* JAZ gene expression during *Pseudomonas syringae* pathogenesis. *Molecular Plant Pathology* 2011, 13:46-57.
- Deng J and Dean RA: Characterization of adenylate cyclase interacting protein AC11 in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *The Open Mycology Journal* 2008, 2:74-81.
- De, S., Varsally, W., Falciani, F. and Brogna, S. (2011) Ribosomal proteins' association with transcription sites peaks at tRNA genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *RNA (New York, N.Y.)*, 17, 1713-1726.
- Dettmann ME: Structure and floristic composition of Cretaceous vegetation of southern Gondwana: implications for angiosperm biogeography. *Palaeobotanist* 1992, 41:224-233.
- Deveau A, Kohler A, Frey-Klett P, Martin F: The major pathways of carbohydrate metabolism in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* S238N. *New Phytologist* 2008, 180(2):379-90.
- Deveau A, Palin B, Delaruelle C, Peter M, Kohler A, Pierrat JC, Sarniguet A, Garbaye J, Martin F, and Frey-Klett P: 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 Phytologist* 2007, 175:743-755.
- De Vos M, Van Oosten VR, Van Poecke RM, Van Pelt JA, Pozo MJ, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux JP, Van Loon LC, Dicke M, Pieterse CM: Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 2005, 18:923-937.
- De Vos M, Van Zaanen W, Koornneef A, Korzelius JP, Dicke M, Van Loon LC, Pieterse CM: Herbivore-induced resistance against microbial pathogens in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 2006, 142:352-363.
- Dexheimer J and Pargney JC: Comparative anatomy of the host-fungus interface in mycorrhizas. *Experientia* 1991, 47:312-320.
- Dexheimer J, Aubert-Dufresne M-P, Gerard J, Le Tacon F, Mousain D: Ultrastructural localization of acid phosphatase activities in two ectomycorrhizas: *Pinus nigra nigricans/Hebeloma crustuliniforme* and *Pinus pinaster/Pisolithus tinctorius*. *Lettres botaniques* 1986, 133:343-352.
- Di Battista C, Selosse MA, Bouchard D, Stenström E, Le Tacon F: Variations in symbiotic efficiency, phenotypic characters and ploidy level among different isolates of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* strain S 238. *Mycological Research* 1996, 100(11):1315-1324.
- Dieci, G., Ruotolo, R., Braglia, P., Carles, C., Carpentieri, A., Amoresano, A. and Ottonello, S. (2009) Positive modulation of RNA polymerase III transcription by ribosomal proteins. *Biochemical and biophysical research communications*, 379, 489-493.
- Ditengou FA, and Lapeyrie F : 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 Interaction* 2000, 13:151-158.
- Ditengou FA, Beguiristain T, Lapeyrie F: Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, and restored by indole-3-acetic acid. *Planta* 2000, 211:722-728.
- Ditengou FA, Raudaskoski M, Lapeyrie F : Hypaphorine, an indole-3-acetic acid antagonist delivered by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, induces reorganisation of actin and the microtubule cytoskeleton in *Eucalyptus globulus* ssp *bicostata* root hairs. *Planta* 2003, 218:217-225.
- Ding C, Vidanes GM, Maguire SL, Guida A, Synnott JM, Andes DR, Butler G: Conserved and divergent roles of Bcr1 and CFEM proteins in *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. *PLoS One* 2011, 6(12):e28151.

- Djamei A, Schipper K, Rabe F, Ghosh A, Vincon V, Kahnt J, Osorio S, Tohge T, Fernie AR, Feussner I, Feussner K, Meinicke P, Stierhof YD, Schwarz H, Macek B, Mann M, Kahmann R. Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* 2011, 478:395-398.
- Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti AM, Ayliffe MA, Ellis JG: The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. *Plant Cell* 2004, 16:755-768.
- Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti AM, Teh T, Wang CI, Ayliffe MA, Kobe B, Ellis JG: Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2006, 103:8888-8893.
- Doehlemann G and Hemetsberger C: Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. *New Phytologist* 2013, 198(4):1001-1016.
- Doehlemann G, Reissmann S, Assmann D, Fleckenstein M, Kahmann R: Two linked genes encoding a secreted effector and a membrane protein are essential for *Ustilago maydis*-induced tumour formation. *Molecular Microbiology* 2011, 81(3):751-66.
- Doehlemann G, van der Linde K, Assmann D, Schwambach D, Hof A, Mohanty A, Jackson D, Kahmann R: Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathogens* 2009, 5: e1000290.
- Dombrecht B, Xue GP, Sprague SJ, Kirkegaard JA, Ross JJ, Reid JB, Fitt GP, Sewelam N, Schenk PM, Manners JM, Kazan K: MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2007, 19:2225-2245.
- Dong X: NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology* 2004, 7:547-552.
- Doyle RJ and Rosenberg M: Microbial Cell Surface Hydrophobicity. American Society of Microbiology, Washington, D.C.; 1990.
- Duddridge JA and Read DJ: Modification of the host-fungus interface in mycorrhizas synthesised between *Suillus bovinus* Fr O. Kuntz and *Pinus sylvestris* L. *New Phytologist* 1984c, 96:583-588.
- Duplessis S, Courty PE, Tagu D, Martin F: Transcript patterns associated with ectomycorrhiza development in *Eucalyptus globulus* and *Pisolithus microcarpus*. *New Phytologist* 2005, 165:599-611.
- Duplessis S, Cuomo CA, Lin YC, Aerts A, Tisserant E, Veneault-Fourrey C, Joly DL, Hacquard S, Amselem J, Cantarel BL, Chiu R, Coutinho PM, Feau N, Field M, Frey P, Gelhaye E, Goldberg J, Grabherr MG, Kodira CD, Kohler A, Kües U, Lindquist EA, Lucas SM, Mago R, Mauceli E, Morin E, Murat C, Pangilinan JL, Park R, Pearson M, Quesneville H, Rouhier N, Sakthikumar S, Salamov AA, Schmutz J, Selles B, Shapiro H, Tanguay P, Tuskan GA, Henrissat B, Van de Peer Y, Rouzé P, Ellis JG, Dodds PN, Schein JE, Zhong S, Hamelin RC, Grigoriev IV, Szabo LJ, Martin F: Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2011, 108(22):9166-9171.
- Duplessis S, Hacquard S, Delaruelle C, Tisserant E, Frey P, Martin F, Kohler A: *Melampsora larici-populina* transcript profiling during germination and timecourse infection of poplar leaves reveals dynamic expression patterns associated with virulence and biotrophy. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 2011, 24(7):808-818.
- Duplessis S, Major IT, Martin F, Seguin A: Poplar and pathogen interactions: insights from *Populus* genome-wide analyses of resistance and defense gene families and gene expression profiling. *Critical Reviews in Plant Sciences* 2009, 28:309-334.
- Durrant WE and Dong X: Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 2004, 42:185-209.
- Eckenwalder JE: Systematics and evolution of *Populus*. *Biology of Populus*. Stettler RF, Bradshaw HD, Heilman PE, et Hinckley TM. (Eds) NRC Research Press: 7-32; 1996.
- Ecker JR: The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* 1995, 268:667-675.
- Edwards AN, Fowlkes JD, Owens ET, Standaert RF, Pelletier DA, Hurst GB, Doktycz MJ, Morrell-Falvey JL: An *in vivo* imaging-based assay for detecting protein interactions over a wide range of binding affinities. *Analytical Biochemistry* 2009, 395:166-177.
- Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D: New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 2003, 13(4):17R-27R.

- Elkind Y, Edwards R, Mavandad M, Hedrick SA, Ribak O, Dixon RA, Lamb CJ: Abnormal plant development and down-regulation of phenylpropanoid biosynthesis in transgenic tobacco containing a heterologous phenylalanine ammonia-lyase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A* 1990, 87(22):9057-9061.
- Ellis JG, Dodds PN: Showdown at the RXLR motif: Serious differences of opinion in how effector proteins from filamentous eukaryotic pathogens enter plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A* 2011, 108(35):14381-14382.
- Ellis JG, Rafiqi M, Gan P, Chakrabarti A, Dodds PN: Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 2009, 12:399-405.
- Erbs G, Newman MA: The role of lipopolysaccharides in induction of plant defence responses. *Molecular Plant Pathology* 2003, 4(5):421-425.
- Espinosa A, Guo M, Tam VC, Fu ZQ, Alfano JR: The *Pseudomonas syringae* type III secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants. *Molecular Microbiology* 2003, 49:377-387.
- Farmer EE, Ryan CA: Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid Activate the Synthesis of Wound-Inducible Proteinase Inhibitors. *Plant Cell* 1992, 4(2):129-134.
- Felix G and Boller T: Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *Journal of Biological Chemistry* 2003, 278:6201-6208.
- Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T: Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal* 1999, 18:265-276.
- Fellbaum CR, Gachomo EW, Beesetty Y, Choudhari S, Strahan GD, Pfeffer PE, Kiers ET, Bücking H: Carbon availability triggers fungal nitrogen uptake and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2012, 109(7):2666-2671.
- Felsenstein J: Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985, 39:783-791.
- Felten J, Kohler A, Morin E, Bhalerao RP, Palme K, Martin F, Ditengou FA, Legué V: The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates lateral root formation in poplar and *Arabidopsis* through auxin transport and signaling. *Plant Physiol* 2009, 151(4):1991-2005.
- Felten J, Legué V, Ditengou FA: Lateral root stimulation in the early interaction between *Arabidopsis thaliana* and the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*: is fungal auxin the trigger? *Plant Signaling and Behavior* 2010, 5(7):864-7.
- Feng F, Zhou JM Plant-bacterial pathogen interactions mediated by type III effectors. *Current Opinion in Plant Biology* 2012, 15(4):469-476.
- Ferl RJ, Manak MS, Reyes MF: The 14-3-3s. *Genome Biology* 2002, 3(7):REVIEWS3010.
- Fernández-Calvo P, Chini A, Fernández-Barbero G, Chico JM, Gimenez-Ibanez S, Geerinck J, Eeckhout D, Schweizer F, Godoy M, Franco-Zorrilla JM, Pauwels L, Witters E, Puga MI, Paz-Ares J, Goossens A, Reymond P, De Jaeger G, Solano R: The *Arabidopsis* bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell* 2011, 23:701-715.
- Feys B, Benedetti CE, Penfold CN, Turner JG: *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* 1994, 6:751-759.
- Finlay RD, Ek H, Odham G, Söderström B: Mycelial uptake, translocation and assimilation of nitrogen from ¹⁵N-labelled ammonium by *Pinus sylvestris* plants infected with four different ectomycorrhizal fungi. *New Phytol* 1988, 110:59-66.
- Finlay RD, Ek H, Odham G, Söderström B: Uptake, translocation and assimilation of nitrogen from ¹⁵N-labelled ammonium and nitrate sources by intact ectomycorrhizal systems of *Fagus sylvatica* infected with *Paxillus involutus*. *New Phytologist* 1989, 113:47-55.
- Finlay RD, Frostegard A, Sonnerfeldt AM: Utilization of organic and inorganic nitrogen sources by ectomycorrhizal fungi in pure culture and in symbiosis with *Pinus contorta* Dougl. ex Loud. *New Phytologist* 1992, 120:105-115.

- Finlay RD, Söderström B: Mycorrhiza and carbon flow to the soil. In *Mycorrhiza functioning*. Edited by Allen MF. London, UK: Chapman and Hall; 1992:134-160.
- Finni C, Andersen CH, Borch J, Gjetting S, Christensen AB, de Boer AH, Thordal-Christensen H, Collinge DB: Do 14-3-3 proteins and plasma membrane H⁺-ATPases interact in the barley epidermis in response to the barley powdery mildew fungus? *Plant Molecular Biology* 2002, 49(2):137-147.
- Fitter AH and Moyersoen B: Evolutionary trends in root-microbe symbioses. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B Biological Sciences* 1996, 351:1367–1375.
- Floudas D, Binder M, Riley R, Barry K, Blanchette RA, Henrissat B, Martínez AT, Otiillar R, Spatafora JW, Yadav JS, Aerts A, Benoit I, Boyd A, Carlson A, Copeland A, Coutinho PM, de Vries RP, Ferreira P, Findley K, Foster B, Gaskell J, Glotzer D, Górecki P, Heitman J, Hesse C, Hori C, Igarashi K, Jurgens JA, Kallen N, Kersten P, Kohler A, Kües U, Kumar TK, Kuo A, LaButti K, Larrondo LF, Lindquist E, Ling A, Lombard V, Lucas S, Lundell T, Martin R, McLaughlin DJ, Morgenstern I, Morin E, Murat C, Nagy LG, Nolan M, Ohm RA, Patyshakuliyeva A, Rokas A, Ruiz-Dueñas FJ, Sabat G, Salamov A, Samejima M, Schmutz J, Slot JC, St John F, Stenlid J, Sun H, Sun S, Syed K, Tsang A, Wiebenga A, Young D, Pisabarro A, Eastwood DC, Martin F, Cullen D, Grigoriev IV, Hibbett DS: The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* 2012, 336:1715-1719.
- Fonseca S, Chico JM, Solano R: The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. *Current Opinion in Plant Biology* 2009a, 12:539–547.
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R: (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology* 2009b, 5:344-350.
- Frank AB: Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 1985, 3:128–145.
- Fu ZQ, Guo M, Jeong BR, Tian F, Elthon TE, Cerny RL, Staiger D, Alfano JR: A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature* 2007, 447: 284-288
- Fu ZQ, Yan S, Saleh A, Wang W, Ruble J, Oka N, Mohan R, Spoel SH, Tada Y, Zheng N, Dong X: NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* 2012, 486(7402):228-232.
- Gafur A, Schützendübel A, Langenfeld-Heyser R, Fritzt E, Polle A: Compatible and Incompetent *Paxillus involutus* Isolates for Ectomycorrhiza Formation *in vitro* with Poplar (*Populus x canescens*) Differ in H₂O₂ production. *Plant Biology* 2004, 6(1):91-99.
- Galan JE and Wolf-Watz H: Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* 2006, 444:567-573.
- Gan PH, Rafiqi M, Ellis JG, Jones DA, Hardham AR, Dodds PN: Lipid binding activities of flax rust AvrM and AvrL567 effectors. *Plant Signaling and Behavior* 2010, 5:1–4.
- Gao Z, Chen YF, Randlett MD, Zhao XC, Findell JL, Kieber JJ, Schaller GE: Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. *Journal of Biological Chemistry* 2003, 278(36):34725-34732.
- Garcerá A, Martínez AI, Castillo L, Elorza MV, Sentandreu R, Valentín E: Identification and study of a *Candida albicans* protein homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Ssr1p, an internal cell-wall protein. *Microbiology* 2003, 149(Pt 8):2137-2145.
- García-Rivera J, Chang YC, Kwon-Chung KJ, Casadevall A: *Cryptococcus neoformans* CAP59 (or Cap59p) is involved in the extracellular trafficking of capsular glucuronoxylomannan. *Eukaryotic Cell*, 2004, 3(2):385-92.
- Garcion C, M'etraux J-P: Salicylic acid. In *Plant Hormone Signaling*, 24:229–255. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2006.
- Gaulin E, Madoui MA, Bottin A, Jacquet C, Mathe C, Couloux A, Wincker P, Dumas B: Transcriptome of *Aphanomyces euteiches*: New Oomycete Putative Pathogenicity Factors and Metabolic Pathways. *PLoS ONE* 2008, 3:e1723.
- Gay G, Normand L, Marmeisse R, Sotta B, Debaud JC: Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnési have increased mycorrhizal activity. *New Phytologist* 1994b, 128:645–657.

- Gea L, Normand L, Vian B, Gay G: Structural aspects of ectomycorrhiza of *Pinus pinaster* (Ait.) Sol. Formed by an IAA-overproducer mutant of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnési. *New Phytologist* 1994, 128:659–670.
- Geerinck J, Pauwels L, De Jaeger G, Goossens A: Dissection of the one-MegaDalton JAZ1 protein complex. *Plant Signaling and Behavior* 2010, 5:1039–1041.
- Geng X, Cheng J, Gangadharan A, Mackey D: The coronatine toxin of *Pseudomonas syringae* is a multifunctional suppressor of Arabidopsis defense. *Plant Cell* 2012, 24(11):4763-74.
- Gietz RD and Schiestl RH: High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols* 2007, 2(1):31-4.
- Giska F, Lichocka M, Piechocki M, Dadlez M, Schmelzer E, Hennig J, Krzymowska M: Phosphorylation of HopQ1, a type III effector from *Pseudomonas syringae*, creates a binding site for host 14-3-3 proteins. *Plant Physiology* 2013, 161(4):2049-2061.
- Glazebrook, J: Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 2005, 43:205–227.
- Glazebrook J, Chen W, Estes B, Chang HS, Nawrath C, Métraux JP, Zhu T, Katagiri F: Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant Journal* 2003, 34, 217–228.
- Godbout C and Fortin JA: Morphological features of synthesised ectomycorrhizae on *Alnus crispa* and *A. rugosa*. *New Phytologist* 1983, 94:249–262.
- Godfrey D, Bohlenius H, Pedersen C, Zhang Z, Emmersen J, Thordal-Christensen H: Powdery mildew fungal effector candidates share N-terminal Y/F/WxC-motif. *BMC Genomics* 2010, 11:317.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG: Life with 6000 genes. *Science* 1996, 274:546-567.
- Gogala N: Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi. *Experientia* 1991, 47:331-340.
- Gohre V, Robatzek S: Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Review of Phytopathology* 2008, 46:189-215.
- Gomez-Gomez L, Boller T: FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* 2000, 5:1003-1011.
- Graham JH and Linderman RG: Ethylene production by ectomycorrhizal fungi, *Fusarium oxysporum* f. sp. pini, and by aseptically synthesized ectomycorrhizae and *Fusarium*-infected Douglas-fir roots. *Canadian Journal of Microbiology* 1980, 26:1340-1347.
- Grant MR, Jones JD: Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease. *Science* 2009, 324:750–752.
- Grell MN, Mouritzen P, Giese H: A *Blumeria graminis* gene family encoding proteins with a C-terminal variable region with homologues in pathogenic fungi. *Gene* 2003, 311:181-192.
- Grijpstra J, Tefsen B, van Die I, de Cock H: The *Cryptococcus neoformans* cap10 and cap59 mutant strains, affected in glucuronoxylomannan synthesis, differentially activate human dendritic cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2009, 57(2):142-50.
- Grijpstra J, Gerwig GJ, Wösten H, Kamerling JP, de Cock H: Production of extracellular polysaccharides by CAP mutants of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* 2009, 8(8):1165-73.
- Guescini M, Zeppa S, Pierleoni R, Sisti D, Stocchi L, Stocchi V: The expression profile of the *Tuber borchii* nitrite reductase suggests its positive contribution to host plant nitrogen nutrition. *Current Genetics* 2007, 51:31-41.
- Guidot A, Verner MC, Debaud JC, Marmeisse R: Intraspecific variation in use of different organic nitrogen sources by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Mycorrhiza* 2005, 15:167.-177.
- Guo H and Ecker JR: Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell* 2003, 115:667–677.
- Guo H and Ecker JR: The ethylene signalling pathway: new insights. *Current Opinion of Plant Biology* 2004, 7:40–49.

- Gurlebeck D, Thieme F, Bonas U: Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *Journal of Plant Physiology* 2006, 163:233-255.
- Gutjahr C and Paszkowski U: Weights in the balance: Jasmonic acid and salicylic acid signaling in root-biotroph interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2009, 22:763-772.
- Guttman DS, Gropp SJ, Morgan RL, Wang PW: Diversifying selection drives the evolution of the type III secretion system pilus of *Pseudomonas syringae*. *Molecular Biology and Evolution* 2006, 23:2342-2354.
- Haas BJ, Kamoun S, Zody MC, Jiang RH, Handsaker RE, Cano LM, Grabherr M, Kodira CD, Raffaele S, Torto-Alalibo T, Bozkurt TO, Ah-Fong AM, Alvarado L, Anderson VL, Armstrong MR, Avrova A, Baxter L, Beynon J, Boevink PC, Bollmann SR, Bos JI, Bulone V, Cai G, Cakir C, Carrington JC, Chawner M, Conti L, Costanzo S, Ewan R, Fahlgren N, Fischbach MA, Fugelstad J, Gilroy EM, Gnerre S, Green PJ, Grenville-Briggs LJ, Griffith J, Grünwald NJ, Horn K, Horner NR, Hu CH, Huitema E, Jeong DH, Jones AM, Jones JD, Jones RW, Karlsson EK, Kunjeti SG, Lamour K, Liu Z, Ma L, Maclean D, Chibucos MC, McDonald H, McWalters J, Meijer HJ, Morgan W, Morris PF, Munro CA, O'Neill K, Ospina-Giraldo M, Pinzón A, Pritchard L, Ramsahoye B, Ren Q, Restrepo S, Roy S, Sadanandom A, Savidor A, Schornack S, Schwartz DC, Schumann UD, Schwessinger B, Seyer L, Sharpe T, Silvar C, Song J, Studholme DJ, Sykes S, Thines M, van de Vondervoort PJ, Phuntumart V, Wawra S, Weide R, Win J, Young C, Zhou S, Fry W, Meyers BC, van West P, Ristaino J, Govers F, Birch PR, Whisson SC, Judelson HS, Nussbaum C: Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* 2009, 461(7262):393-8.
- Hacquard S, Delaruelle C, Legué V, Tisserant E, Kohler A, Frey P, Martin F, Duplessis S: Laser capture microdissection of uredinia formed by *Melampsora larici-populina* revealed a transcriptional switch between biotrophy and sporulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2010, 23(10):1275-1286.
- Hacquard S, Joly DL, Lin YC, Tisserant E, Feau N, Delaruelle C, Legué V, Kohler A, Tanguay P, Petre B, Frey P, Van de Peer Y, Rouzé P, Martin F, Hamelin RC, Duplessis S: A comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populina* (poplar leaf rust). *Molecular Plant-Microbe Interaction* 2012, 25(3):279-93.
- Hacquard S, Petre B, Frey P, Hecker A, Rouhier N, Duplessis S: The poplar-poplar rust interaction: insights from genomics and transcriptomics. *Journal of Pathogens* 2011, 2011:716041.
- Hahn M and Mendgen K: Signal and nutrient exchange at biotrophic plant-fungus interfaces. *Current Opinion in Plant Biology* 2001, 4:322-327.
- Hall, D.A., Zhu, H., Zhu, X., Royce, T., Gerstein, M. and Snyder, M. (2009) Regulation of Gene Expression by a Metabolic Enzyme. *October*, 482.
- Hanania U, Furman-Matarasso N, Ron M, Avni A: Isolation of a novel SUMO protein from tomato that suppresses EIX-induced cell death. *Plant Journal* 1999, 19:533-541.
- Harley JL and Harley EL: A check-list of mycorrhiza in the British flora. *New phytologist* 1987a, 105:1-102.
- Harley JL and Harley EL: A check list of mycorrhiza in the British Flora – addenda, errata and index. *New Phytologist* 1987b, 107, 741–749.
- Harley JL and Smith SE: *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London, UK; 1983.
- Hartmann HA, Kahmann R, Bölker M: The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *The EMBO Journal* 1996, 15(7):1632-1641.
- Hauck P, Thilmony R, He SY: A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2003, 100:8577-8582
- Hause B, Maier W, Miersch O, Kramell R, Strack D: Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiology* 2002, 130:1213-1220.
- Hause B, Mrosk C, Isayenkov S, Strack D: Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochemistry* 2007, 68:101-110.
- Hause B, Schaarschmidt S: The role of jasmonates in mutualistic symbioses between plants and soil-born microorganisms. *Phytochemistry* 2009, 70:1589-1599.
- Hawkins S, Leplé JC, Cornu D, Jouanin L, Pilate G: Stability of transgene expression in poplar : A model of forest tree species. *Annals of Forest Science* 2003, 60:427-438.

- He P, Chintamanani S, Chen Z, Zhu L, Kunkel BN, Alfano JR, Tang X, Zhou JM: Activation of a COI1-dependent pathway in *Arabidopsis* by *Pseudomonas syringae* type III effectors and coronatine. *Plant Journal* 2004, 37:589–602.
- Hebe G, Hager A, Salzer P: Initial signaling processes induced by elicitors of ectomycorrhiza-forming fungi in spruce cells can also be triggered by G-protein-activating mastoparan and protein phosphatase inhibiting cantharidin. *Planta* 1999, 207:418-425.
- Hederstedt L, Rutberg L: Succinate dehydrogenase--a comparative review. *Microbiological Reviews* 1981, 45(4):542-55.
- Hemetsberger C, Herrberger C, Zechmann B, Hillmer M, Doehlemann G: The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *PLoS Pathogens* 2012, 8(5):e1002684.
- Hepler PK: Calcium: a central regulator of plant growth and development. *Plant Cell* 2005, 17(8):2142-2155.
- Herrera-Medina MJ, Tamayo MI, Vierheilig H, Ocampo JA, García-Garrido JM: The Jasmonic Acid Signalling Pathway Restricts the Development of the Arbuscular Mycorrhizal Association in Tomato. *Journal of Plant Growth Regulation* 2008, 27(3):221-230.
- Heuer H, Yin YN, Xue QY, Smalla K, Guo JH: Repeat domain diversity of avrBs3-like genes in *Ralstonia solanacearum* strains and association with host preferences in the field. *Applied and Environmental Microbiology* 2007, 73(13):4379-4384.
- Hibbett DS, Gilbert LB, Donoghue MJ: Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. *Nature* 2000, 407:506–508.
- Hibbett DS, Matheny PB: The relative ages of ectomycorrhizal mushrooms and their plant hosts estimated using Bayesian relaxed molecular clock analyses. *BMC Biology* 2009, 7:13.
- Hilbert JL and Martin F: Regulation of gene expression in ectomycorrhizas. I. Protein changes and the presence of ectomycorrhiza specific polypeptides in the *Pisolithus-Eucalyptus* symbiosis. *New Phytologist* 1988, 110:339-346.
- Hilbert JL, Costa G, Martin F: Ectomycorrhizin Synthesis and Polypeptide Changes during the Early Stage of Eucalypt Mycorrhiza Development. *Plant Physiology* 1991, 97:977-984.
- Ho I: Enzyme activity and phytohormone production of a mycorrhizal fungus, *Laccaria laccata*. *Canadian Journal of Forest Research* 1987, 17:855-858.
- Ho I: Comparison of eight *Pisolithus tinctorius* isolates for growth rate, enzyme activity, and phytohormone production. *Canadian Journal of Forest Research* 1987, 17:31-35.
- Horan DP and Chilvers GA: Chemotropism-the key to ectomycorrhiza formation. *New Phytologist* 1990, 116:297-301.
- Horan DP, Chilvers GA, Lapeyrie FF: Time sequence of the infection process in eucalypt ectomycorrhizas. *New Phytologist* 1988, 109:451-458.
- Hotson A, Chosed R, Shu H, Orth K, Mudgett MB: *Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Molecular Microbiology* 2003, 50:377-389.
- Hotson A and Mudgett MB: Cysteine proteases in phytopathogenic bacteria: identification of plant targets and activation of innate immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 2004, 7:384-390.
- Hou X, Lee LY, Xia K, Yan Y, Yu H: DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Developmental Cell* 2010, 19:884–894.
- Howe GA: Ubiquitin ligase-coupled receptors extend their reach to jasmonate. *Plant Physiology* 2010, 154(2):471-474.
- Howe GA, Lightner J, Browse J, Ryan CA: An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. *Plant Cell* 1996, 8(11):2067-2077.
- Hua J, Sakai H, Nourizadeh S, Chen QG, Bleecker AB, Ecker JR, Meyerowitz EM: EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1998, 10:1321–1332.
- Hua Z, Vierstra RD: The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annual Review of Plant Biology* 2011, 62:299–334.

- Huang J, Gu M, Lai Z, Fan B, Shi K, Zhou YH, Yu JQ, Chen Z: Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiology* 2010, 153(4):1526-1538.
- Huitema E, Bos JJ, Tian M, Win J, Waugh ME, Kamoun S: Linking sequence to phenotype in Phytophthora-plant interactions. *Trends in Microbiology* 2004, 12:193-200.
- Hu, S., Xie, Z., Onishi, A., Yu, X., Jiang, L., Lin, J., Rho, H.-s., Woodard, C., Wang, H., Jeong, J.-s., Long, S., He, X. and Wade, H. (2009) Profiling the Human Protein-DNA Interactome Reveals ERK2 as a Transcriptional Repressor of Interferon Signaling. *Cell*, 139, 610-622.
- Hutchison, E.a., Bueche, J.a. and Glass, N.L. (2012) Diversification of a protein kinase cascade: IME-2 is involved in nonself recognition and programmed cell death in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 192, 467-482.
- Isayenkov S, Mrosk C, Stenzel I, Strack D, Hause B: Suppression of allene oxide cyclase in hairy roots of *Medicago truncatula* reduces jasmonate levels and the degree of mycorrhization with *Glomus intraradices*. *Plant Physiology* 2005, 139:1401-1410.
- Ivanchenko MG, Muday GK, Dubrovsky JG: Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 2008, 55, 335-347.
- Jacobs KA, Collins-Racie LA, Colbert M, Duckett M, Golden-Fleet M, Kelleher K, Kriz R, LaVallie ER, Merberg D, Spaulding V, Stover J, Williamson MJ, McCoy JM: A genetic selection for isolating cDNAs encoding secreted proteins. *Gene* 1997, 198(1-2):289-96.
- Jambois A, Dauphin A, Kawano T, Ditengou FA, Bouteau F, Legue V, Lapeyrie F: Competitive antagonism between IAA and indole alkaloid hypaphorine must contribute to regulate ontogenesis. *Physiologia Plantarum* 2005, 123:120-129.
- James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung GH, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schüssler A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossman AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lücking R, Büdel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin DJ, Spatafora JW, Vilgalys R: Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 2006, 443:818-822.
- Janjusevic R, Abramovitch RB, Martin GB, Stebbins CE: A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 Ubiquitin ligase. *Science* 2006, 311:222-226.
- Jansson S, Douglas CJ: *Populus*: a model system for plant biology. *Annual Review of Plant Biology* 2007, 58:435-458.
- Jiang RH, Tripathy S, Govers F, Tyler BM: RXLR effector reservoir in two *Phytophthora* species is dominated by a single rapidly evolving superfamily with more than 700 members. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2008, 105(12):4874-4879.
- Johansson T, Le Quéré A, Ahren D, Söderström B, Erlandsson R, Lundeberg J, Uhlén M, Tunlid A: Transcriptional responses of *Paxillus involutus* and *Betula pendula* during formation of ectomycorrhizal root tissue. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2004, 17:202-215.
- Johansson A, Staal J, Dixelius C: Early responses in the *Arabidopsis-Verticillium longisporum* pathosystem are dependent on NDR1, JA- and ET-associated signals via cytosolic NPR1 and RFO1. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 2006, 19:958-969.
- Joly DL, Feau N, Tanguay P, Hamelin RC: Comparative analysis of secreted protein evolution using expressed sequence tags from four poplar leaf rusts (*Melampsora* spp.). *BMC Genomics* 2010, 11:422.
- Jones JDG and Dangl JL: The plant immune system. *Nature* 2006, 444:323-329.
- Kadosh D and Johnson AD: Rfg1, a Protein Related to the *Saccharomyces cerevisiae* Hypoxic Regulator Rox1, Controls Filamentous Growth and Virulence in *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biology*, 2001, 21(7):2496-2505.

- Kagale S, Links MG, Rozwadowski K: Genome-wide analysis of ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif-containing transcriptional regulators in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 2010, 152:1109–1134.
- Kale SD, Gu B, Capelluto DG, Dou D, Feldman E, Rumore A, Arredondo FD, Hanlon R, Fudal I, Rouxel T, Lawrence CB, Shan W, Tyler BM: External lipid PI3P mediates entry of eukaryotic pathogen effectors into plant and animal host cells. *Cell* 2010, 142:284-295.
- Kamoun S: A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review of Phytopathology* 2006, 44:41-60.
- Kamoun S: Groovy times: Filamentous pathogen effectors revealed. *Current Opinion in Plant Biology* 2007, 10:358-365.
- Kamper J, Kahmann R, Bolker M, Ma LJ, Brefort T, Saville BJ, Banuett F, Kronstad JW, Gold SE, Muller O, Perlin MH, Wosten HAB, de Vries R, Ruiz-Herrera J, Reynaga-Pena CG, Snetselaar K, McCann M, Perez-Martin J, Feldbrugge M, Basse CW, Steinberg G, Ibeas JI, Holloman W, Guzman P, Farman M, Stajich JE, Sentandreu R, Gonzalez-Prieto JM, Kennel JC, Molina L, Schirawski J, Mendoza-Mendoza A, Greilinger D, Munch K, Rossel N, Scherer M, Vraneš M, Ladendorf O, Vincon V, Fuchs U, Sandrock B, Meng S, Ho ECH, Cahill MJ, Boyce KJ, Weixi Li J, Sanchez-Alonso P, Schreier PH, Hauser-Hahn I, Vaupel M, Koopmann E, Friedrich G, Voss H, Schluter T, Margolis J, Platt D, Swimmer C, Gnirke A, Chen F, Vysotskaia V, Mannhaupt G, Guldener U, Munsterkötter M, Haase D, Oesterheld M, Mewes HW, Mauceli EW, DeCaprio D, Wade CM, Butler J, Young S, Jaffe DB, Calvo S, Nusbaum C, Galagan JE, Birren BW: Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 2006, 444:97-101.
- Karabaghli-Degron C, Sotta B, Bonnet M, Gay G, Le Tacon F: The auxin transport inhibitor 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) inhibits the stimulation of in vitro lateral root formation and the colonization of the tap-root cortex of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *New Phytologist* 1998, 140:723-733.
- Katsir L, Schilmiller AL, Staswick PE, He SY, Howe GA: COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2008, 105:7100–7105.
- Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, Bonas U: A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* 2007, 318: 648-651
- Kazan K, Manners JM: MYC2: the master in action. *Molecular Plant* 2013, 6(3):686-703.
- Keller G: Utilization of inorganic and organic nitrogen sources by high-subalpine ectomycorrhizal fungi of *Pinus cembra* in pure culture. *Mycological Research* 1996, 100:989-998.
- Kemen E, Kemen AC, Rafiqi M, Hempel U, Mendgen K, Hahn M, Voegelé RT: Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 2005, 18:1130-1139.
- Kemppainen M, Duplessis S, Martin F, Pardo AG: RNA silencing in the model mycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*: gene knock-down of nitrate reductase results in inhibition of symbiosis with *Populus*. *Environmental Microbiology* 2009, 11(7):1878-1896.
- Kemppainen MJ, Pardo AG; pHg/pSILBA γ vector system for efficient gene silencing in homobasidiomycetes: optimization of ihpRNA - triggering in the mycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *Microbial Biotechnology*, 2010, 3(2):178-200.
- Kendrick MD and Chang C: Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. *Current Opinion in Plant Biology* 2008, 11:479–485.
- Kerckhoff E, Bister K, Klempnauer K-H: Sequence-specific DNA binding by Myc proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 1991, 88:4323-4327.
- Kidston R, Lang WH: On the old red sandstone plants showing structure from the Rhynie chert bed, Aberdeenshire. Part V. The thallophyta occurring in the peat bed; the succession of the plants through a vertical section of the bed, and the conditions of accumulation and preservation of the deposit. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh* 1921, 52, 855–902.
- Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR: CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* 1993, 72(3):427-441.

- Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah JA, Franken O, Verbruggen E, Fellbaum CR, Kowalchuk GA, Hart MM, Bago A, Palmer TM, West SA, Vandenkoornhuysse P, Jansa J, Bücking H: Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 2011, 333:880-882.
- Klein RD, Gu Q, Goddard A, Rosenthal A: Selection for genes encoding secreted proteins and receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 1996, 93:7108-7113.
- Kleemann J, Rincon-Rivera LJ, Takahara H, Neumann U, Ver Loren van Themaat E, van der Does HC, Hacquard S, Stüber K, Will I, Schmalenbach W, Schmelzer E, O'Connell RJ: Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS Pathogens* 2012, 8(4):e1002643.
- Klironomos JN, Hart MM: Food-web dynamics. Animal nitrogen swap for plant carbon. *Nature* 2001, 410(6829):651-652.
- Klis FM, Sosinska GJ, de Groot PW, Brul S: Covalently linked cell wall proteins of *Candida albicans* and their role in fitness and virulence. *FEMS Yeast Research* 2009, 9(7):1013-1028.
- Kloek AP, Verbsky ML, Sharma SB, Schoelz JE, Vogel J, Klessig DF, Kunkel BN: Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (coi1) mutation occurs through two distinct mechanisms. *Plant Journal* 2001, 26:509-522.
- Kloppholz S, Kuhn H, Requena N: A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Current Biology* 2011, 21:1204-1209.
- Klose J, Kronstad JW: The multifunctional beta-oxidation enzyme is required for full symptom development by the biotrophic maize pathogen *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell* 2006, 5:2047-2061.
- Koda Y, Takahashi K, Kikuta Y, Greulich F, Toshima H, Ichihara A: Similarities of the biological activities of coronatine and coronafacic acid to those of jasmonic acid. *Phytochemistry* 1996, 41:93-96.
- Kondoh O, Muto A, Kajiwara S, Takagi J, Saito Y, Shishido K: A fruiting body-specific cDNA, mfbAc, from the mushroom *Lentinus edodes* encodes a high-molecular-weight cell-adhesion protein containing an Arg-Gly-Asp motif. *Gene* 1995, 154(1):31-37.
- Koornneef A, Leon-Reyes A, Ritsema T, Verhage A, Den Otter FC, Van Loon LC, Pieterse CM: Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiology* 2008, 147:1358-1368.
- Korkama T, Fritze H, Pakkanen A, Pennanen T: Interactions between extraradical ectomycorrhizal mycelia, microbes associated with the mycelia and growth rate of Norway spruce (*Picea abies*) clones. *New Phytologist* 2007, 173:798-807.
- Kramer RW, Slagowski NL, Eze NA, Giddings KS, Morrison MF, Siggers KA, Starnbach MN, Lesser CF: Yeast functional genomic screens lead to identification of a role for a bacterial effector in innate immunity regulation. *PLoS Pathogens* 2007, 3(2):e21.
- Kreuzwieser J, Rennenberg H: Sulphate uptake and xylem loading of mycorrhizal beech roots. *New Phytologist* 1998, 140:319-329.
- Kropp BR, McAfee BJ, Fortin JA: Variable loss of ectomycorrhizal ability in monokaryotic and dikaryotic cultures of *Laccaria bicolor*. *Canadian Journal of Botany* 1987, 65:500-504.
- Kunkel BN, Brooks DM: Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion Plant Biology* 2002, 5:325-331.
- Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G: The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* 2004, 16:3496-3507.
- Kulkarni RD, Thon MR, Pan H, Dean RA: Novel G-protein-coupled receptor-like proteins in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Genome Biology* 2005, 6(3):R24.
- Kuppusamy KT, Walcher CL, Nemhauser JL: Cross-regulatory mechanisms in hormone signaling. *Plant Molecular Biology* 2009, 69:375-381.
- Kulkarni RD, Kelkar HS, Dean RA: An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. *Trends Biochemical Sciences* 2003, 28(3):118-121.

- Kurepa J, Walker JM, Smalle J, Gosink MM, Davis SJ, Durham TL, Sung DY, Vierstra RD: The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in *Arabidopsis*. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress. *Journal Biological Chemistry* 2003, 278:6862-6872.
- Laczko E, Boller T, Wiemken V: Lipids in roots of *Pinus sylvestris* seedlings and in mycelia of *Pisolithus tinctorius* during ectomycorrhiza formation: changes in fatty acid and sterol composition. *Plant, Cell & Environment* 2003, 27:27-40.
- Lagrange H, Jay-Allemand C, Lapeyrie F: Rutin, the phenolglycoside from *Eucalyptus* root exudates stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. *New Phytologist* 2001, 150:349-355.
- Lamarre C, Deslauriers N, Bourbonnais Y: Expression cloning of the *Candida albicans* CSA1 gene encoding a mycelial surface antigen by sorting of *Saccharomyces cerevisiae* transformants with monoclonal antibody-coated magnetic beads. *Molecular Microbiology* 2000, 35(2):444-453.
- Landgraf R, Schaarschmidt S, Hause B: Repeated leaf wounding alters the colonization of *Medicago truncatula* roots by beneficial and pathogenic microorganisms. *Plant, Cell and Environment* 2012, 35(7):1344-1357.
- Lapeyrie F, Ranger J, Vairelles D: Phosphate-solubilizing activity of ectomycorrhizal fungi *in vitro*. *Canadian Journal of Botany* 1991, 69: 342-346.
- Larsen PE, Sreedasyam A, Trivedi G, Podila GK, Cseke LJ, Collart FR: Using next generation transcriptome sequencing to predict an ectomycorrhizal metabolome. *BMC Systems Biology* 2011, 5:70.
- Laurent P: Contribution à l'étude des protéines régulées par la symbiose chez l'ectomycorhize d'*Eucalyptus-Pisolithus*. Caractérisation de mannoprotéines pariétales chez le basidiomycète *Pisolithus tinctorius*. *PhD Thesis*, Université Henri Poincaré-Nancy 1, France ; 1995.
- Laurent P, Voiblet C, Tagu D, de Carvalho D, Nehls U, De Bellis R, Balestrini R, Bauw G, Bonfante P, Martin F: A novel class of ectomycorrhiza-regulated cell wall polypeptides in *Pisolithus tinctorius*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 1999, 12(10):862-871.
- Laureysens I, Blust R, De Temmerman L, Lemmens C, Ceulemans R: Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: I. Seasonal variation in leaf, wood and bark concentrations. *Environmental Pollution* 2004, 131:485-494.
- Laurie-Berry N, Joardar V, Street IH, Kunkel BN: The *Arabidopsis thaliana* *JASMONATE INSENSITIVE 1* gene is required for suppression of salicylic acid-dependent defenses during infection by *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 2006, 19:789-800.
- Laverman AM, Zoomer HR, van Verseveld HW, Verhoef HA: Temporal and spatial variation of nitrogen transformations in a coniferous forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* 2000, 32:1661-1670.
- Lawton KA, Potter SL, Uknes S, Ryals J: Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. *Plant Cell* 1994, 6:581-588.
- Leake JR: 1994. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. Tansley Review No 69. *New Phytologist* 1994, 127:171-216.
- Leake JR, Donnelly DP, Saunders EM, Boddy L, Read DJ: Rates and quantities of carbon flux to ectomycorrhizal mycelium following ¹⁴C pulse labeling of *Pinus sylvestris* seedlings: effects of litter patches and interaction with a wood-decomposer fungus. *Tree Physiology* 2001, 21(2-3):71-82.
- Lehr HA, van der Loss CM, Teeling P, Gown AM: Complete chromogen separation and analysis in double immunohistochemical stains using Photoshop-based image analysis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1999, 47:119-126.
- Lei J, Lapeyrie F, Malajczuk N, Dexheimer J: Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch on roots of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake *in vitro*. II. Ultrastructural and biochemical changes at the early stage of mycorrhiza formation. *New Phytologist* 1990, 116:115-122.
- León-Morcillo RJ, Angel J, Martín-Rodríguez, Vierheilig H, Ocampo JA, García-Garrido JM: Late activation of the 9-oxylin pathway during arbuscular mycorrhiza formation in tomato and its regulation by jasmonate signalling. *Journal of Experimental Botany* 2012, 63(10):3545-3558.
- Le Quere A, Wright DP, Söderström B, Tunlid A, Johansson T: Global patterns of gene regulation associated with the development of ectomycorrhiza between birch (*Betula pendula* Roth.) and *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2005, 18:659-673.

- Le Roy C, Wrana JL: Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2005, 6(2):112-126.
- Le Tacon, F: Towards greater consideration for mycorrhizal fungi in forest management. *Revue Forestiere Francaise* 1997, 245-255.
- Levesque CA, Brouwer H, Cano L, Hamilton JP, Holt C, Huitema E, Raffaele S, Robideau GP, Thines M, Win J, Zerillo MM, Beakes GW, Boore JL, Busam D, Dumas B, Ferriera S, Fuerstenberg SI, Gachon CM, Gaulin E, Govers F, GrenvilleBriggs L, Horner N, Hostetler J, Jiang RH, Johnson J, Krajaejun T, Lin H, Meijer HJ, Moore B, Morris P, Phuntmart V, Puiu D, Shetty J, Stajich JE, Tripathy S, Wawra S, van West P, Whitty BR, Coutinho PM, Henrissat B, Martin F, Thomas PD, Tyler BM, De Vries RP, Kamoun S, Yandell M, Tisserat N, Buell CR: Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. *Genome Biology* 2010, 11:R73.
- Li J, Brader G, Palva ET : The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* 2004, 16, 319–331.
- Libault M, Wan J, Czechowski T, Udvardi M, Stacey G: Identification of 118 *Arabidopsis* transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defense elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 2007, 20:900-911.
- Lindström, M.S. (2009) Emerging functions of ribosomal proteins in gene-specific transcription and translation. *Biochemical and biophysical research communications*, 379, 167-170.
- Liu Z, Bos JJ, Armstrong M, Whisson SC, da Cunha L, TortoAlalibo T, Win J, Avrova AO, Wright F, Birch PR, Kamoun S: Patterns of diversifying selection in the phytotoxin-like scr74 gene family of *Phytophthora infestans*. *Molecular Biology and Evolution* 2005, 22: 659-672.
- Li W, Yadeta KA, Elmore JM, Coaker G: The *Pseudomonas syringae* effector HopQ1 promotes bacterial virulence and interacts with tomato 14-3-3 proteins in a phosphorylation-dependent manner. *Plant Physiology* 2013, 161(4):2062-2074.
- Li X, Zhang Y, Clarke JD, Li Y, Dong X: Identification and cloning of a negative regulator of systemic acquired resistance, SNI1, through a screen for suppressors of npr1-1. *Cell* 1999, 98(3):329-39.
- López MF, Dietz S, Grunze N, Bloschies J, Weiss M, Nehls U: The sugar porter gene family of *Laccaria bicolor*: function in ectomycorrhizal symbiosis and soil-growing hyphae. *New Phytologist* 2008, 180(2):365-378.
- Lois LM, Lima CD, Chua NH: Small ubiquitin-like modifier modulates abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2003, 15:1347-1359.
- López MF, Männer P, Hampp R, Nehls U: Increased trehalose biosynthesis in Hartig net hyphae of ectomycorrhizas. *New Phytologist* 2007, 174:389-398.
- López-Ráez JA, Verhage A, Fernández I, García JM, Azcón-Aguilar C, Flors V, Pozo MJ: Hormonal and transcriptional profiles highlight common and differential host responses to arbuscular mycorrhizal fungi and the regulation of the oxylipin pathway. *Journal of Experimental Botany* 2010, 61:2589-2601.
- Lorenzo O, Chico JM, Sánchez-Serrano JJ, Solano R: *JASMONATEINSENSITIVE1* encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2004, 16:1938–1950.
- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R: ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 2003, 15:165–178.
- Lorenzo O and Solano R: Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Current Opinion in Plant Biology* 2005, 8:532–540.
- Loth-Pereda V, Orsini E, Courty PE, Lota F, Kohler A, Diss L, Blaudez D, Chalot M, Nehls U, Bucher M, Martin F: Structure and expression profile of the phosphate Pht1 transporter gene family in mycorrhizal *Populus trichocarpa*. *Plant Physiology* 2011, 156(4):2141-2154.
- Loukehaich R, Wang T, Ouyang B, Ziaf K, Li H, Zhang J, Lu Y, Ye Z: SpUSP, an annexin-interacting universal stress protein, enhances drought tolerance in tomato. *Journal Experimental of Botany* 2012, 63(15):5593-606.
- Lucas J: Plant pathology and plant pathogens Blackwell Sci, Oxford UK; 1998.
- Lucic E, Fourrey C, Kohler A, Martin F, Chalot M, Brun-Jacob A: A gene repertoire for nitrogen transporters in *Laccaria bicolor*. *New Phytologist* 2008, 180:343-364.

- Ludwig-Müller J, Bennett RN, García-Garrido JM, Piché Y, Vierheilig H: Reduced arbuscular mycorrhizal root colonization in *Tropaeolum majus* and *Carica papaya* after jasmonic acid application can not be attributed to increased glucosinolate levels. *Journal of Plant Physiology* 2002, 159(5):517-523.
- Lugones LG, Bosscher JS, Scholtmeyer K, de Vries OM, Wessels JG: An abundant hydrophobin (ABH1) forms hydrophobic rodlet layers in *Agaricus bisporus* fruiting bodies. *Microbiology* 1996, 142(Pt5):1321-1329.
- Luo ZB, Janz D, Jiang X, Göbel C, Wildhagen H, Tan Y, Rennenberg H, Feussner I, Polle A: Upgrading root physiology for stress tolerance by ectomycorrhizas: insights from metabolite and transcriptional profiling into reprogramming for stress anticipation. *Plant Physiology* 2009, 151:1902-1917.
- Lu H, Salimian S, Gamelin E, Wang G, Fedorowski J, LaCourse W, Greenberg JT: Genetic analysis of *acd6-1* reveals complex defense networks and leads to identification of novel defense genes in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 2009, 58(3):401-412.
- McCann HC and Guttman DS: Evolution of the type III secretion system and its effectors in plant-microbe interactions. *New Phytologist* 2008, 177:33-47.
- Mandaokar A, Thines B, Shin B, Lange BM, Choi G, Koo YJ, Yoo YJ, Choi YD, Choi G, Browse J: Transcriptional regulators of stamen development in *Arabidopsis* identified by transcriptional profiling. *Plant Journal* 2006, 46:984-1008.
- Manning VA and Ciuffetti LM: Localization of Ptr ToxA produced by *Pyrenophora tritici-repentis* reveals protein import into wheat mesophyll cells. *Plant Cell* 2005, 17:3203-3212.
- Manning VA, Hamilton SM, Karplus PA, Ciuffetti LM: The Arg-Gly-Asp-containing, solvent-exposed loop of Ptr ToxA is required for internalization. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 2008, 21:315-325.
- Mansfield JW: Antimicrobial Compounds and Resistance. In *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. Slusarenko A, Fraser RSS, van Loon LC (eds). Kluwer Academic publishers; 2000:325-370.
- Mansouri-Bauly H, Kruse J, Sýkorová Z, Scheerer U, Kopriva S: Sulfur uptake in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. *Mycorrhiza* 2006, 16(6):421-427.
- Maor R, Jones A, Nühse TS, Studholme DJ, Peck SC, Shirasu K: Multidimensional protein identification technology (MudPIT) analysis of ubiquitinated proteins in plants. *Molecular and Cellular Proteomics* 2007, 6:601-610.
- Marshall R, Kombrink A, Motteram J, Loza-Reyes E, Lucas J, Hammond-Kosack KE, Thomma BP, Rudd JJ: Analysis of two in planta expressed LysM effector homologs from the fungus *Mycosphaerella graminicola* reveals novel functional properties and varying contributions to virulence on wheat. *Plant Physiology* 2011, 156(2):756-69.
- Martin F, Aerts A, Ahrén D, Brun A, Danchin EG, Duchaussoy F, Gibon J, Kohler A, Lindquist E, Pereda V, Salamov A, Shapiro HJ, Wuyts J, Blaudez D, Buée M, Brokstein P, Canbäck B, Cohen D, Courty PE, Coutinho PM, Delaruelle C, Detter JC, Deveau A, DiFazio S, Duplessis S, Fraissinet-Tachet L, Lucie E, Frey-Klett P, Fourrey C, Feussner I, Gay G, Grimwood J, Hoegger PJ, Jain P, Kilaru S, Labbé J, Lin YC, Legué V, Le Tacon F, Marmeisse R, Melayah D, Montanini B, Muratet M, Nehls U, Niculita-Hirzel H, Oudot-Le Secq MP, Peter M, Quesneville H, Rajashekar B, Reich M, Rouhier N, Schmutz J, Yin T, Chalot M, Henrissat B, Kües U, Lucas S, Van de Peer Y, Podila GK, Polle A, Pukkila PJ, Richardson PM, Rouzé P, Sanders IR, Stajich JE, Tunlid A, Tuskan G, Grigoriev IV: The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* 2008, 452:88-92.
- Martin F, Boiffin V, Pfeffer PE: Carbohydrate and amino acid metabolism in the *Eucalyptus globules-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizal during glucose utilization. *Plant Physiology* 1998, 118:627-635.
- Martin F, Canet D, Marchal JP, Brondeau J: *In vivo* natural-abundance ¹³C nuclear magnetic resonance studies of living ectomycorrhizal fungi. Observation of fatty acids in *Cenococcum graniforme* and *Hebeloma crustuliniforme*. *Plant Physiology* 1984, 75:151-153.
- Martin F, Duplessis S, Ditengou F, Lagrange H, Voiblet C, Lapeyrie, F : Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes. *New Phytologist* 2001, 151:145-154.
- Martin F, Kamoun S: Effectors in plant-microbe interactions. F Martin and S Kamoun ed. John Wiley & Sons Inc; 2011.
- Martin F, Kohler A, Murat C, Balestrini R, Coutinho PM, Jaillon O, Montanini B, Morin E, Noel B, Percudani R, Porcel B, Rubini A, Amicucci A, Amselem J, Anthouard V, Arcioni S, Artiguenave F, Aury JM, Ballario P, Bolchi A, Brenna A, Brun A, Buée M, Cantarel B, Chevalier G, Couloux A, Da Silva C, Denoeud F, Duplessis

- S, Ghignone S, Hilselberger B, Iotti M, Marçais B, Mello A, Miranda M, Pacioni G, Quesneville H, Riccioni C, Ruotolo R, Splivallo R, Stocchi V, Tisserant E, Viscomi AR, Zambonelli A, Zampieri E, Henrissat B, Lebrun MH, Paolocci F, Bonfante P, Ottonello S, Wincker P: Perigord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* 2010, 464(7291):1033-1038.
- Martin F, Laurent L, de Carvalho D, Burgess T, Murphy P, Nehls U, Tagu D: Fungal gene expression during ectomycorrhiza formation. *Canadian Journal of Botany* 1995, 73(S1):541-547.
- Martin F, Laurent P, de Carvalho D, Voiblet C, Balestrini R, Bonfante P, Tagu D: Cell wall proteins of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*: identification, function, and expression in symbiosis. *Fungal Genetics and Biology* 1999, 27(2-3):161-74.
- Martin F and Selosse MA: The *Laccaria* genome: a symbiont blueprint decoded. *New Phytologist* 2008, 180: 296–310.
- Martin F and Tagu D: Ectomycorrhiza development: a molecular perspective. In *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Eds A Varma and B Hock pp. 29–58. Springer-Verlag, Berlin, Germany; 1995.
- Martinez-Abarca F, Herrera-Cervera JA, Bueno P, Sanjuan J, Bisseling T, Olivares J: Involvement of salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium meliloti-Alfalfa* symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 1998, 11:153-155.
- Martins A, Barroso J, Pais MS: Effect of ectomycorrhizal fungi on survival and growth of micropropagated plants and seedlings of *Castanea sativa* Mill. *Mycorrhiza* 1996, 6:265-270.
- Massicotte HB, Peterson RL, Ackerley CA, Piché Y: Structure and ontogeny of *Alnus crispa-Alpova diplophloeus* ectomycorrhizae. *Canadian Journal of Botany* 1986, 64:177-192.
- Massicotte HB, Melville LH, Molina R, Peterson RL: Structure and histochemistry of mycorrhizae synthesized between *Arbutus menziesii* (Ericaceae) and two basidiomycetes, *Pisolithus tinctorius* Pisolithaceae and *Piloderma bicolor* Corticiaceae. *Mycorrhiza* 1993, 3:1–11.
- Massicotte HB, Melville LH, Peterson RL: Scanning electron microscopy of ectomycorrhizae, potential and limitations. *Scanning Microscopy* 1987a, 1:1439-1454.
- Massicotte HB, Peterson RL, Ackerley CA, Ashford AE: Ontogeny of *Eucalyptus pilularis* – *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. II. Transmission electron microscopy. *Canadian Journal of Botany* 1987b, 65:1940-1947.
- Massicotte HB, Peterson RL, Ashford AE: Ontogeny of *Eucalyptus pilularis* – *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. I. Light microscopy and scanning electron microscopy. *Canadian Journal of Botany* 1987c, 65:1927-1939.
- Massicotte HB, Peterson RL, Melville LH: Ontogeny of *Alnus diplophloeus* ectomycorrhizae 1. Light microscopy and scanning electron microscopy. *Canadian Journal of Botany* 1989, 67:191-200.
- Massicotte HB, Peterson L, Melville LH: Hatig net structure of ectomycorrhizae synthesized between *Laccaria bicolor* (Tricholomataceae) and two hosts: *Betula alleghaniensis* (Betulaceae) and *Pinus resinosa* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 1989, 76:1654-1667.
- Massicotte HB, Peterson RL, Ackerley CA, Melville LH: Structure and ontogeny of *Betula alleghaniensis-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. *Canadian Journal of Botany* 1990, 68:579-593.
- Mauch-Mani B, Slusarenko AJ: Production of Salicylic Acid Precursors Is a Major Function of Phenylalanine Ammonia-Lyase in the Resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* 1996: 8(2):203-212.
- McConn M and Browse J: The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell* 1996, 8:403–416.
- McConn M, Creelman RA, Bell E, Mullet JE, Browse J: Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 1997, 94:5473–5477.
- McDowell JM, Dangl JL: Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochemical Sciences* 2000, 25:79–82.
- Medina MJH, Gagnon H, Piche Y, Ocampo JA, Garrido JMG, Vierheilig H: Root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi is affected by the salicylic acid content of the plant. *Plant Science* 2003, 164:993-998.

- Melotto M, Mecey C, Niu Y, Chung HS, Katsir L, Yao J, Zeng W, Thines B, Staswick P, Browse J, Howe GA, He SY: A critical role of two positively charged amino acids in the JAS motif of *Arabidopsis* JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interaction with the COII F-box protein. *Plant Journal* 2008, 55:979-988.
- Mensen R, Hager A, Salzer P: Elicitor induced changes of wall-bound and secreted peroxidase activities in suspension-cultured spruce (*Picea abies*) cells are attenuated by auxins. *Physiologia Plantarum* 1998, 102:539-546.
- Mentlak TA, Kombrink A, Shinya T, Ryder LS, Otomo I, Saitoh H, Terauchi R, Nishizawa Y, Shibuya N, Thomma BP, Talbot NJ: Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *Plant Cell* 2012, 24(1):322-335.
- Mertens J, Vervaeke P, De Schrijver A, Luysaert S: Metal uptake by young trees from dredged brackish sediment: limitations and possibilities for phytoextraction and phytostabilisation. *Science of the Total Environment* 2004, 326(1-3):209-15.
- Meuwly P, Molders W, Buchala A, Metraux JP: Local and Systemic Biosynthesis of Salicylic Acid in Infected Cucumber Plants. *Plant Physiology* 1995, 109(3):1107-1114.
- Meyer A, Pühler A, Niehaus K: The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta* 2001, 213(2):214-22.
- Meyer FH: Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forests. In *Ectomycorrhizae*. Eds GC Marks and TT Kozlowski pp. 79–105. Academic Press, New York, USA; 1973.
- Miersch O, Bohlmann H, Wasternack C: Jasmonates and related compounds from *Fusarium oxysporum*. *Phytochemistry* 1999, 50:517-523.
- Migeon A, Richaud P, Guinet F, Blaudez D, Chalot M: Hydroponic screening of poplar for trace element tolerance and accumulation. *International Journal of Phytoremediation* 2012, 14(4):350-61.
- Millet YA, Danna CH, Clay NK, Songnuan W, Simon MD, Werck-Reichhart D, Ausubel FM: Innate immune responses activated in *Arabidopsis* roots by microbe-associated molecular patterns. *Plant Cell* 2010, 22:973-990.
- Misas-Villamil JC and van der Hoorn RA: Enzyme-inhibitor interactions at the plant-pathogen interface. *Current Opinion in Plant Biology* 2008, 11:380-388.
- Mitra RM and Long SR: Plant and bacterial symbiotic mutants define three transcriptionally distinct stages in the development of the *Medicago truncatula*/*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Plant Physiology* 2004, 134:595-604.
- Miyata T, Yasunaga T: Molecular evolution of mRNA: a method for estimating evolutionary rates of synonymous and amino acid substitutions from homologous nucleotide sequences and its application. *Journal of Molecular Evolution* 1980, 16(1):23-36.
- Moffett P: Fragment complementation and co-immunoprecipitation assays for understanding R protein structure and function. *Methods in Molecular Biology* 2011, 712:9-20.
- Molina R, Massicotte H, Trappe JM: Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community ecological consequences and practical application. In *Mycorrhizal Functioning*. Ed. MF Allen pp. 357–423. Chapman and Hall, New York, USA; 1992.
- Montanini B, Viscomi AR, Bolchi A, Martin Y, Siverio JM, Balestrini R, Bonfante P, Ottonello S: Functional properties and differential mode of regulation of the nitrate transporter from a plant symbiotic ascomycete. *Biochemical Journal* 2006, 394:125-134.
- Montanini B, Levati E, Bolchi A, Kohler A, Morin E, Tisserant E, Martin F, Ottonello S: Genome-wide search and functional identification of transcription factors in the mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. *New Phytologist* 2011, 189(3):736-50.
- Moreau M, Tian M, Klessig DF: Salicylic acid binds NPR3 and NPR4 to regulate NPR1-dependent defense responses. *Cell Research* 2012, 22(12):1631-1633.
- Morin E, Kohler A, Baker AR, Foulongne-Oriol M, Lombard V, Nagy LG, Ohm RA, Patyshakuliyeva A, Brun A, Aerts AL, Bailey AM, Billette C, Coutinho PM, Deakin G, Doddapaneni H, Floudas D, Grimwood J, Hildén K, Kües U, Labutti KM, Lapidus A, Lindquist EA, Lucas SM, Murat C, Riley RW, Salamov AA, Schmutz J, Subramanian V, Wösten HA, Xu J, Eastwood DC, Foster GD, Sonnenberg AS, Cullen D, de Vries RP, Lundell T, Hibbett DS, Henrissat B, Burton KS, Kerrigan RW, Challen MP, Grigoriev IV, Martin F: Genome sequence

- of the button mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2012, 109(43):17501-17506.
- Morrison DK: The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends in Cell Biology* 2009, 19(1):16-23.
- Mosher RA, Durrant WE, Wang D, Song J, Dong X: A comprehensive structure-function analysis of *Arabidopsis* SNI1 defines essential regions and transcriptional repressor activity. *Plant Cell* 2006, 18(7):1750-1765.
- Mosquera G, Giraldo MC, Hyun Khang C, Coughlan S, Valent B (2009) Interaction transcriptome analysis identifies *Magnaporthe oryzae* BAS1-4 as biotrophy-associated secreted proteins in rice blast disease. *Plant Cell* 2009, 21:1273-1290.
- Mou Z, Fan W, Dong X: Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 2003, 113:935-944.
- Moyersoen B 2006 *Pakaraimaea dipterocarpaceae* is ectomycorrhizal, indicating an ancient Gondwanaland origin of the ectomycorrhizal habit in Dipterocarpaceae *New Phytologist* 172, 753-762.
- Mueller AN, Ziemann S, Treitschke S, Aßmann D, Doehlemann G: Compatibility in the *Ustilago maydis*-maize interaction requires inhibition of host cysteine proteases by the fungal effector Pit2. *PLoS Pathogens* 2013, 9(2):e1003177.
- Mukhtar MS, Carvunis AR, Dreze M, Epple P, Steinbrenner J, Moore J, Tasan M, Galli M, Hao T, Nishimura MT, Pevzner SJ, Donovan SE, Ghamsari L, Santhanam B, Romero V, Poulin MM, Gebreab F, Gutierrez BJ, Tam S, Monachello D, Boxem M, Harbort CJ, McDonald N, Gai L, Chen H, He Y; European Union Effectoromics Consortium, Vandenhaute J, Roth FP, Hill DE, Ecker JR, Vidal M, Beynon J, Braun P, Dangl JL: Independently evolved virulence effectors converge onto hubs in a plant immune system network. *Science* 2011, 333:596-601.
- Müller T, Avolio M, Olivi M, Benjdia M, Rikirsch E, Kasaras A, Fitz M, Chalot M, Wipf D: Nitrogen transport in the ectomycorrhiza association: the *Hebeloma cylindrosporum*-*Pinus pinaster* model. *Phytochemistry* 2007, 68:41-51.
- Munkvold KR, Martin ME, Bronstein PA, Collmer A: A survey of the *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 type III secretion system effector repertoire reveals several effectors that are deleterious when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2008, 21(4):490-502.
- Murashige M and Skoog F: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 1962, 15:473-497.
- Murtas G, Reeves PH, Fu YF, Bancroft I, Dean C, Coupland G: A nuclear protease required for flowering-time regulation in *Arabidopsis* reduces the abundance of small ubiquitin-related modifier conjugates. *Plant Cell* 2003, 15:2308-2319.
- Nachin L, Nannmark U, Nyström T: Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion, and motility. *Journal of Bacteriology* 2005, 187(18):6265-72.
- Nakata M, Mitsuda N, Herde M, Koo AJ, Moreno JE, Suzuki K, Howe GA, Ohme-Takagi M: A bHLH-type transcription factor, ABA-INDUCIBLE BHLH-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1, acts as a repressor to negatively regulate jasmonate signaling in *arabidopsis*. *Plant Cell* 2013, 25(5):1641-1656.
- Nanjo T, Futamura N, Nishiguchi M, Igasaki T, Shinozaki K, Shinohara K: Characterization of full-length enriched expressed sequence tags of stress-treated poplar leaves. *Plant and Cell Physiology* 2004, 45:1738-1748.
- Ndamukong I, Abdallat AA, Thurow C, Fode B, Zander M, Weigel R, Gatz C: SA-inducible *Arabidopsis* glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive *PDF1.2* transcription. *Plant Journal* 2007, 50:128-139.
- Nehls U, Goehringer F, Wittulsky S, Dietz S: Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review. *Plant Biology* 2010, 12:292-301.
- Nehls U, Mokolajewski S, Magel E, Hampp R: Carbohydrate metabolism in ectomycorrhizas: gene expression, monosaccharide transport and metabolic control. *New Phytologist* 2001, 150:533-541.
- Nelson BK, Cai X, Nebenführ A: A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant Journal* 2007, 51(6):1126-1136.

- Nickstadt, A. *et al.*: The jasmonate-insensitive mutant *jin1* shows increased resistance to biotrophic as well as necrotrophic pathogens. *Molecular Plant Pathology* 2004, 5:425–434.
- Niu Y, Figueroa P, Browse J: Characterization of JAZ-interacting bHLH transcription factors that regulate jasmonate responses in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 2011, 6:2143–2154.
- Nomura K, Debroy S, Lee YH, Pumplin N, Jones J, He SY: A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science* 2006, 313(5784):220-223.
- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L: Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Review* 2004, 198:249-266.
- Nygren CMR, Eberhardt U, Karlsson M, Parret JL, Lindahl BD, Taylor AFS: Growth on nitrate and occurrence of nitrate reductase-encoding genes in a phylogenetically diverse range of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 2008, 180:875-889.
- Nygren CMR, Edqvist J, Elfstrand M, Heller G, Taylor AFS: Detection of extracellular protease activity in different species and genera of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 2007, 17:241-248.
- Nylund JE: The ectomycorrhizal information zone and its relation to acid polysaccharides of cortical cell walls. *New Phytologist* 1987, 106:505-516.
- Nylund JE and Unestam T: Structure and physiology of ectomycorrhizae I. The process of mycorrhiza formation in Norway spruce *in vitro*. *New Phytologist* 1982, 91:63-79.
- Nyström T and Neidhardt FC: Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 1992, 6(21):3187-98.
- O'Connell RJ, Thon MR, Hacquard S, Amyotte SG, Kleemann J, Torres MF, Damm U, Buiate EA, Epstein L, Alkan N, Altmüller J, Alvarado-Balderrama L, Bauser CA, Becker C, Birren BW, Chen Z, Choi J, Crouch JA, Duvick JP, Farman MA, Gan P, Heiman D, Henrissat B, Howard RJ, Kabbage M, Koch C, Kracher B, Kubo Y, Law AD, Lebrun MH, Lee YH, Miyara I, Moore N, Neumann U, Nordström K, Panaccione DG, Panstruga R, Place M, Proctor RH, Prusky D, Rech G, Reinhardt R, Rollins JA, Rounsley S, Schardl CL, Schwartz DC, Shenoy N, Shirasu K, Sikhakolli UR, Stüber K, Sukno SA, Sweigard JA, Takano Y, Takahara H, Trail F, van der Does HC, Voll LM, Will I, Young S, Zeng Q, Zhang J, Zhou S, Dickman MB, Schulze-Lefert P, Ver Loren van Themaat E, Ma LJ, Vaillancourt LJ: Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics* 2012, 44(9):1060-5.
- Oldroyd GED and Downie JM: Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology* 2008, 59:519-546.
- Oldroyd GE, Harrison MJ, Paszkowski U: Reprogramming plant cells for endosymbiosis. *Science* 2009, 324:753-754.
- Oliva R, Win J, Raffaele S, Boutemy L, Bozkurt TO, Chaparro-Garcia A, Segretin ME, Stam R, Schornack S, Cano LM, van Damme M, Huitema E, Thines M, Banfield MJ, Kamoun S: Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens. *Cellular Microbiology* 2010, 12(7):1015.
- Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, Skriver K: NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in Plant Science* 2005, 10:79-87.
- Ohm RA, de Jong JF, de Bekker C, Wosten HA, Lugones LG: Transcription factor genes of *Schizophyllum commune* involved in regulation of mushroom formation. *Molecular Microbiology* 2011, 81:1433-45.
- Pallas JA, Paiva NL, Lamb C, Dixon RA: Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. *The Plant Journal* 1996, 10(2):281-293.
- Pan S, Sehnke PC, Ferl RJ, Gurley WB: Specific interactions with TBP and TFIIB *in vitro* suggest 14-3-3 proteins may participate in the regulation of transcription when part of a DNA binding complex. *Plant Cell* 1999, 11:1591-1602.
- Panstruga R: Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 2003, 6:320-326.
- Parrent JL, James TY, Vasaitis R, Taylor AFS: Friend or foe? Evolutionary history of glycoside hydrolase family 32 genes encoding for sucrolytic activity in fungi and its implications for plant-fungal symbioses. *BMC Evolutionary Biology* 2009, 9:148.

- Paschlewski R and Pachlewskia J: Studies on symbiotic properties of mycorrhizal fungi of pin (*Pinus sylvestris* L.) with the aid of the method of mycorrhizal synthesis in pure culture on agar. (Translated into English by Royal Dzieciolowski). Warsaw, Poland: Forest Research Institute; 1974.
- Pauwels L, Goossens A: The JAZ proteins : a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *Plant Cell* 2011, 23:3089-3100.
- Pauwels L, Barbero GF, Geerinck J, Tilleman S, Grunewald W, Pérez AC, Chico JM, Bossche RV, Sewell J, Gil E, García-Casado G, Witters E, Inzé D, Long JA, De Jaeger G, Solano R, Goossens A: NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signaling. *Nature* 2010, 464:788-791.
- Pauwels L, Inzé D, Goossens A: Jasmonate-inducible gene: What does it mean? *Trends in Plant Sciences* 2009, 14:87-91.
- Park CH, Chen S, Shirsekar G, Zhou B, Khang CH, Songkumarn P, Afzal AJ, Ning Y, Wang R, Bellizzi M, Valent B, Wang GL: The *Magnaporthe oryzae* effector AvrPiz-t targets the RING E3 ubiquitin ligase APIP6 to suppress pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in rice. *Plant Cell* 2012, 24(11):4748-4762.
- Pedersen C, Ver Loren van Themaat E, McGuffin LJ, Abbott JC, Burgis TA, Barton G, Bindschedler LV, Lu X, Maekawa T, Wessling R, Cramer R, Thordal-Christensen H, Panstruga R, Spanu PD : Structure and evolution of barley powdery mildew effector candidates. *BMC Genomics* 2012, 13:694.
- Peleg-Grossman S, Golani Y, Kaye Y, Melamed-Book N, Levine A: NPR1 protein regulates pathogenic and symbiotic interactions between *Rhizobium* and legumes and non-legumes. *PLoS ONE* 2009, 4:e8399.
- Penmetza RV and Cook DR: A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. *Science* 1997, 275:527-530.
- Penninckx IA, Thomma BP, Buchala A, Métraux JP, Broekaert WF: Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1998, 10:2103-2113.
- Peña-Cortés H, Albrecht T, Prat S, Weiler EW, Willmitzer L: Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta* 1993, 191:123-128.
- Pérez AG, Sanz C, Olías R, Olías JM: Effect of Methyl Jasmonate on *in Vitro* Strawberry Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997, 45(10) :3733-3737.
- Pérez A, Pedrós B, Murgui A, Casanova M, López-Ribot JL, Martínez JP : Biofilm formation by *Candida albicans* mutants for genes coding fungal proteins exhibiting the eight-cysteine-containing CFEM domain. *FEMS Yeast Research* 2006, 6(7):1074-1084.
- Perez-Moreno J, Read DJ: Nutrient transfer from soil nematodes to plants: a direct pathway provided by the mycorrhizal mycelial network. *Plant, Cell and Environment* 2001, 24:1219-1226.
- Perret X, Staehelin C, Broughton WJ: Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Review* 2000, 64:180-201
- Petersen M, Brodersen P, Naested H, Andreasson E, Lindhart U, Johansen B, Nielsen HB, Lacy M, Austin MJ, Parker JE, Sharma SB, Klessig DF, Martienssen R, Mattsson O, Jensen AB, Mundy J: *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* 2000, 103:1111-1120.
- Peterson RL: Adaptations of root structure in relation to biotic and abiotic factors. *Canadian Journal of Botany* 1992, 70:661-675.
- Peterson RL and Bonfante P: Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas. *Plant and Soil* 1994, 159:79-88.
- Peterson RL, Massicotte HB, Melville L: *Mycorrhizas: anatomy and cell biology*. NRC Research Press and CABI Publishing, Ottawa and Wallingford; 2004.
- Peterson RL, Uetake Y, Zelmer C: Fungal symbioses with orchid protocorms. *Symbiosis* 1998, 25:29-55.
- Pieterse CM, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SC: Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 2009, 5:308-316.
- Pieterse CMJ and Van Loon LC: NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 2004, 7:456-464.

- Pierschbacher MD, Ruoslahti E: Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 1984, 309(5963):30-33.
- Pirozynski CA and Malloch DW: The origin of land plants: a matter of mycotrophism. *Biosystems* 1975, 6:153–164.
- Plassard C, Dell B: Phosphorus nutrition of mycorrhizal trees. *Tree Physiology* 2010, 30(9):1129-39.
- Plassard C and Fransson P: Regulation of low-molecular weight organic acid production in fungi. *Fungal Biology Reviews* 2009, 23:30-39.
- Plassard C, Louche J, Ali MA, Duchemin M, Legname E, Cloutier-Hurteau B: Diversity in phosphorous mobilization and uptake in ectomycorrhizal fungi. *Annals of Forest Science* 2011, 68:33-43.
- Plett JM, Kemppainen M, Kale SD, Kohler A, Legué V, Brun A, Tyler BM, Pardo AG, Martin F: A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Current Biology* 2011, 21:1197-1203.
- Plett JM, Martin F: Blurred boundaries: lifestyle lessons from ectomycorrhizal fungal genomes. *Trends in Genetics* 2011, 27(1):14-22.
- Plett JM, Martin F: Poplar root exudates contain compounds that induce the expression of MiSSP7 in *Laccaria bicolor*. *Plant Signaling and Behavior* 2012, 7(1):12-5.
- Plett JM, Martin F: Mutualistic Effectors: Architects of symbiosis. In *Effector in Plant-Microbe Interactions*, First Edition. Edited by Martin F and Kamoun S. Wiley-Blackwell; 2012:295-326.
- Plett JM, Montanini B, Kohler A, Ottonello S, Martin F: Tapping genomics to unravel ectomycorrhizal symbiosis. *Methods in Molecular Biology* 2011, 722:249-281.
- Plett JM, Gibon J, Kohler A, Duffy K, Hoegger PJ, Velagapudi R, Han J, Kües U, Grigoriev IV, Martin F: Phylogenetic, genomic organization and expression analysis of hydrophobin genes in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Fungal Genetics and Biology* 2012, 49:199-209.
- Polidori E, Ceccaroli P, Saltarelli R, Guescini M, Menotta M, Agostini D, Palma F, Stocchi V: Hexose uptake in the plant symbiotic ascomycete *Tuber borchii* Vittadini: biochemical features and expression pattern of the transporter TBHXT1. *Fungal Genetics and Biology* 2007, 44:187-198.
- Potuschak T, Lechner E, Parmentier Y, Yanagisawa S, Grava S, Koncz C, Genschik P: EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signalling by two *Arabidopsis* F box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell* 2003, 115:679–689.
- Pré M, Atallah M, Champion A, De Vos M, Pieterse CM, Memelink J: The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiology* 2008, 147:1347–1357.
- Qi T, Song S, Ren Q, Wu D, Huang H, Chen Y, Fan M, Peng W, Ren C, Xie D: The jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-repeat/bHLH/MYB complexes to regulate jasomate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2011, 23:1795-1814.
- Rabe F, Ajami-Rashidi Z, Doehlemann G, Kahmann R, Djamei A: Degradation of the plant defence hormone salicylic acid by the biotrophic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology* 2013, 89(1):179-88.
- Raes J, Rohde A, Christensen JH, Van de Peer Y, Boerjan W: Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 2003, 133(3):1051-71.
- Raffaele S, Win J, Cano LM, Kamoun S: Analyses of genome architecture and gene expression reveal novel candidate virulence factors in the secretome of *Phytophthora infestans*. *BMC Genomics* 2010, 11:637.
- Rafiqi M, Ellis JG, Ludowici VA, Harham AR, Dodds PN : Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions. *Current opinion in plant biology* 2012, 15(4):477-482.
- Rafiqi M, Gan PH, Ravensdale M, Lawrence GJ, Ellis JG, Jones DA, Hardham AR, Dodds PN: Internalization of flax rust avirulence proteins into flax and tobacco cells can occur in the absence of the pathogen. *Plant Cell* 2010, 22:2017-2032.
- Ramos AC, Lima PT, Dias PN, Kasuya MC, Feijó JA: A pH signaling mechanism involved in the spatial distribution of calcium and anion fluxes in ectomycorrhizal roots. *New Phytologist* 2009, 181:448-462.

- Rangel-Castro JI, Danell E, Taylor AFS: Use of different nitrogen sources by the edible ectomycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius*. *Mycorrhiza* 2002, 12:131-137.
- Rate DN and Greenberg JT: The *Arabidopsis* aberrant growth and death2 mutant shows resistance to *Pseudomonas syringae* and reveals a role for NPR1 in suppressing hypersensitive cell death. *Plant Journal* 2001, 27:203-211.
- Rayle DL and Cleland RE: The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology* 1992, 99:1271-1274.
- Read DJ and Perez-Moreno J: Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? *New Phytologist* 2003, 157:475-492.
- Redecker D, Kodner R, Graham LE: Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 2000, 289:1920-1921.
- Reddy SM, Hitchin S, Melayah D, Pandey AK, Raffier C, Henderson J, Marmeisse R, Gay G: The auxin-inducible GH3 homologue Pp-GH3.16 is downregulated in *Pinus pinaster* root systems on ectomycorrhizal symbiosis establishment. *New Phytologist* 2006, 170:391-400.
- Regvar M, Gogala N, Zalar P: Effects of jasmonic acid on mycorrhizal *Allium sativum*. *New Phytologist* 1996, 134(4):703-707.
- Regvar M, Gogala N, Znidarsic N: Jasmonic acid affects mycorrhization of spruce seedlings with *Laccaria laccata*. *Trees* 1997, 11:511-514.
- Ren YY and West CA: Elicitation of diterpene biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by chitin. *Plant Physiology* 1992, 99:1169-1178.
- Rennenberg H: The significance of ectomycorrhizal fungi for sulfur nutrition of trees. *Plant and Soil* 1999, 215:115-122.
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE: Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2000, 12:707-720.
- Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D: Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 2001, 57(6):929-67.
- Ridout CJ, Skamnioti P, Porritt O, Sacristan S, Jones JDG, Brown JKM: Multiple avirulence paralogues in cereal powdery mildew fungi may contribute to parasite fitness and defeat of plant resistance. *Plant Cell* 2006, 18:2402-2414.
- Rincon A, Gerard J, Dexheimer J, Le Tacon F: Effect of an auxin transport inhibitor on aggregation and attachment processes during ectomycorrhiza formation between *Laccaria bicolor* S238N and *Picea abies*. *Canadian Journal of Botany* 2001, 79:1152-1160.
- Rincon A, Priha O, Sotta B, Bonnet M, Le Tacon F: Comparative effects of auxin transport inhibitors on rhizogenesis and mycorrhizal establishment of spruce seedlings inoculated with *Laccaria bicolor*. *Tree Physiology* 2003, 23:785-791
- Robatzek S, Chinchilla D, Boller T: Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 2006, 20:537-542.
- Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JD: Hormone crosstalk in plant disease and defense: More than just JASMONATE-SALICYLATE antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 2011, 49:317-343.
- Roberts MR: 14-3-3 proteins find new partners in plant cell signalling. *Trends in Plant Science* 2003, 8(5):218-223.
- Roberts MR, Bowles DJ: Fusicoccin, 14-3-3 proteins, and defense responses in tomato plants. *Plant Physiology* 1999, 119(4):1243-50.
- Roberts MR, Salinas J, Collinge DB: 14-3-3 proteins and the response to abiotic and biotic stress. *Plant Molecular Biology* 2002, 50(6):1031-9.
- Robertson DC and Robertson JA: Ultrastructure of *Pterospora andromedea* Nuttall and *Sarcodes sanguinea* Torrey mycorrhizas. *New Phytologist* 1982, 92:539-551.
- Robinson BH, Mills TM, Petit D, Fung LE, Green SR, Clothier BE: Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: Implications for phytoremediation. *Plant and Soil* 2000, 227, 301-306.

- Rohde A, Morreel K, Ralph J, Goeminne G, Hostyn V, De Rycke R, Kushnir S, Van Doorselaere J, Joseleau JP, Vuylsteke M, Van Driessche G, Van Beeumen J, Messens E, Boerjan W: Molecular phenotyping of the *pal1* and *pal2* mutants of *Arabidopsis thaliana* reveals far-reaching consequences on phenylpropanoid, amino acid, and carbohydrate metabolism. *Plant Cell* 2004, 16(10):2749-71.
- Römer P, Hahn S, Jordan T, Strauss T, Bonas U, Lahaye T: Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper *Bs3* resistance gene. *Science* 2007, 318:645-648.
- Rooney HC, Van't Klooster JW, van der Hoorn RA, Joosten MH, Jones JD, de Wit PJ: *Cladosporium* Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science* 2005, 308:1783-1786.
- Rose JK, Ham KS, Darvill AG, Albersheim P: Molecular cloning and characterization of glucanase inhibitor proteins: Coevolution of a counterdefense mechanism by plant pathogens. *Plant Cell* 2002, 14:1329-1345.
- Rosebrock TR, Zeng L, Brady JJ, Abramovitch RB, Xiao F, Martin GB: A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. *Nature* 2007, 448:370-374.
- Rosso MN, Hussey RS, Davis EL, Smant G, Baum TJ, Abad P, Mitchum MG: Nematode Effector Proteins: Targets and Functions in Plant Parasitism. In *Effector in Plant-Microbe Interactions*, First Edition. Edited by Martin F and Kamoun S. Wiley-Blackwell; 2012:327-354.
- Rubin EM: Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 2008, 454:841-845.
- Rupp LA, DeVries HE, Mudge KW: Effect of aminocyclopropane carboxylic acid and aminoethoxyvinylglycine on ethylene production by ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany* 1989, 67:483-485.
- Ruoslahti E: RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 1996, 12:697-715.
- Salomon D, Sessa G: Identification of growth inhibition phenotypes induced by expression of bacterial type III effectors in yeast. *Journal of Visualized Experiments* 2010, (37). pii:1865.
- Salzer P and Hager A: Characterization of wall-bound invertase isoforms of picea-abies cells and regulation by ectomycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum* 1993a, 88:52-59.
- Salzer P and Hager A: Effect of auxins and ectomycorrhizal elicitors on wall-bound proteins and enzymes of spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] cells. *Trees* 1993b, 8:49-55.
- Salzer P, Hebe G, Reith A, Zitterell-Haid B, Stransky H, Gashchler K, Hager A: Rapid reactions of spruce cells to elicitors released from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme*, and inactivation of these elicitors by extracellular spruce cell enzymes. *Planta* 1996, 198:118-126.
- Salzer P, Hübner B, Sirrenberg A, Hager A: Differential effect of purified spruce chitinases and β -1,3-glucanases on the activity of elicitors from ectomycorrhizal fungi. *Plant Physiology* 1997, 114:957-968.
- Saracco SA, Hansson M, Scalf M, Walker JM, Smith LM, Vierstra RD: Tandem affinity purification and mass spectrometric analysis of ubiquitylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 2009, 59:344-358.
- Sarma GN, Manning VA, Ciuffetti LM, Karplus PA: Structure of Ptr ToxA: An RGD-containing host-selective toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant Cell* 2005, 17:3190-3202.
- Sasaki-Sekimoto Y, Jikumaru Y, Obayashi T, Saito H, Masuda S, Kamiya Y, Ohta H, Shirasu K: Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1), JAM2, and JAM3 Are Negative Regulators of Jasmonate Responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 2013, 163(1):291-304.
- Sauter M and Hager A: The mycorrhizal fungus *Amanita muscaria* induces chitinase activity in roots and in suspensioncultured cells of its host *Picea abies*. *Planta* 1989, 179:61-66.
- Sauter M, Rzewuski G, Marwedel T, Lorbiecke R: The novel ethylene-regulated gene OsUsp1 from rice encodes a member of a plant protein family related to prokaryotic universal stress proteins. *Journal of Experimental Botany* 2002, 53:2325-2331.
- Scales P and Peterson RL: Structure and development of *Pinus banksiana*-*Wilcoxina* ectendomycorrhizae. *Canadian Journal of Botany* 1991, 69:2135-2148.
- Schaeffer C, Johann P, Nehls U, Hampp R: Evidence for an up-regulation of the host and a down-regulation of the fungal phosphofructokinase activity in ectomycorrhizas of Norway spruce and fly agaric. *New Phytologist* 1996, 134:697-702.

- Schaller A and Stintzi A: Enzymes in jasmonate biosynthesis—structure, function, regulation. *Phytochemistry* 2009, 7:1532–1538.
- Schornack S, Meyer A, Römer P, Jordan T, Lahaye T: Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. *Journal of Plant Physiology* 2006, 163(3):256-272.
- Schornack S, van Damme M, O. Bozkurt T, Cano LM, Smoker M, Thines M, Gaulin E, Kamoun S, Huitema E: Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2010, .
- Schulze S, Kay S, Büttner D, Egler M, Eschen-Lippold L, Hause G, Krüger A, Lee J, Müller O, Scheel D, Szczesny R, Thieme F, Bonas U : Analysis of new type III effectors from *Xanthomonas* uncovers XopB and XopS as suppressors of plant immunity. *New Phytologist* 2012, 195(4):894-911.
- Schwacke R and Hager A: Fungal elicitors induce a transient release of active oxygen species from cultured spruce cells depending on Ca²⁺ and protein kinase activity. *Planta* 1992, 187:136-141.
- Sebastiani M, Figueiredo A, Acioli B, Sousa L, Pessoa F, Balde A, Pais MS: Identification of plant genes involved on the initial contact between ectomycorrhizal symbionts (*Castanea sativa*-European chestnut and *Pisolithus tinctorius*). *European Journal of Soil Biology* 2009, 45:275-282.
- Sebastiani, L. , Scebbba, F., Tognetti, R.: Heavy metal accumulation and growth responses in poplar clones Eridano (*Populus deltoides x maximowiczii*) and I-214 (*P. x euramericana*) exposed to industrial waste. *Environmental and Experimental Botany* 2004, 52:79-88.
- Seehaus K and Tenhaken R: Cloning of genes by mRNA differential display induced during the hypersensitive reaction of soybean after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. glycinea. *Plant Molecular Biology* 1998, 38(6):1225-1234.
- Sehnke PC, DeLille JM, Ferl RJ: Consummating signal transduction: the role of 14-3-3 proteins in the completion of signal-induced transitions in protein activity. *Plant Cell* 2002, 14 Suppl:S339-354.
- Selosse MA, Costa G, Battista CD, Tacon FL, Martin F: Meiotic segregation and recombination of the intergenic spacer of the ribosomal DNA in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Current Genetics* 1996, 30(4):332-7.
- Selosse MA and Le Tacon F : The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology and Evolution* 1998, 13:15-20.
- Shabab M, Shindo T, Gu C, Kaschani F, Pansuriya T, Chintha R, Harzen A, Colby T, Kamoun S, van der Hoorn RA: Fungal effector protein AVR2 targets diversifying defenselated cys proteases of tomato. *Plant Cell* 2008, 20:1169-1183
- Shao F and Dixon JE: YopT is a cysteine protease cleaving Rho family GTPases. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2003, 529:79-84
- Sharp JK, McNeil M, Albersheim P: The primary structures of one elicitor-active and seven elicitor-inactive hexa(beta-D-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* f. sp. glycinea. *Journal of Biological Chemistry* 1984a, 259:11321-11336
- Sharp JK, Valent B, Albersheim P: Purification and partial characterization of a betaglucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *Journal of Biological Chemistry* 1984b, 259:11312-11320
- Sheard LB, Tan X, Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu FF, Sharon M, Browse J, He SY, Rizo J, Howe GA, Zheng N: Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* 2010, 468:400–405.
- Shi Y and Shi Y: Metabolic enzymes and coenzymes in transcription—a direct link between metabolism and transcription? *Trends in Genetics* 2004, 20:445-452.
- Shiu SH and Bleecker AB: Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 2003, 132(2):530-43.
- Simon L, Bousquet J, Lévesque RC, Lalonde M: Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 1993, 363:67–69.
- Slagowski NL, Kramer RW, Morrison MF, LaBaer J, Lesser CF: A functional genomic yeast screen to identify pathogenic bacterial proteins. *PLoS Pathogens* 2008, 4(1):e9.

- Smith AJ, Daut J, Schwappach B: Membrane proteins as 14-3-3 clients in functional regulation and intracellular transport. *Physiology* 2011, 26:181-191.
- Smith SE and Read DJ. In *Mycorrhizal Symbiosis*. 2nd edition. London, UK: Academic Press; 1997.
- Smith SE, Read DJ. In *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd edition. London, UK: Academic Press; 2008.
- Soellick TR, Uhrig JF: Development of an optimized interaction-mating protocol for large-scale yeast two-hybrid analyses. *Genome Biology* 2001, 2(12):RESEARCH0052.
- Song J, Win J, Tian M, Schornack S, Kaschani F, Ilyas M, van der Hoorn RAL, Kamoun S: Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2009, 106: 1654-1659.
- Song S, Qi T, Huang H, Ren Q, Wu D, Chang C, Peng W, Liu Y, Peng J, Xie D: The Jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect Jasmonate-regulated stamen development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2011, 23:1000-1013.
- Sopko R, Raithatha S, Stuart D. Phosphorylation and maximal activity of *Saccharomyces cerevisiae* meiosis-specific transcription factor Ndt80 is dependent on Ime2. *Mol Cell Biol*. 2002 Oct;22(20):7024-40
- Sorgo AG, Brul S, de Koster CG, de Koning LJ, Klis FM: Iron restriction-induced adaptations in the wall proteome of *Candida albicans*. *Microbiology* 2013.
- Specht RL: Heathlands and related shrublands of the world. In *Ecosystems of the World. Heathlands and Related Shrublands. Descriptive Studies*. Ed RL Specht pp. 1-18. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands; 1979.
- Splivallo R, Fischer U, Gobel C, Feussner I, Karlovsky P: Truffles Regulate Plant Root Morphogenesis via the Production of Auxin and Ethylene. *Plant Physiology* 2009, 150:2018-2029.
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SM, Korzelijs JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux JP, Brown R, Kazan K, Van Loon LC, Dong X, Pieterse CM: NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 2003, 15:760-770.
- Stacey G, McAlvin CB, Kim SY, Olivares J, Soto MJ: Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 2006, 141:1473-1481.
- Stajich JE, Wilke SK, Ahrén D, Au CH, Birren BW, Borodovsky M, Burns C, Canbäck B, Casselton LA, Cheng CK, Deng J, Dietrich FS, Fargo DC, Farman ML, Gathman AC, Goldberg J, Guigó R, Hoegger PJ, Hooker JB, Huggins A, James TY, Kamada T, Kilaru S, Kodira C, Kües U, Kupfer D, Kwan HS, Lomsadze A, Li W, Lilly WW, Ma LJ, Mackey AJ, Manning G, Martin F, Muraguchi H, Natvig DO, Palmerini H, Ramesh MA, Rehmeyer CJ, Roe BA, Shenoy N, Stanke M, Ter-Hovhannisyann V, Tunlid A, Velagapudi R, Vision TJ, Zeng Q, Zolan ME, Pukkila PJ: Insights into evolution of multicellular fungi from the assembled chromosomes of the mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2010, 107:11889-11894.
- Stark JM, Hart SC: High rates of nitrification and nitrate turnover in undisturbed coniferous forests. *Nature* 1997, 385:61-64.
- Staswick PE, Su W, Howell SH: Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 1992, 89:6837-6840.
- Stegmaier P, Kel AE, Wingender E: Systematic DNA-binding domain classification of transcription factors. *Genome Informatics* 2004, 15:276-286.
- Stergiopoulos I and de Wit PJ: Fungal effector proteins. *Annual Review of Phytopathology* 2009, 47:233-263.
- Stintzi A, Browse J: The *Arabidopsis* male-sterile mutant, opr3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2000, 97:10625-10630.
- Stracke R, Werber M, Weisshaar B: The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology* 2001, 4:447-456.
- Stumpe M, Carsjens JG, Stenzel I, Göbel C, Lang I, Pawlowski K, Hause B, Feussner I: Lipid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* 2005, 66:781-791.

- Sukumar P, Legué V, Vayssières A, Martin F, Tuskan GA, Kalluri UC: Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant-microorganism interactions. *Plant Cell and Environment* 2013, 36(5):909-19.
- Sun J, Xu Y, Ye S, Jiang H, Chen Q, Liu F, Zhou W, Chen R, Li X, Tietz O, Wu X, Cohen JD, Palme K, Li C: *Arabidopsis* ASA1 is important for jasmonate-mediated regulation of auxin biosynthesis and transport during lateral root formation. *Plant Cell* 2009, 21:1495-1511.
- Szurek B, Marois E, Bonas U, Van den Ackerveken G: Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant Journal* 2001, 26(5):523-34.
- Szurek B, Rossier O, Hause G, Bonas U: Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Molecular Microbiology* 2002, 46:13-23.
- Takemoto D and Jones DA: Membrane release and destabilization of *Arabidopsis* RIN4 following cleavage by *Pseudomonas syringae* AvrRpt2. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 2005, 18:1258-1268.
- Tagu D and Martin F: Molecular analysis of cell wall proteins expressed during early steps of ectomycorrhizal development. *New Phytologist* 1996, 133:73-85.
- Tagu D, Nasse B, Martin F: Cloning and characterization of hydrophobins-encoding cDNAs from the ectomycorrhizal Basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Gene* 1996, 168:93-97.
- Talbot NJ, Ebbole DJ, Hamer JE: Identification and characterization of MPG1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 1993, 5(11):1575-1590.
- Talbot NJ, Kershaw MJ, Wakley GE, De Vries O, Wessels J, Hamer JE: MPG1 Encodes a Fungal Hydrophobin Involved in Surface Interactions during Infection-Related Development of *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 1996, 8(6):985-999.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 2011, 28(10):2731-9.
- Tatry MV, El Kassis E, Lambilliotte R, Corratgé C, van Aarle I, Amenc LK, Alary R, Zimmermann S, Sentenac H, Plassard C: Two differentially regulated phosphate transporters from the symbiotic fungus *Hebeloma cylindrosporum* and phosphorus acquisition by ectomycorrhizal *Pinus pinaster*. *Plant Journal* 2009, 57:1092-1102.
- Taylor G: *Populus/ Arabidopsis* for forestry. Do we need a model tree? *Annals of Botany* 2002, 90:681-689.
- Taylor G: Linking physiology, molecular genetics and genomics in *Populus* to understand and improve yield and quality for biomass and timber production in Europe. In: Final Report of the POPYOMICS European Project. (QLK5-CT-2002-00953) European Commission; 2007.
- Tian M, Benedetti B, Kamoun S: A second Kazal-like protease inhibitor from *Phytophthora infestans* inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69B of tomato. *Plant Physiology* 2005, 138:1785-1793.
- Tian M, Huitema E, Da Cunha L, Torto-Alalibo T, Kamoun S: A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. *Journal of Biological Chemistry* 2004, 279:26370-26377.
- Tian M and Kamoun S: A two disulfide bridge Kazal domain from *Phytophthora* exhibits stable inhibitory activity against serine proteases of the subtilisin family. *BMC Biochemistry* 2005, 6:15.
- Tian M, Win J, Song J, van der Hoorn R, van der Knaap E, Kamoun S: A *Phytophthora infestans* cystatin-like protein targets a novel tomato papain-like apoplastic protease. *Plant physiology* 2007, 143:364-377.
- Tibbett M and Sanders FE: Ectomycorrhizal symbiosis can enhance plant nutrition through improved access to discrete organic nutrient patches of high resource quality. *Annals of Botany* 2002, 89:783-789.
- Tisserant E, Kohler A, Dozolme-Seddas P, Balestrini R, Benabdellah K, Colard A, Croll D, Da Silva C, Gomez SK, Koul R, Ferrol N, Fiorilli V, Formey D, Franken P, Helber N, Hijri M, Lanfranco L, Lindquist E, Liu Y, Malbreil M, Morin E, Poulain J, Shapiro H, van Tuinen D, Waschke A, Azcón-Aguilar C, Bécard G, Bonfante P, Harrison MJ, Küster H, Lammers P, Paszkowski U, Requena N, Rensing SA, Roux C, Sanders IR, Shachar-Hill Y, Tuskan G, Young JP, Gianinazzi-Pearson V, Martin F: The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal

- fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New phytologist* 2012, 193(3):755-769.
- Titz B, Thomas S, Rajagopala SV, Chiba T, Ito T, Uetz P: Transcriptional activators in yeast. *Nucleic Acids Research* 2006, 34:955-967.
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J: JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COII} complex during jasmonate signaling. *Nature* 2007, 448:691-666.
- Thole JM, Nielsen E: Phosphoinositides in plants: novel functions in membrane trafficking. *Current Opinion in Plant Biology* 2008, 11(6):620-31.
- Thomma BPHJ, Tierens KFM, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B, Broekaert WF, Cammue BPA: Different micro-organisms differentially induce *Arabidopsis* disease response pathways. *Plant Physiology and Biochemistry* 2001, 39:673-680.
- Thomma BP, Eggermont K, Penninckx IA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BP, Broekaert WF: Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* 1998, 95:15107-15111.
- Thomma BPHJ, Eggermont K, Broekaert WF, Cammue BPA: Disease development of several fungi on *Arabidopsis* can be reduced by treatment with methyl jasmonate. *Plant Physiology and Biochemistry* 2000, 38(5):421-427.
- Torres MA, Jones JD, Dangl JL: Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* 2005, 37(10):1130-1134.
- Trépanier M, Bécard G, Moutoglis P, Willemot C, Gagné S, Tyler AS, Rioux JA: Dependence of arbuscular-mycorrhizal fungi on their plant host for palmitic acid synthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 2005, 71:5341-5347.
- Tripathi G, Wiltshire C, Macaskill S, Tournu H, Budge S, Brown AJP: Gcn4 co-ordinates morphogenetic and metabolic responses to amino acid starvation in *Candida albicans*. *The EMBO Journal* 2002, 21(20):5448-5456.
- Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, Schein J, Sterck L, Aerts A, Bhalerao RR, Bhalerao RP, Blaudez D, Boerjan W, Brun A, Brunner A, Busov V, Campbell M, Carlson J, Chalot M, Chapman J, Chen GL, Cooper D, Coutinho PM, Couturier J, Covert S, Cronk Q, Cunningham R, Davis J, Degroeve S, Déjardin A, Depamphilis C, Detter J, Dirks B, Dubchak I, Duplessis S, Ehlting J, Ellis B, Gendler K, Goodstein D, Gribskov M, Grimwood J, Groover A, Gunter L, Hamberger B, Heinze B, Helariutta Y, Henrissat B, Holligan D, Holt R, Huang W, Islam-Faridi N, Jones S, Jones-Rhoades M, Jorgensen R, Joshi C, Kangasjärvi J, Karlsson J, Kelleher C, Kirkpatrick R, Kirst M, Kohler A, Kalluri U, Larimer F, Leebens-Mack J, Leplé JC, Locascio P, Lou Y, Lucas S, Martin F, Montanini B, Napoli C, Nelson DR, Nelson C, Nieminen K, Nilsson O, Pereda V, Peter G, Philippe R, Pilate G, Poliakov A, Razumovskaya J, Richardson P, Rinaldi C, Ritland K, Rouzé P, Ryaboy D, Schmutz J, Schrader J, Segerman B, Shin H, Siddiqui A, Sterky F, Terry A, Tsai CJ, Uberbacher E, Unneberg P, Vahala J, Wall K, Wessler S, Yang G, Yin T, Douglas C, Marra M, Sandberg G, Van de Peer Y, Rokhsar D: The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 2006, 313(5793):1596-604.
- Tuori RP, Wolpert TJ, Ciuffetti LM: Heterologous expression of functional Ptr ToxA. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2000, 13:456-464.
- Tyler BM, Kale SD, Wang Q, Tao K, Clark HR, Drews K, Antignani V, Rumore A, Hayes T, Plett JM, Fudal I, Gu B, Chen Q, Affeldt KJ, Berthier E, Fischer GJ, Dou D, Shan W, Keller NP, Martin F, Rouxel T, Lawrence CB: Microbe-independent entry of oomycete RxLR effectors and fungal RxLR-like effectors into plant and animal cells is specific and reproducible. *Molecular Plant Microbe Interactions* 2013, 26(6):611-6.
- Tyler BM, Tripathy S, Zhang X, Dehal P, Jiang RH, Aerts A, Arredondo FD, Baxter L, Bensasson D, Beynon JL, Chapman J, Damasceno CM, Dorrance AE, Dou D, Dickerman AW, Dubchak IL, Garbelotto M, Gijzen M, Gordon SG, Govers F, Grunwald NJ, Huang W, Ivors KL, Jones RW, Kamoun S, Krampis K, Lamour KH, Lee MK, McDonald WH, Medina M, Meijer HJ, Nordberg EK, Maclean DJ, Ospina-Giraldo MD, Morris PF, Phuntumart V, Putnam NH, Rash S, Rose JK, Sakihama Y, Salamov AA, Savidor A, Scheuring CF, Smith BM, Sobral BW, Terry A, Torto-Alalibo TA, Win J, Xu Z, Zhang H, Grigoriev IV, Rokhsar DS, Boore JL: *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* 2006, 313:1261-1266.

- Underwood W, Zhang S, He SY: The *Pseudomonas syringae* type III effector tyrosine phosphatase HopAO1 suppresses innate immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 2007, 52:658-672.
- Van Bergen En Henegouwen, P.M. (2009) Eps15: a multifunctional adaptor protein regulating intracellular trafficking. *Cell communication and signaling : CCS*, 7, 24.
- Van den Burg HA, Harrison SJ, Joosten MH, Vervoort J, de Wit PJ: *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 2006, 19:1420-1430
- Van den Burg HA, Westerink N, Francoijs KJ, Roth R, Woestenenk E, Boeren S, de Wit PJ, Joosten MH and Vervoort J: Natural disulfide bond-disrupted mutants of AVR4 of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are sensitive to proteolysis, circumvent Cf-4-mediated resistance, but retain their chitin binding ability. *The Journal of Biological Chemistry* 2003, 278:27340-27346.
- Van den Hooven HW, van den Burg HA, Vossen P, Boeren S, de Wit PJ, Vervoort J: Disulfide bond structure of the AVR9 elicitor of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*: evidence for a cystine knot. *Biochemistry* 2001, 40:3458-3466.
- Van der Ent S, Van Wees SCM, Pieterse CMJ: Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry* 2009, 70:1581-1588.
- Van der Hoorn RAL and Kamoun S: From guard to decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell* 2008, 20:2009-2017.
- Van der Merwe MM, Kinnear MW, Barrett LG, Dodds PN, Ericson L, Thrall PH, Burdon JJ: Positive selection in *AvrP4* avirulence gene homologues across the genus *Melampsora*. *Proceedings of the Royal Society B* 2009, 276:2913-2922.
- Van Esse HP, Van't Klooster JW, Bolton MD, Yadeta KA, van Baarlen P, Boeren S, Vervoort J, de Wit PJ, Thomma BP: The *Cladosporium fulvum* virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. *Plant Cell* 2008, 20:1948-1963.
- Van Loon LC, Geraats BP, Linthorst HJ: Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science* 2006, 11:184-191.
- Van Spronsen PC, Tak T, Rood AM, van Brussel AA, Kijne JW, Boot KJ: Salicylic acid inhibits indeterminate-type nodulation but not determinate-type nodulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2003, 16:83-91.
- Van't Slot KA, Van den Burg HA, Kloks CP, Hilbers CW, Knogge W, Papavoine CH: Solution structure of the plant disease resistance-triggering protein NIP1 from the fungus *Rhynchosporium secalis*. *The Journal of Biological Chemistry* 2005, 278:45730-45736.
- Van Wees SC, Van der Ent S, Pieterse CM: Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology* 2008, 11:443-448.
- Penmetsa RV, Uribe P, Anderson J, Lichtenzveig J, Gish JC, Nam YW, Engstrom E, Xu K, Sckisel G, Pereira M, Baek JM, Lopez-Meyer M, Long SR, Harrison MJ, Singh KB, Kiss GB, Cook DR: The *Medicago truncatula* ortholog of *Arabidopsis* EIN2, sickle, is a negative regulator of symbiotic and pathogenic microbial associations. *Plant Journal* 2008, 55:580-595.
- Vasse J, Debilly F, Truchet G: Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti-alfalfa* symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *Plant Journal* 1993, 4:555-566.
- Vecchi, M., Polo, S., Poupon, V., van de Loo, J.W., Benmerah, a. and Di Fiore, P.P. (2001) Nucleocytoplasmic shuttling of endocytic proteins. *The Journal of cell biology*, 153, 1511-1517.
- Veneault-Fourrey C and Martin F: Mutualistic interactions on a knife-edge between saprotrophy and pathogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* 2011, 14:444-450.
- Veneault-Fourrey C, Plett J, Martin F: Who is Controlling whom within the Ectomycorrhizal Symbiosis: Insights from Genomic and Functional Analyses. *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere: Volume 1 & 2*; 2013.
- Verberne MC, Hoekstra J, Bol JF, Linthorst HJ: Signaling of systemic acquired resistance in tobacco depends on ethylene perception. *Plant Journal* 2003, 35:27-32.
- Vervoort J, van den Hooven HW, Berg A, Vossen P, Vogelsang R, Joosten MH, de Wit PJGM: The race-specific elicitor AVR9 of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*: a cystine knot protein. Sequence-specific ¹H NMR assignments, secondary structure and global fold of the protein. *FEBS Letters* 1997, 404:153-158.

- Villeneuve N, Le Tacon F, Bouchard D: Survival of inoculated *Laccaria bicolor* in competition with native ectomycorrhizal fungi and effects on the growth of outplanted Douglas fir seedlings. *Plant and soil* 1991, 135(1):95-107.
- Von Dahl CC and Baldwin IT: Deciphering the role of ethylene in plant-herbivore interactions. *Journal of Plant Growth Regulation* 2007, 26:201–209.
- Walhout AJ, Vidal M: High-throughput yeast two-hybrid assays for large-scale protein interaction mapping. *Methods* 2001, 24:297-306.
- Wallenda T, Read DJ: Kinetics of amino acid uptake by ectomycorrhizal roots. *Plant Cell and Environment* 1999, 22:179-187.
- Wang B and Qiu Y-L: Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizae in land plants. *Mycorrhiza* 2006, 16:299–636.
- Wang D, Griffiths J, Starker C, Fedorova E, Limpens E, Ivanov S, Bisseling T, Long S: A Nodule-Specific Protein Secretory Pathway Required for Nitrogen-Fixing Symbiosis. *Science* 2010, 327:1126-1129.
- Wang J, Wang B, Zhao H, Li B: Preliminary study on phytoalexin induction in cucumber. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2005, 43(3-4):203-207.
- Wang KL, Li H, Ecker JR: Ethylene biosynthesis and signalling networks. *PlantCell* 2002, 14(Suppl.),S131–S151.
- Wang Y, Zhang X, Zhang H, Lu Y, Huang H, Dong X, Chen J, Dong J, Yang X, Hang H, Jiang T. Coiled-coil networking shapes cell molecular machinery. *Mol Biol Cell*. 2012 Oct;23(19):3911-22.
- Wang W, Esch JJ, Shiu SH, Agula H, Binder BM, Chang C, Patterson SE, Bleecker AB: Identification of important regions for ethylene binding and signalling in the transmembrane domain of the ETR1 ethylene receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2006, 18:3429–3442.
- Wasternack C: Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* 2007, 100:681-697.
- Weiler EW, Kutchan TM, Gorba T, Brodschelm W, Niesel U, Bublitz F: The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signaling molecules in higher plants. *FEBS Letters* 1994, 345:9-13.
- Weiss H, Friedrich T, Hofhaus G, Preis D: The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *European Journal of Biochemistry* 1991, 197(3):563-576.
- Wessels JGH: Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Annual Reviews in phytopathology* 1994, 32:413-437.
- Whisson SC, Boevink PC, Moleleki L, Avrova AO, Morales JG, Gilroy EM, Armstrong MR, Grouffaud S, van West P, Chapman S, Hein I, Toth IK, Pritchard L, Birch PR: A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* 2007, 450:115-118.
- Wicker T, Oberhaensli S, Parlange F, Buchmann JP, Shatalina M, Roffler S, Ben-David R, Doležel J, Simková H, Schulze-Lefert P, Spanu PD, Bruggmann R, Amselem J, Quesneville H, Ver Loren van Themaat E, Paape T, Shimizu KK, Keller B: The wheat powdery mildew genome shows the unique evolution of an obligate biotroph. *Nature Genetics* 2013, 45(9):1092-1096.
- Wiese J, Kleber R, Hampp R, Nehls U: Functional characterization of the *Amanita muscaria* monosaccharide transporter AmMst1. *Plant Biology* 2000, 2:1-5.
- Wilcox HE: In *Plant roots: the Hidden Half*. Edited by Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U. Marcel Dekker. New-York, USA: *Mycorrhizae*; 1991, 731-765.
- Wildermuth MC: Variations on a theme: synthesis and modification of plant benzoic acids. *Current Opinion in Plant Biology* 2006, 9:288–296.
- Wilson RA, Calvo AM, Chang P-K, Keller NP: Characterization of the *Aspergillus parasiticus* DELTA12-desaturase gene: a role for lipid metabolism in the *Aspergillus*-seed interaction. *Microbiology* 2004, 150:2881-2888.
- Win J, Chaparro-Garcia A, Belhaj K, Saunders DG, Yoshida K, Dong S, Schornack S, Zipfel C, Robatzek S, Hogenhout SA, Kamoun S: Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 2012, 77:235-47.

- Win J, Morgan W, Bos J, Krasileva KV, Cano LM, ChaparroGarcia A, Ammar R, Staskawicz BJ, Kamoun S: Adaptive evolution has targeted the C-terminal domain of the RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *Plant Cell* 2007, 19:2349-2369.
- Withers J, Yao J, Mecey C, Howe GA, Melotto M, He SY: Transcription factor-dependent nuclear localization of a transcriptional repressor in jasmonate hormone signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2012, 109:20148–20153.
- Woelk T, Oldrini B, Maspero E, Confalonieri S, Cavallaro E, Di Fiore PP, Polo S (2006) : Molecular mechanisms of coupled monoubiquitination. *Nature Cell Biology* 8(11):1246-54
- Wolfe BE, Tulloss RE, Pringle A: The irreversible loss of a decomposition pathway marks the single origin of an ectomycorrhizal symbiosis. *PLoS ONE* 2012, 7(7):e39597.
- Wong KKY, Piché Y, Montpetit D, Kropp BR: Differences in the colonisation of *Pinus banksiana* roots by sib-monokaryotic and dikaryotic strains of ectomycorrhizal *Laccaria bicolor*. *Canadian Journal of Botany* 1989, 67:1717-1726.
- Wong KKY, Piché Y, Fortin JA. Differential development of root colonisation among four closely related genotypes of ectomycorrhizal *Laccaria bicolor*. *Mycological Research* 1990, 94:876-884.
- Wosten H, De Vries O, Wessels J: Interfacial Self-Assembly of a Fungal Hydrophobin into a Hydrophobic Rodlet Layer. *Plant Cell* 1993, 5(11):1567-1574.
- Wösten HAB, Ruardy TG, van der Mei HC, Busscher HJ, Wessels JGH: Interfacial self-assembly of a *Schizophyllum commune* hydrophobin into an insoluble amphipathic protein membrane depends on surface hydrophobicity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 1995, 5(3-4):189-195.
- Wösten HA, Schuren FH, Wessels JG: Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipathic protein membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *EMBO Journal* 1994, 13(24):5848-54.
- Wösten HAB and Wessels JG: Hydrophobins, from molecular structure to multiple functions in fungal development. *Mycosciences* 1997, 38:363-374.
- Wright DP, Johansson T, Le Quere A, Söderström B, Tunlid A: 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 Phytologist* 2005, 167:579-596.
- Xiao S, Dai L, Liu F, Wang Z, Peng W, Xie D: COS1: an *Arabidopsis* coronatine insensitive1 suppressor essential for regulation of jasmonate-mediated plant defense and senescence. *Plant Cell* 2004 16(5):1132-1142.
- Xie DX, Feys BF, James S, Nieto-Rostro M, Turner JG: COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* 1998, 280:1091–1094.
- Yan Y, Stolz S, Chételat A, Reymond P, Pagni M, Dubugnon L, Farmer EE: A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell* 2007, 19(8):2470-283.
- Xue C, Park G, Choi W, Zheng L, Dean RA, Xu JR: Two novel fungal virulence genes specifically expressed in appressoria of the rice blast fungus. *Plant Cell* 2002, 14(9):2107-219.
- Yaeno T, Li H, Chaparro-Garcia A, Schornack S, Koshiba S, Watanabe S, Kigawa T, Kamoun S, Shirasu K: Phosphatidylinositol monophosphate-binding interface in the oomycete RXLR effector AVR3a is required for its stability in host cells to modulate plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2011, 108(35):14682-7.
- Yaeno T and Shirasu K: The RXLR motif of oomycete effectors is not a sufficient element for binding to phosphatidylinositol monophosphates. *Plant Signaling and Behavior* 2013, 8(4). pii: e23865.
- Yan J, Zhang C, Gu M, Bai Z, Zhang W, Qi T, Cheng Z, Peng W, Luo H, Nan F, Wang Z, Xie D: The *Arabidopsis* CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *Plant Cell* 2009, 21(8):2220-2236.
- Yang S, Tang F, Gao M, Krishnan HB, Zhu H: R gene-controlled host specificity in the legume-rhizobia symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2010, 107:18735-18740.
- Yang X, Wang W, Coleman M, Orgil U, Feng J, Ma X, Ferl R, Turner JG, Xiao S: *Arabidopsis* 14-3-3 lambda is a positive regulator of RPW8-mediated disease resistance. *Plant Journal* 2009, 60(3):539-550.
- Yasuda T, Ishihara H, Amano H, Shishido K: Generation of basidiomycetous hyphal cell-aggregates by addition of the Arg-Gly-Asp motif-containing fragment of high-molecular-weight cell-adhesion protein MFBA derived from the basidiomycete *Lentinus edodes*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 1997, 61(9):1587-1589.

- Young BW, Massicotte HB, Tackaberry LE, Baldwin QF, Egger KN: *Monotropa uniflora*: morphological and molecular assessment of mycorrhizae retrieved from sites in the sub-Boreal Spruce biogeoclimatic zone in central British Columbia. *Mycorrhiza* 2002, 12:75-82.
- Yuan Y, Zhong S, Li Q, Zhu Z, Lou Y, Wang L, Wang J, Wang M, Li Q, Yang D, He Z: Functional analysis of rice *NPRI*-like genes reveals that *OsNPRI/NHI* is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. *Plant Biotechnology Journal* 2007, 5:313-324.
- Zamioudis C and Pieterse CM: Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 2012, 25(2):139-150.
- Zeng L-R, Vega-Sanchez ME, Zhu T, Wang G-L: Ubiquitination-mediated protein degradation and modification: an emerging theme in plant-microbe interactions. *Cell Research* 2006, 16:413-426.
- Zhang J, Shao F, Li Y, Cui H, Chen L, Li H, Zou Y, Long C, Lan L, Chai J, Chen S, Tang X, Zhou J-M: A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host and Microbe* 2007, 1:175-185.
- Zhao Z, Liu H, Wang C, Xu JR: Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC Genomics* 2013, 14:274.
- Zhou JM and Chai J: Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses. *Current Opinion in Microbiology* 2008, 11:179-185.
- Zhu W, Yang B, Chittoor JM, Johnson LB, White FF: AvrXa10 contains an acidic transcriptional activation domain in the functionally conserved C terminus. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 1998, 11:824-832.
- Zhu Z, An F, Feng Y, Li P, Xue L, A M, Jiang Z, Kim JM, To TK, Li W, Zhang X, Yu Q, Dong Z, Chen WQ, Seki M, Zhou JM, Guo H: Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A* 2011, 108:12539-12544.

Identifying targets of fungal effectors in the ectomycorrhizal symbiosis *Laccaria bicolor*-*Populus trichocarpa*

Roots of most trees form symbiosis with mutualistic soil-borne fungi. The ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton relies on mycorrhizal-induced small secreted proteins (MiSSP) to establish symbiotic tissues in the host-plant. The host proteins targeted by these fungal effectors are yet unknown. In the present study, we used the binary yeast two-hybrid (Y2H) system to determine direct interactions between MiSSP7 and the plant proteins in the *L. bicolor*-*P. trichocarpa* ectomycorrhizae. We showed that MiSSP7 interact with the jasmonic acid (JA) co-receptors JAZ5 and JAZ6 of *P. trichocarpa*, blocking JA signaling and promoting mutualism. *L. bicolor* transformants with severely reduced expression of MiSSP7 did not enter into symbiosis with poplar roots, a phenotype that could be complemented by transgenically varying the transcription of *PtJAZ6* or through inhibiting JA signalling. Additional Y2H assays showed that PtJAZ6 protein form a regulatory complex involving 14-3-3 protein(s) and MYC transcriptional factors. Two others *L. bicolor* effector-like proteins, MiSSP8 and MiSSP17, are secreted and are essential for the symbiosis development. MiSSP8 showed parietal and plasmalemma localization, while MiSSP17 was mainly cytoplasmic. Y2H assays suggested that these MiSSPs interact with plant proteins involved in plant defence signalling pathways.

During symbiosis development, *L. bicolor* experiences important genetic reprogramming required for root colonization. Transcription factors (TFs) are key players of these genetic changes. Here, we developed high throughput analysis of TFs in *L. bicolor* to obtain a comprehensive inventory of significantly regulated transcription factors in ECM and showed that some of them display similarities with TFs involved in cell wall integrity, carbon, nitrogen, iron and sulfur metabolism. In addition, Yeast One Hybrid assays allowed the functional validation of 6% of the TFs predicted *in silico* and the identification of Secreted Transcriptional Activator Proteins (STAP) which may be a new class of effectors promoting symbiosis development or/and controlling rhizospheric microorganisms.

Key Words: Effector MiSSP, ectomycorrhizal development, plant defence, mutualistic nutrient exchange, transcription factor, genetic reprogramming.

Analyse fonctionnelle d'effecteurs fongiques impliqués dans le développement de la symbiose ectomycorhizienne *Laccaria bicolor*-*Populus trichocarpa*

Les racines de la plupart des arbres forment des symbioses ectomycorhiziennes avec les champignons mutualistes du sol. Le basidiomycète *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton sécrète en contexte d'interaction des petites protéines effectrices (MiSSP) afin de faciliter la colonisation de la racine et établir les structures symbiotiques. Toutefois, les protéines de l'hôte ciblées par les MiSSPs de *L. bicolor* ne sont pas encore identifiées. Dans notre étude, nous démontrons, à l'aide du système double hybride chez la levure (Y2H), que la protéine MiSSP7 de *L. bicolor* interagit avec les co-récepteurs de l'acide jasmonique (AJ) JAZ5 et JAZ6 de *P. trichocarpa*. Cette interaction protéine-protéine entraîne un blocage de la voie de signalisation de l'AJ et favorise le développement symbiotique. Des transformants de *L. bicolor*, dont l'expression de MiSSP7 est fortement réduite, ne sont plus capables de mycorhizer les racines du peuplier. Néanmoins, ce phénotype peut être complété en faisant varier de façon transgénique la transcription de *PtJAZ6* ou par inhibition de la voie de signalisation de l'AJ. A l'aide du système Y2H, nous avons également mis en évidence que la protéine PtJAZ6 est capable d'interagir avec une protéine de type 14-3-3 et un facteur de transcription de type MYC, formant probablement un complexe de régulation. Deux autres protéines effectrices de *L. bicolor*, MiSSP8 et MiSSP17, sont sécrétées et essentielles au développement symbiotique. MiSSP8 présente alors une localisation pariétale et plasmalemmique, tandis que MiSSP17 est cytoplasmique. Les résultats des analyses Y2H suggèrent que MiSSP8 et MiSSP17 pourraient être impliquées dans le contournement des réactions de défense de la plante-hôte.

Par ailleurs, au cours du développement symbiotique, le champignon est le siège d'une reprogrammation génétique importante nécessaire à la colonisation des racines, au contournement des réactions de défense de la plante et à l'établissement d'échanges mutualistes. Les facteurs de transcription (TFs) sont les principaux acteurs de ces changements génétiques. Nous avons donc étudié les TFs de *L. bicolor* afin d'obtenir un inventaire complet des TFs régulés par la mycorhization. Certains d'entre eux présentent des similitudes avec des TFs impliqués dans le maintien de l'intégrité des parois cellulaires et la régulation du métabolisme du carbone, de l'azote, du fer et du soufre. De plus, le système simple hybride en levure a permis la validation fonctionnelle de 6% des TFs prédits *in silico* et l'identification de protéines sécrétées capables d'activer la transcription (STAP). Ces dernières pourraient constituer une nouvelle classe d'effecteurs favorisant le développement symbiotique ou le contrôle des microorganismes de la rhizosphère.

Mots clés: Effecteur MiSSP, développement ectomycorhizien, défenses de la plante, échange mutualiste de nutriment, facteur de transcription, reprogrammation génétique.