HAL open science

Les hormones dans la symbiose mycorhizienne : étude de la production et des effets d'hormones végétales par les champignons endomycorhiziens

Simon Pons

▶ **To cite this version:**

Simon Pons. Les hormones dans la symbiose mycorhizienne : étude de la production et des effets d'hormones végétales par les champignons endomycorhiziens. Interactions entre organismes. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2020. Français. NNT : 2020TOU30293 . tel-03333973

HAL Id: tel-03333973

https://theses.hal.science/tel-03333973

Submitted on 3 Sep 2021

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.

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Simon PONS

Le 13 novembre 2020

Les hormones dans la symbiose mycorhizienne : étude de la production et des effets d'hormones végétales par les champignons endomycorhiziens

---

Ecole doctorale : **SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries**

Spécialité : **Interactions plantes-microorganismes**

Unité de recherche :
Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales (LRSV)

Thèse dirigée par
Virginie PUECH-PAGES et Nicolas FREI-DIT-FREY

Jury

M. Marc Buée, Rapporteur
M. Philippe Delavault, Rapporteur
Mme Annick Moing, Examinatrice
Mme Maryelle Tropis, Examinatrice et Présidente du jury
Mme Virginie Puech-Pagès, Co-directrice de thèse
M. Nicolas Frei-dit-Frey, Co-directeur de thèse

- Remerciements -

Même si cela peut sembler être une évidence pour la plupart des gens qui liront ce manuscrit, j'aimerai souligner que cette thèse n'est pas le fruit du travail d'une seule personne. Je souhaite donc, avant tout, remercier sincèrement tous ceux et celles qui ont participé à la réalisation et l'accomplissement de ce travail, qui m'auront accompagné et soutenu pendant ces longues années. J'essaye d'être bref, mais vous êtes très, très, nombreux…

En premier lieux, je remercie les membres de mon jury, Pr. Maryelle Tropis, Dr. Annick Moing, Dr. Marc Buée, Pr. Philipe Delavault, d'avoir accepté et pris le temps de lire, d'évaluer mon manuscrit et d'avoir assisté à ma soutenance. Ce fut un moment de partage et d'échange extrêmement enrichissant, et m'a permis de conclure ce travail avec une grande fierté et satisfaction. J'en profite également pour remercier les membres de mon comité de thèse, Pr. Dominique Rolin, Dr. Emilie Chanclud et Floriant Bellvert, pour avoir m'avoir accompagné et aiguillé durant le déroulement de ce projet en me prodiguant de nombreux conseils.

Je souhaite bien évidement remercier mes deux co-directeurs de thèse, Nico et Vir, pour m'avoir fait confiance tout ce temps pour mener ce projet. Vous avez tous les deux fait preuves d'énormément de bienveillance et d'une patiente redoutable (à la limite même du babysitting) quand il m'a fallu remplir ma première plaque de qPCR, lancer ma première analyse de spectrométrie de masse ou planter mon premier *Medicago*, mais également pour la relecture de mon manuscrit. Vos encouragements mon permis de rester positif malgré les échecs et les retournements de situations, et ce depuis le premier jour de mon stage, jusqu'à l'enregistrement de la dernière version de ce document. De la même manière, merci à Guillaume et Christian, qui ont également encadré une partie de ce travail. J'ai énormément appris à travers les nombreuses réunions, comptes rendus et relectures en tout genre. Merci infiniment à tous pour cet accompagnement et pour votre implication !

Merci infiniment à toute l'équipe MYCO et l'équipe EVO pour cet accueil et cette bonne ambiance formidable. Merci Pierre-Marc, Quentin, Morgane, Soizic, Yvan, Christophe et Christophe, Camille, Arthur, Nathalie, Adeline, Léa, Loïc, Mélanie, Nathanaël, Virginie, Tatiana, Jean, Laurent, Nico, Emilie, Cyril, Duchesse, Maxime, Francis, Dominique, Sébastien, Malo, Corinne, Nina, Margot, Jing, Ayla, Karima, Chloé, l'armée de stagiaire qui nous rejoins chaque année, et celui ou celle que j'aurai forcément oublié tellement on est nombreux dans cette équipe. Tellement nombreux que c'est compliqué de faire rentrer une petite mention spéciale individualisée pour chacun d'entre vous dans ces quelques pages, mais sachez que j'ai apprécié travailler avec vous tous, sans distinction !

- Merci à Laurent et Adeline. C'est surement grâce à (ou "à cause de"… je ne sais pas trop lequel choisir… ;)) vous deux que je me suis lancé dans cette « aventure », vous m'avez mis la petite pichenette pour que je m'élance !
- Merci PM de m'avoir forcé la main et trainé sur les tatamis (entre autre !), c'était un plaisir de remettre un kimono. Merci également au club de judo de Saouzelong de m'avoir accueilli deux saisons et d'avoir essayé de me remettre en forme !
- Merci Arthur, Mélanie, Yvan et Camille, pour le soutien psychologique (volontaire ou non), pour toutes les tips and tricks de labo, les discussions scientifiques ou nom, les tutos pleurottes, les petits repas improvisés… Vous avez été des collègues en or !!
- Merci à tous mes collègues de bureau du LRSV, du premier (High five Margot et Lucia !) au dernier (Big up Camille (encore), Nathanaël, Vir, Corinne et Panné !), pour m'avoir supporté, pour les pauses café sans café, les moments papotes et toutes les bêtises de retour de vacances !

Merci également à MétaToul, d'abord au plateau AgromiX, Justine, Salimata, Thomas, Guillaume et Sylvie, mais également le plateau Réseau métabolique, ainsi que les autres plateaux toulousains, sans qui une grosse partie de mes expériences n'auraient pas pu être réalisées, et grâce à qui j'ai pu continuer à apprendre de nombreuses choses en biochimie et en qualité.

Je tiens à remercier chaleureusement l'Institut de Chimie de Toulouse, et en particulier Catherine Claparols. Merci Cathy pour ta disponibilité et ta gentillesse à chaque fois que je suis venu sur le plateau, et de ne jamais avoir jeter la montage d'échantillon qui ont pu trainer dans les frigo… (désolé…) ...!

Je souhaite remercier très sincèrement Hélène Reynard, Friederike Widmann et Céline Seriot, sans qui la rédaction et l'aboutissement de cette thèse n'aurait pas été possible.

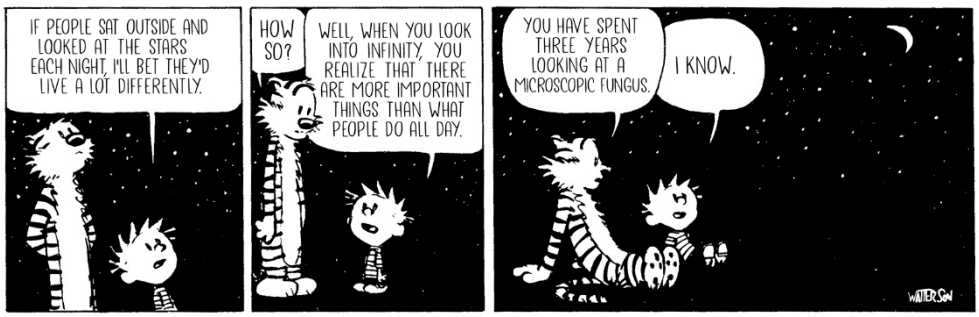
Merci à tous les services communs du laboratoire, le service gestion et l'équipe pédagogique de PhyV, le secrétariat de l'école doctorale, qui m'ont accompagné, aidé, encouragé, dépanné tout au long de cette thèse. Merci aussi à tous les autres membres du labo, Perm ou Non-perm, avec qui j'ai eu l'occasion d'interagir, allant des conseils scientifiques à un simple sourire dans le couloir le matin ! Désolé par avances pour celui ou celle que je vais forcément oublier (encore une fois, vous êtes beaucoup trop nombreux), mais merci notamment à Renan, Aurélie, Alvaro, Marion (merci pour les très nombreuses relectures, coups de pouce et ta patience !), Julie, Maxime, Amandine, David, Maria (¡muchas gracias por las astucias con Word!), Audrey, Virginia, Nathalie, Laurent, Sébastien, Annabelle, Damien, Mada, Nicole, Fabien (le DCCE c'était top !), Inès, Rémi, Florian,Aurélien, Carine, Charlène, Malick, Alexandra, Sarah, Mariane, Sabine, Mélanie, Harold, Yves, Thomas, Hélène et Marielle (merci pour les coup de main stat et RNAseq !) Olivier, Bastien, Didier, Hervé, Ambroise, Josiane, Agustina, Ali, Manon, Kévin, Sabine, Valérie, Anaïs, Hassan, Patrizia… Parmi tous les gens que j'ai pu citer jusqu'à présent, merci spécialement à ceux qui ont essayé de stimuler ma créativité, qui n'ont pas contribué au développement de mon syndrome de l'imposteur, et qui se sont montrés bienveillant en toutes circonstances !

Merci à tous ceux qui m'ont soutenu durant mes études et avant le début de ce doctorat, ceux qui m'ont soutenu pendant, et ceux qui continueront de le faire par la suite. Merci à ma famille, mes parents (et aux chats) ainsi qu'à mes amis. Merci notamment à Livio-Spoon, Audrey et Lauriane qui ont fait quelques miracles et m'ont permis de prendre une bouffée d'air frais à des moments critiques. Je n'arriverai jamais à exprimer à quel point je vous suis reconnaissant. Merci infiniment !!

Toute ma reconnaissance également à Jimmy Wales et Larry Sanger, Google, Alexandra Elbakyan, Larry Tesler, Thomas et John Knoll… qui ont tous contribué significativement, d'une manière ou d'une autre, à ce travail. Merci quand même à Youtube, 9gag ou encore Curt Mast pour votre contribution plutôt négative sur ma productivité, mais positive pour ma santé mentale.

Merci également l'année 2020 d'avoir rajouter la dose de chaos supplémentaire et indispensable à la troisième année. Si faire une thèse peut être comparable à assembler un puzzle de 100 000 pièces, sans la boite, avec les pièces qui changent de forme et couleurs tous les jours, le tout dans une pièce en feu, alors il ne manquait finalement qu'un virus mortel pour conclure le spectacle en beauté !

Enfin, merci à tous ceux et celles qui prendront le temps d'ouvrir et de lire cette thèse, dans son intégralité ou seulement un paragraphe !


IF PEOPLE SAT OUTSIDE AND LOOKED AT THE STARS EACH NIGHT, I'LL BET THEY'D LIVE A LOT DIFFERENTLY.
HOW SO?
WELL, WHEN YOU LOOK INTO INFINITY, YOU REALIZE THAT THERE ARE MORE IMPORTANT THINGS THAN WHAT PEOPLE DO ALL DAY.
YOU HAVE SPENT THREE YEARS LOOKING AT A MICROSCOPIC FUNGUS.
I KNOW.
WATTERSON

- Résumé -

La symbiose mycorhizienne à arbuscules est une association mutualiste qui s'établit entre les racines de la majorité des plantes terrestres et les champignons souterrains du sous-phylum des Gloméromycetes. Cette interaction est bénéfique pour les deux partenaires : le champignon fournit à la plante des minéraux (principalement phosphore et azote) et il obtient en retour des molécules carbonées (sous forme de lipides et d'oses), indispensables à sa survie. Cette interaction est initiée par un dialogue moléculaire, impliquant d'une part des molécules chitiniques d'origine fongique et d'autre part des hormones secrétées par la plante, les strigolactones. Une fois la symbiose établie, elle est contrôlée par des hormones végétales, qui favorisent ou inhibent son maintien. De manière intéressante, malgré que de nombreuses espèces bactériennes et fongiques du sol aient été décrites comme capables de produire des hormones végétales, pour moduler leurs interactions avec les plantes, peu d'études décrivent la capacité des champignons mycorhiziens à arbuscules à biosynthétiser de telles molécules. Pourtant, des gènes codants pour des récepteurs putatifs à deux phytohormones – Cytokinines et Ethylène - ont été identifiés chez certains champignons endomycorhiziens.

Le premier objectif de ce travail a été d'identifier des hormones végétales chez le champignon endomycorhizien modèle *Rhizophagus irregularis*. Ce champignon étant biotrophe obligatoire, incapable de se développer en absence de partenaire végétal, nous avons utilisé des spores en germination axénique afin d'éviter toute contamination issue de la plante. A l'aide de méthodes d'analyses biochimiques, sensibles et précises, nous avons mis en évidence la présence de quatre hormones végétales dans les extraits fongiques : une auxine (acide indole-3-acétique), une cytokinine (isopentenyl-adénosine), un acide gibbérellique (GA_4) et l'éthylène. Nos expériences suggèrent, de plus, que comme chez la plupart des champignons, *R. irregularis* utilise une voie KMBA-dépendante pour biosynthétiser l'ethylène. Le deuxième objectif a été de déterminer l'origine de biosynthèse de ces hormones. Elles peuvent soit être métabolisées par le champignon, soit être importées durant les échanges symbiotiques avec la plante. Pour démontrer une éventuelle biosynthèse fongique, nous avons initié des expériences d'incorporation et de suivi de marquages isotopiques, en faisant germer des spores en présence de sources de carbones marqués. Un troisième objectif a visé à initier des travaux sur les effets des cytokinines et de l'éthylène sur *R. irregularis*, puisqu'il possède des récepteurs putatifs à ces deux phytohormones.

La preuve biochimique de la présence d'hormones chez *R. irregularis* constitue une découverte importante pour la communauté. Cette découverte ouvre de nouvelles perspectives quant à leurs rôles et leurs régulations lors de la symbiose. Celles-ci pourraient avoir un impact direct sur la physiologie des champignons endomycorhiziens, contribuer au dialogue moléculaire plante-champignon ou inter-plantes, *via* le réseau mycélien, mais également influencer les communautés microbiennes du sol. Ces résultats encourageront à davantage étudier les plantes dans leur microbiome naturel et permettront de mieux comprendre comment un langage hormonal commun, qui s'est développé au cours de l'évolution, a contribué à l'interaction entre les plantes et les champignons mycorhiziens depuis qu'elles ont colonisé le milieu terrestre.

Mots clés : Symbiose, Champignon mycorhizien à arbuscules, *Rhizophagus irregularis,* Hormones végétales, Spectrométrie de masse, Auxine, Cytokinine, Ethylène, Gibbérelline.

- Abstract -

Arbuscular mycorrhizal symbiosis is a mutualistic association established between the roots of most of land plants and soil fungi of the Glomeromycete subphylum. This interaction is beneficial for both partners: the fungus provides the plant with minerals (mainly phosphorus and nitrogen) and in return obtains carbon molecules (in the form of lipids and oses), which are essential for its survival. This interaction is initiated by a molecular dialogue, involving chitinic molecules from fungal origin and phytohormones secreted by the plant, the strigolactones. Once the symbiosis is established, it is controlled by plant hormones, which promote or inhibit its maintenance. Interestingly, although many soil bacterial and fungal species have been able to produce plant hormones to modulate their interactions with plants, few studies describe the ability of arbuscular mycorrhizal fungi to biosynthesize such molecules. Furthermore, genes encoding two putative phytohormone receptors - Cytokinins and Ethylene - have however been identified in certain endomycorrhizal fungi.

The first objective of this work was to identify plant hormones in the model endomycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. As this fungus is an obligate biotroph, unable to develop in the absence of a plant partner, we used *Rhizophagus irregularis* germinating spores in axenic conditions in order to avoid any contamination from the plant. Using sensitive and precise biochemical analysis methods, we have demonstrated the presence of four phytohormones in fungal extracts: an auxin (indole-3-acetic acid), a cytokinin (isopentenyl-adenosine), a gibberellic acid (GA_4) and ethylene. Our experiments further suggest that, like in most fungi, *R. irregularis* uses a KMBA-dependent pathway to biosynthesize ethylene. The second objective was to determine the origin of biosynthesis of these hormones. They can either be metabolized by the fungus, or can be imported during symbiotic exchanges with the plant. To demonstrate a possible fungal biosynthesis, we initiated isotopic labelling experiments, by germinating spores in the presence of labelled carbon sources. A third objective was to initiate work on the effects of cytokinins and ethylene on *R. irregularis*, since it has putative receptors for these two phytohormones.

Biochemical evidence for the presence of hormones in *R. irregularis* is an important discovery for the community. This discovery opens up new perspectives to understand their roles and regulations during the symbiosis. These could have a direct impact on the physiology of endomycorrhizal fungi, contribute to the plant-fungus or inter-plant molecular dialogue, *via* the mycelial network, but also influence the microbial communities in the soil. These results will further encourage the study of plants in their natural microbiome and will provide a better understanding of how this common hormonal language, has contributed to this symbiosis through the evolution, that started when plants colonized the land and interacted with soil fungi.

Keywords: Symbiosis, Arbuscular mycorrhizal fungi, Rhizophagus irregularis, Phytohormones, Mass spectrometry, Auxine, Cytokinine, Ethylene, Gibberelin

- Liste des abréviations -

ABA : Acide abscissique

ABA-GE : Acide abscissique glucose esther

ACC : Acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique

ACN : Acétonitrile

ACO : ACC oxidase

ACS : ACC synthase

AKG : α-keto-glutarate

BAP : Benzyladenine

BAPG : Benzyladénine glucoside

BAPR : Benzyladénosine

BL : Brassinolide

BRs : Brassinostéroïdes

CKs : Cytokinines

CMA(s) : Champignon(s) mycorhizien(s) à arbuscules

CMN : Réseau mycélien commun

COs : Chito-oligosaccharides

CSSP : Voie de signalisation symbiotique commune

*c*Z : *cis*-Zéatine

*c*ZR : *cis*-Zéatine riboside

Da : Dalton

DC : Double compartiment

DHZ : dihydrozéatine

DHZG : dihydrozéatine glucoside

DHZR : dihydrozéatine riboside

DMAPP : Diméthylallyl-pyrophosphate

EFE : Ethylene forming enzyme

ELISA : Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée

ERM : Mycélium extra racinaire

ET : Ethylène

FAS : Fatty acid synthase

FT-ICR : Spectrométrie de masse à résonance cyclonique ionique

GAs : Acide gibbérellique / Gibbérellines

GC : Chromatographie en phase gazeuse

GSE : Exsudat de spores germées

HRMS : Spectrométrie de masse en haute résolution

IAA : Acide indole 3-acétique

IAA-ala : Acide indole 3-acétique alanine

IAA-asp : Acide indole 3-acétique aspartate

IAAs : Auxines

IAM : Indole-3-acétamide

IAox : l'indole-3-acetaldoxime

IBA : Acide indole 3-butyrique

iP : Isopentenyladénine

iP9G : Isopentenyladénine 9-glucoside

IPA : Acide indole 3-propanoïque

iPR : Isopentenyladénosine

IPT : Isopentenyl transferase

IPyA : Acide indole-3-pyruvic

JA-ile : Jasmonate isoleucine

JAs : Jasmonates

KG : Kinétine glucoside

Ki : Kinétine

KMBA : Acide α-keto γ-methylthiobutyrique

KR : Kinétine riboside

LC : Chromatographie en phase liquide

LCOs : Lipochito-oligosaccharides

LLE : Extraction liquide-liquide

LOG : Lonely Guy

LPME : Micro-extraction en phase solide

LRR-RLK : Leucine-rich repeat receptor like kinase

m/z : Rapport masse sur charge

MCP : 1-methylcyclopropène

MeJA : Methyl-jasmonate

MeOH : Méthanol

MeSA : Methyl-salicylate

MRM : Multiple reaction monitoring

MS : Spectrométrie de masse

*m*T : *meta*-Topoline

NAA : Acide naphtalène 1-acétique

Pi : Phosphate inorganique

PPA : Appareil de pré-pénétration

ppm : Partie par million

Qtrap : Quadripôle-cellule de collision-trappe à ion linéaire

SA : Acide salicylique

SAM : S-adénosylmethionine

SAs : Salicylates

SLs : Strigolactones

SPE : Extraction en phase solide

SPME : Micro-extraction en phase liquide

TG : Topoline glucoside

TOF : Temps de vol

TR : Topoline riboside

TSQ : Triple quadripôles

tZ : *trans*-Zéatine

*t*ZR : *trans*-Zéatine riboside

VOCs : Composés organiques volatils

Xic : Chromatogramme d'ion extrait

Z : Zéatine

ZG : Zéatine glucoside

ZR : Zéatine riboside

- Table des matières -

- Introduction - ..... - 1 -
1 - La symbiose mycorhizienne à arbuscules ..... - 3 -
1.1 - Une interaction ancienne et très répandue ..... - 3 -
1.2 - Développement de la symbiose ..... - 5 -
1.2.1 - Phase a-symbiotique ..... - 5 -
1.2.2 - Dialogue moléculaire, la phase pré-symbiotique ..... - 7 -
1.2.3 - Etablissement des structures fongiques ..... - 8 -
1.2.4 - Croissance extra-racinaire ..... - 10 -
1.3 - Echanges symbiotiques entre la plante et le champignon ..... - 11 -
1.3.1 - Des échanges allant du champignon vers la plante… ..... - 11 -
1.3.2 - … et de la plante vers le champignon ..... - 13 -
1.4 - Particularité, défi, et importance de l'étude des champignons endomycorhiziens à arbuscules ..... - 14 -
1.4.1 - Particularités notables des CMAs ..... - 14 -
1.4.2 - Choix de l'organisme d'intérêt ..... - 18 -
1.4.3 - Impact et utilisation de la mycorhize en agriculture durable ..... - 19 -
2 - Les hormones végétales ..... - 21 -
2.1 - Fonctions, structures et voies métaboliques des hormones végétales ..... - 21 -
2.1.1 - Auxines ..... - 21 -
2.1.2 - Cytokinines ..... - 23 -
2.1.3 - Ethylène ..... - 24 -
2.1.4 - Gibbérellines ..... - 24 -
2.1.5 - Strigolactones ..... - 25 -
2.1.6 - Acide abscissique ..... - 26 -
2.1.7 - Salicylates ..... - 26 -
2.1.8 - Jasmonates ..... - 27 -
2.1.9 - Brassinostéroïdes ..... - 27 -
2.1.10 - Hormones peptidiques ..... - 28 -
2.1.11 - Un bref aperçu de la perception des phytohormones ..... - 28 -
2.2 - Productions d'hormones végétales par des micro-organismes ..... - 29 -
2.2.1 - Chez les bactéries ..... - 30 -
2.2.2 - Chez les champignons ..... - 30 -
2.2.3 - Fonctions et rôles ..... - 31 -
2.3 - Les hormones dans la symbiose mycorhizienne à arbuscules ..... - 33 -
2.3.1 - Chez la plante hôte ..... - 33 -

2.3.2 - Chez le symbionte fongique ..... - 37 -
2.3.3 - Des récepteurs putatifs fongiques ..... - 39 -
3 - Analyse des hormones végétales ..... - 39 -
3.1 - Les extractions et purifications des phytohormones ..... - 40 -
3.1.1 - Extractions et purifications ciblées ..... - 40 -
3.1.2 - Extractions et purifications globales ..... - 41 -
3.2 - Détection et quantification des hormones végétales ..... - 44 -
3.2.1 - Les bio-essais, ancêtres de la détection des phytohormones ..... - 44 -
3.2.2 - Détection par immuno-affinité ..... - 44 -
3.2.3 - Analyses chromatographiques ..... - 44 -
3.2.4 - Analyses par spectrométrie de masse couplée à une séparation chromatographique ..... - 45 -
4 - Hypothèses et objectifs ..... - 52 -
- Chapitre 1 - Détection d'hormones végétales chez *R. irregularis* ..... - 53 -
Préambule ..... - 53 -
Résumé de l'article ..... - 54 -
Article ..... - 57 -
Discussion et perspectives ..... - 79 -
1 - Stratégie de purification ..... - 79 -
1.1 - Les Exsudats de spores germées ..... - 79 -
1.2 - Les spores germées ..... - 80 -
1.2.1 - Extraction et analyses des brassinostéroïdes ..... - 81 -
1.2.2 - Strigolactones ..... - 83 -
2 - Stratégies d'analyses par spectrométrie de masse : analyses ciblées et analyses globales ..... - 85 -
2.1 - Des analyses ciblées pour une analyse sensible et spécifique ..... - 85 -
2.1.1 - Cas particulier de l'acide salicylique ..... - 85 -
2.2 - Aller vers des analyses « semi-ciblées » pour une identification exhaustive des phytohormones ..... - 86 -
3 - Influence de la production d'hormones par les CMA sur la plante hôte ? ..... - 88 -
3.1 - Des spores en (pré)-germination ? ..... - 88 -
3.2 - De un attomole à dix femtomoles d'hormones exsudées par spores ? ..... - 89 -
3.3 - Des hormones exsudées par les arbuscules ? ..... - 90 -
- Chapitre 2 - Origine de biosynthèse des phytohormones identifiées ..... - 91 -
Préambule ..... - 91 -
Résultats et discussion ..... - 91 -
1 - Biosynthèse ou stockage ? Analyse des hormones produites par le champignon à différents stades de développement ..... - 91 -
1.1 - Cinétique d'exsudation des hormones ..... - 93 -
1.2 - Cultures en double compartiment : des ratios d'isomères d'hormones différents . - 95 -

1.3 - Différentes plantes hôtes = différents profils hormonaux ? - 97 -
2 - Origine de biosynthèse fongique ? Utilisation de marquages isotopiques - 98 -
2.1 - Incorporation de glucose et d'acétate marqués et suivi du profil hormonal lors de la germination des spores de *R. irregularis* - 99 -
2.2 - Perspectives des expériences de marquage - 105 -
2.2.1 - Choix des sources de marquage - 105 -
2.2.2 - Validation de l'internalisation du marquage - 106 -
2.2.3 - Vers l'établissement d'une carte de réseaux métaboliques ? - 107 -
- Chapitre 3 - Recherche des effets des cytokinines et de l'éthylène sur la biologie du champignon - 109 -
Préambule - 109 -
Résultats et discussion - 110 -
1 - Effet des hormones perçues par *R. irregularis* sur la mycorhization - 110 -
1.1 - Expériences réalisées - 110 -
1.1.1 - Prétraitement des spores - 110 -
1.1.2 - Préparation de la plante hôte et systèmes de co-inoculation - 111 -
1.1.3 - Détermination du taux de mycorhization - 113 -
1.2 - Résultats obtenus - 113 -
1.3 - Discussion - 115 -
2 - Effet des hormones sur la germination de *R. irregularis* - 117 -
2.1 - Expériences et résultats obtenus avec des traitements des champignons aux cytokinines - 117 -
2.1.1 - Manipulations et résultats - 117 -
2.1.2 - Discussion - 118 -
2.2 - Manipulations et résultats obtenus avec des traitements des champignons à l'éthylène ou au MCP - 118 -
2.2.1 - Manipulation et résultats - 118 -
2.2.2 - Discussion - 119 -
2.3 - Optimisations des mesures des phénotypes de germination des champignons - 119 -
3 - Effet sur la transcription des gènes - 121 -
3.1 - Résultats - 121 -
3.2 - Discussion - 124 -
- Conclusion – - 126 -
- Matériels et méthodes – - 129 -
1 - Produits chimiques et réactifs - 129 -
1.1 - Standard de phytohormones - 129 -
1.2 - Précurseurs métaboliques - 129 -
1.3 - Solvants et autres produits chimiques - 129 -
2 - Matériel biologique - 129 -
2.1 - Spores de R. irregularis - 129 -

2.2 - Production des exsudats de spores germées ..... - 130 -
2.3 - Cultures en boites double compartiment ..... - 130 -
2.4 - Graines de M. truncatula ..... - 130 -
3 - Extractions et purifications des hormones végétales ..... - 131 -
3.1 - A partir de GSE ..... - 131 -
3.2 - A partir de spores germées ..... - 131 -
3.3 - A partir de boites DC ..... - 132 -
4 - Analyses par spectrométrie de masse ..... - 132 -
4.1 - Analyses MRM ..... - 132 -
4.2 - Analyses HR-MS et MS/MS ..... - 133 -
5 - Analyses de l'éthylène et du KMBA ..... - 133 -
5.1 - Détection de l'éthylène par GC-FID ..... - 133 -
5.2 - Détection du KMBA par UHPLC-MS ..... - 134 -
6 - Expériences de marquage isotopique ..... - 135 -
6.1 - Préparation de l'échantillon ..... - 135 -
6.2 - Analyses des phytohormones par LC-MS ..... - 135 -
7 - Expériences de mycorhization ..... - 135 -
7.1 - Système de mycorhization entre membranes ..... - 136 -
7.2 - Système de mycorhization en tube Falcon ..... - 136 -
7.2.1 - Tubes Falcon coupés ..... - 136 -
7.2.2 - Tubes Falcon avec réserve de solution nutritive ..... - 136 -
7.3 - Système de mycorhization en plaques 6 puits ..... - 136 -
7.4 - Coloration et observation des évènements de mycorhization ..... - 137 -
8 - Expériences de germination des spores ..... - 137 -
9 - Analyses RNAseq ..... - 137 -
9.1 - Préparation des échantillons ..... - 137 -
9.2 - Validation des gènes différentiellement exprimés par qPCR ..... - 139 -
10 - Analyses statistiques ..... - 139 -
10.1 - Ethylène ..... - 139 -
10.2 - RNAseq ..... - 140 -
- Bibliographie et références – ..... - 141 -

- Table des figures -

Figure 1 : Illustration des symbioses mycorhiziennes ……-2-
Figure 2 : Etablissement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules ……-4-
Figure 3 : Différentes structures fongiques ……-6-
Figure 4 : Echanges trophiques entre la plante et les CMAs ……-12-
Figure 5 : Systèmes de culture et de germination des CMAs ……-16-
Figure 6 : Les hormones végétales ……-20-
Figure 7 : Voies des biosynthèses végétales des phytohormones ……-22-
Figure 8 : Impact des hormones végétales sur la symbiose mycorhizienne à arbuscules ……-32-
Figure 9 : Récepteurs putatifs fongiques à l'éthylène et aux cytokinines ……-38-
Figure 10 : Exemple d'un protocole d'extraction globale des phytohormones, proposé par (Kojima *et al.*, 2009) ……-42-
Figure 11 : Source d'ionisation Electrospray ……-46-
Figure 12 : Différents mode d'analyses : Balayage vs MS/MS vs MRM ……-48-
Figure 13 : Différents niveaux de confiance accordés à une analyse en spectrométrie de masse en haute résolution proposé par (Schymanski *et al.*, 2014) ……-50-
Figure 14 : Chromatogramme d'ion extrait (XIC) du brassinolide ……-82-
Figure 15 : Quantification relative de l'acide salicylique dans les contrôles négatifs ……-84-
Figure 16 : Cinétique d'exsudation et « production » de phytohormones par les spores de *R. irregularis* en germination ……-92-
Figure 17 : Profil hormonal dans les boites double compartiment DC ……-96-
Figure 18 : Devenir des carbones 13 issus de l'acétate marqué ……-100-
Figure 19 : Distribution isotopique du marquage dans les métabolites les plus abondants ou les intermédiaires du cycle de Krebs ……-102-
Figure 20 : Voies des biosynthèses végétales des phytohormones pour le marquage isotopique ……-104-
Figure 21 : Différents systèmes de mycorhization de plantes *in vitro* ……-112-
Figure 22 : Effet du prétraitement à l'éthylène ou au MCP des spores de *R. irregularis* sur la colonisation des racines de *M. truncatula* ……-114-
Figure 23 : Effets de l'iP et de l'iPR sur l'élongation des hypes lors de la germination des spores de *R. irregularis* ……-116-
Tableau 1 : Gènes de *R. irregularis* différentiellement exprimés après 2h de traitement à l'éthylène ……-122-
Tableau 2 : Amorces utilisées pour les expériences de q-PCR ……-138-

- Introduction -

Issu des mots grecs *σύν* et *βίος* signifiant respectivement *ensemble* et *vie*, le mot symbiose définit une association durable et intime entre deux organismes de différentes espèces. Cette définition comprend donc les interactions parasitiques ou commensalistes, mais le mot symbiose réfère plus souvent à une interaction mutualiste, c'est-à-dire bénéfique pour les deux organismes. Ce type d'interaction est largement retrouvé dans le monde du vivant, et fait intervenir des acteurs des différents royaumes, bactéries, archées, animaux, plantes et champignons. Par exemple, on retrouve chez l'homme plus de 1300 espèces de bactéries différentes dans le microbiome intestinal, représentant jusqu'à un kilogramme de biomasse. Ce microbiome participe à certaines fonctions digestives, comme la dégradation des polysaccharides ou la production d'acides aminés essentiels, mais joue également un rôle physiologique et immunitaire (Cresci and Bawden, 2015). Chez certains organismes, ce type de symbiose est indispensable à la survie de l'hôte et du symbionte, comme chez les termites. Ceux-ci sont incapables de dégrader intégralement la cellulose et la ligno-cellulose et font intervenir différentes bactéries, archées et champignons « termitomycètes » dans ce processus (Nobre and Aanen, 2010; Maurice and Erdei, 2018). Cette relation symbiotique est dite « obligatoire » lorsqu'elle est indispensable à la survie d'un des partenaires.

De nombreuses relations symbiotiques sont également retrouvées dans le règne végétal, entre les plantes et certaines espèces présentes dans leur microbiome. La symbiose fixatrice d'azote fait partie des symbioses les plus connues. Cette interaction s'établit entre les racines des plantes des familles des *Fabales*, *Fagales*, *Cucurbitales* et *Rosales* (Griesmann *et al.*, 2018) et les bactéries *Rhizobia* et *Actinohizobia* présentes naturellement dans le sol. Ces bactéries sont internalisées dans les racines, qui vont développer des nodules pour les y accueillir. Les bactéries se multiplient et se différencient en bactéroïdes à l'intérieur des cellules nodulaires et vont alors être en mesure de capter l'azote atmosphérique gazeux et, grâce à l'hydrogène de l'eau, vont le transformer en ammoniac puis en ammonium hydrosoluble, assimilable par la plante. En échange, la plante fournit du carbone issu de la photosynthèse. Cette symbiose est dite facultative, car les deux organismes impliqués sont capables de se développer seuls,

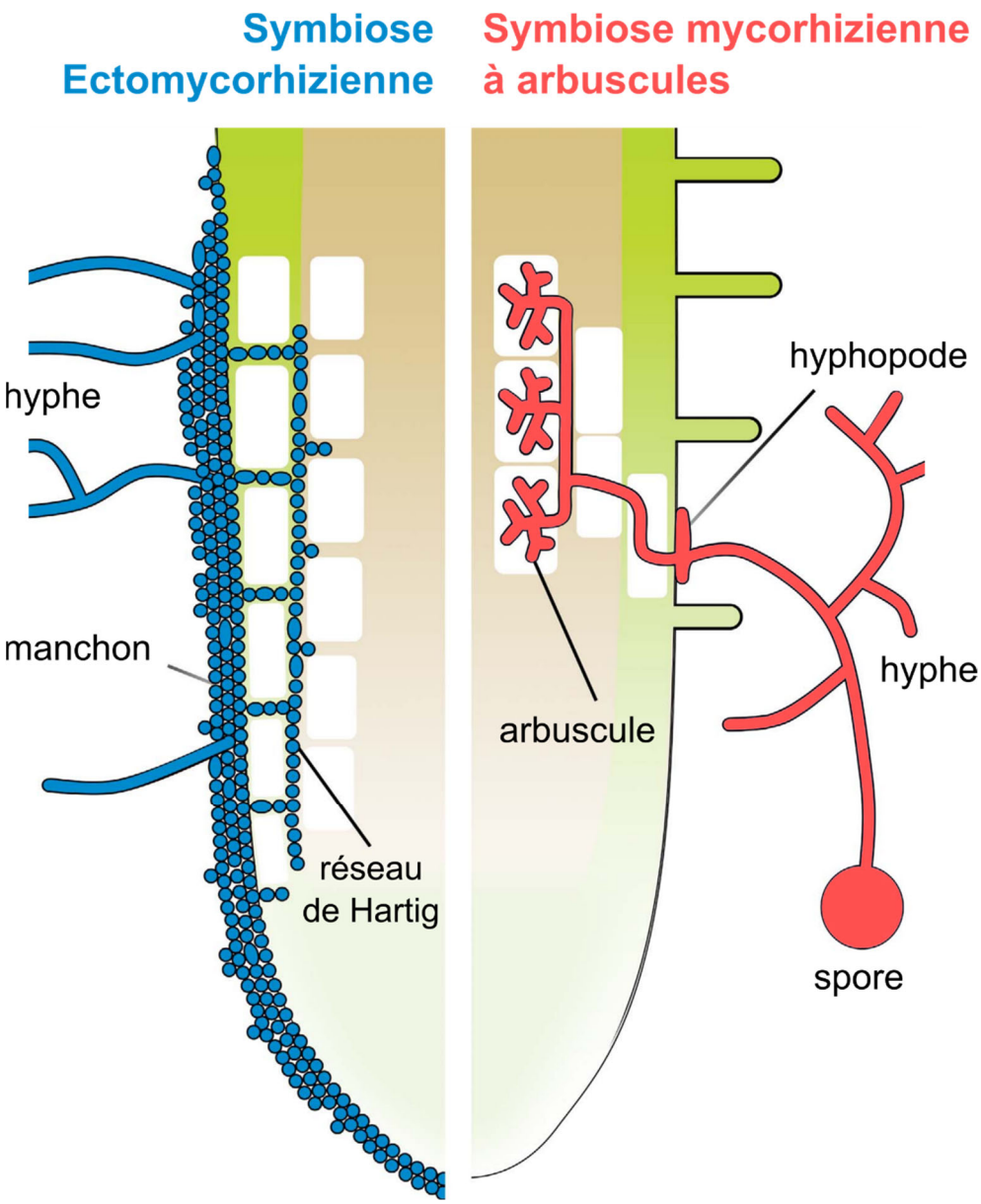


Figure 1 : Illustration des symbioses mycorhiziennes

Lors de la symbiose ectomycorhizienne (en bleu), les hyphes se développent à l'extérieur et autour de la racine en formant un manchon et colonisent l'espace intra-racinaire épidermal (vert), jusqu'aux cellules corticales (marron), formant le réseau de Hartig. Lors de la symbiose mycorhizienne à arbuscules (en rouge), les hyphes, issus d'une spore, forment une structure d'adhésion, appelée hyphopode, au contact de la racine, avant de coloniser l'espace inter-racinaire jusqu'aux cellules corticales où ils forment des structures hyper-ramifiées appelées arbuscules.

Issu de (Bonfante and Genre, 2010)

indépendamment de leur partenaire. Toutefois, cette interaction s'avère bénéfique pour l'hôte et le symbionte : elle permet d'améliorer la nutrition azotée de la plante et celle-ci fournit en retour un environnement anaérobique pour les bactéries, ainsi que des nutriments.

A la différence de la symbiose fixatrice d'azote, qui concerne un nombre d'espèces limité chez les *Angiospermes*, un autre type de symbiose est retrouvé chez presque l'ensemble des plantes terrestres. Celle-ci implique des champignons présents dans le sol et est appelée symbiose mycorhizienne ; elle se distingue en deux catégories différentes. Quand les champignons se développent à la surface de l'épiderme et dans les espaces intercellulaires de la racine, il s'agit d'ectomycorhize. Les hyphes forment un manchon autour de la racine, et pénètrent jusqu'aux parois des cellules corticales (Figure 1). Ce réseau mycélien intra-racinaire, appelé réseau de Hartig, sert d'interface d'échange entre les deux organismes (Nehls, 2008). Les ectomycorhizes sont formées par des champignons appartenant aux phylums des *Basidiomycètes* et des *Ascomycètes* au sein des racines de certains arbres des forêts tempérées et boréales (Smith and Read, 2008; Martin *et al.*, 2017). Par opposition on distingue l'endomycorhize, pour laquelle il existe différents types : les symbioses mycorhiziennes éricoïdes, orchidoïdes, ou jungermanniales, mais la symbiose endomycorhizienne la plus répandue est la symbiose mycorhizienne à arbuscules. En plus de se propager dans l'apoplasme, les hyphes des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMAs) établissent dans les cellules corticales des structures extrêmement ramifiées, appelées arbuscules, qui donnent leur nom à cette symbiose. Ils servent de lieux d'échange privilégiés entre la plante et le champignon (Figure 1).

Les CMAs seront au cœur de ce projet de recherche. Par extension, l'appellation « symbiose » fera donc ici référence à la symbiose mycorhizienne à arbuscules.

1 - La symbiose mycorhizienne à arbuscules

1.1 - Une interaction ancienne et très répandue

La symbiose mycorhizienne à arbuscules est une interaction entre la plupart des plantes terrestres et les champignons du sous-phylum des Glomeromycotina (Schüßler *et al.*, 2001; Spatafora *et al.*, 2017). Elle est considérée comme la symbiose la plus ancienne,

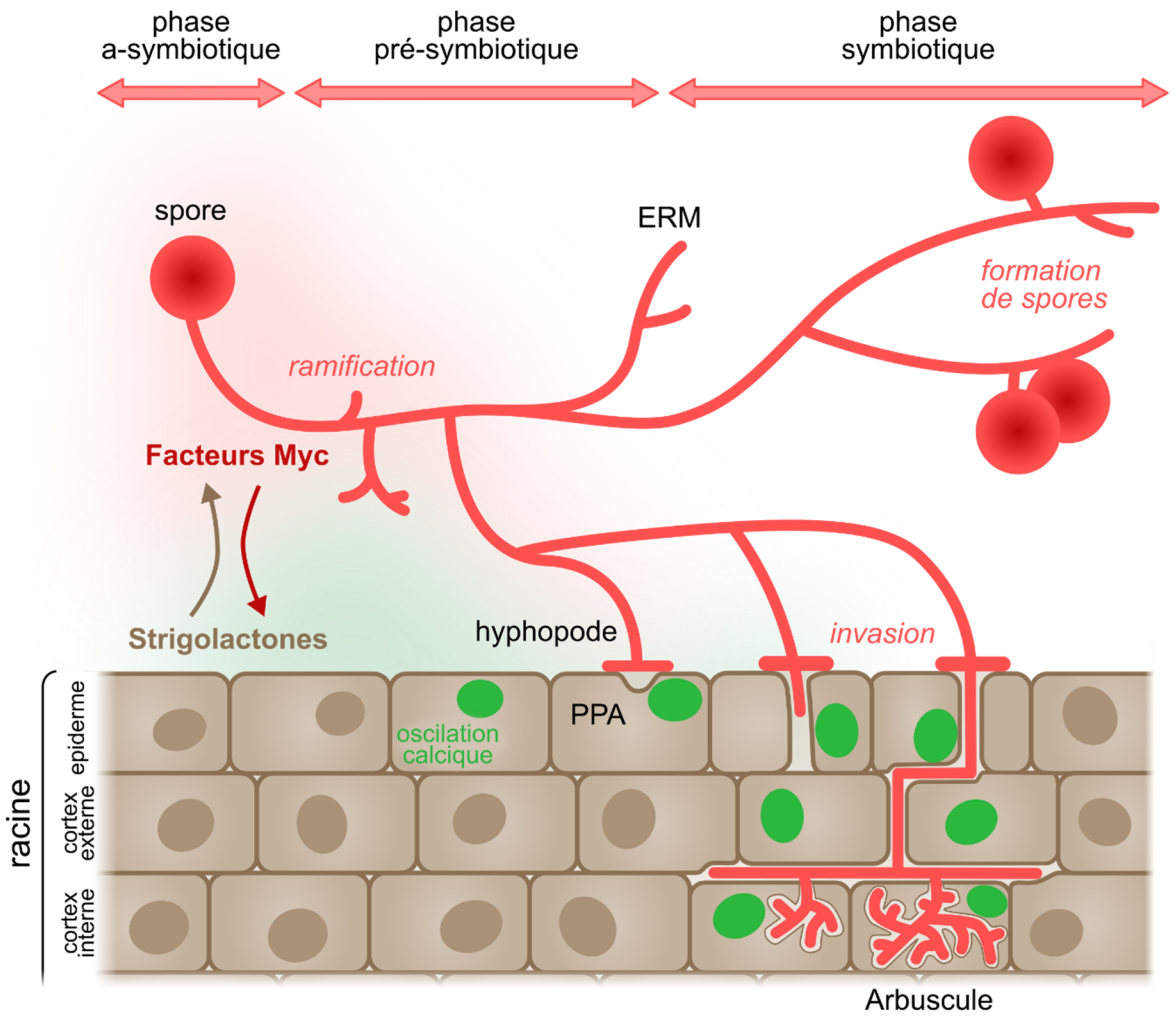


Figure 2 : Etablissement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules

La germination des spores est suivie de la croissance d'un tube germinatif à la recherche d'un partenaire végétal (phase a-symbiotique). La perception d'exsudats racinaires, principalement des strigolactones, induit une forte ramification des hyphes. Les CMAs exsudent des molécules chitiniques (les facteurs Myc : COs et LCOs), perçues par la plante. Ceci déclenche la voie de signalisation symbiotique commune (CSSP), induisant des oscillations calciques nucléaires et la transcription de gènes nécessaires à l'établissement de la symbiose (noyaux verts) (phase pré-symbiotique). Une fois au contact de la racine, le CMA forme une structure d'adhésion appelée hyphopode, et la membrane de la cellule épidermique s'invagine pour former l'appareil de pré-pénétration (PPA) afin de permettre l'invasion racinaire par le champignon. Le champignon est guidé à l'intérieur de la racine, et développe ses hyphes dans l'apoplasme jusqu'aux cellules corticales. La membrane plasmique des cellules corticales s'invagine formant avec le champignon des structures ramifiées appelées arbuscules, constituant le principal lieu d'échange de nutriments entre les deux partenaires (phase symbiotique). Grâce au carbone fournit par la plante, le mycélium extra-racinaire (ERM) se développe dans le sol et forme de nouvelles spores.

Adapté de (Parniske, 2008; Bonfante and Genre, 2010)

datée, à l'aide de données fossiles, de plus de 450 millions d'années (Remy *et al.*, 1994; Redecker, 2000), et coïncide avec l'émergence des plantes terrestres (Wellman *et al.*, 2003). Plusieurs auteurs proposent que les CMAs auraient favorisé la colonisation des sols par les plantes, grâce à la mise en place d'interactions symbiotiques (Pirozynski and Malloch, 1975; Rensing, 2020). Cette interaction est retrouvée chez de nombreuses plantes présentant des caractères ancestraux, telles que les plantes non vasculaires de la famille des anthocérotes et des hépatiques (Brundrett, 2002; Field *et al.*, 2012). Cette symbiose se distingue donc par son large spectre d'hôtes. Il est estimé que 72% des plantes terrestres sont capables de réaliser des interactions symbiotiques avec les CMAs (Brundrett and Tedersoo, 2018) et la perte de la capacité à mycorhizer serait associée à la perte de gènes indispensables à sa mise en place, comme par exemple chez la plante « modèle » *Arabidopsis thaliana* (Delaux *et al.*, 2014; Bravo *et al.*, 2016).

D'un point de vue phylogénétique, les Gloméromycètes (ou plus exactement les Glomeromycotina), comprenant l'ensemble des CMAs, font partie du phylum des Mucoromycota (Spatafora *et al.*, 2017), au sein des « *early diverging fungi* » (Berbee *et al.*, 2017). Les 250 espèces de Gloméromycètes sont réparties dans quatre ordres : les Archéosporales, les Paragloméralés, les Glomérales et les Diversisporales (Schüßler, 2002). *Rhizophagus irregularis*, notre CMA modèle, est issu des Glomérales, il a été le premier à avoir son génome séquencé (Tisserant *et al.*, 2013).

1.2 - Développement de la symbiose

1.2.1 - Phase a-symbiotique

Avant toute rencontre avec une plante, les spores des CMAs ont la capacité de germer seules dans le sol. Leur germination peut être déclenchée par des facteurs environnementaux, tels que des variations de température, d'humidité, de pH, ou encore la concentration en nutriments (Giovannetti, 2000), ou encore des signaux d'origine végétale comme les strigolactones, une hormone végétale dont le rôle sera détaillé ci-après. Un tube germinatif va alors se former à partir de l'hyphe porteur, puis se développer et se ramifier, en puisant dans les réserves énergétiques de la spore (Bécard *et al.*, 2004) (Figure 2 et 3A). En absence de partenaire végétal, l'hyphe germinatif va se septer et le cytoplasme se rétracter dans la spore, qui peut également re-sporuler et

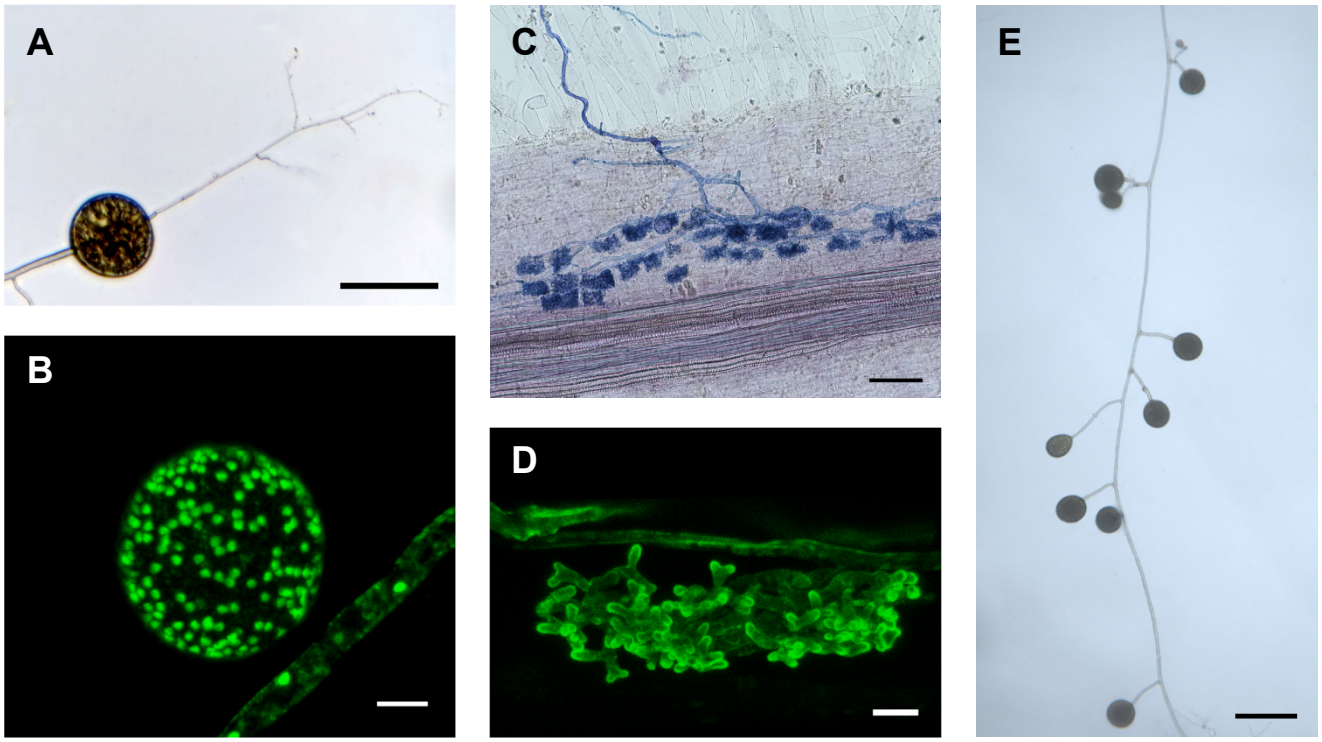


Figure 3 : Différentes structures fongiques typiques des CMAs

(A) Spore de *Rhizophagus irregularis* en germination (barre d'échelle = 60 µm). **(B)** Spore de *R. irregularis,* dont les noyaux sont marqués au SYTO10 et observée en microscopie à fluorescence (barre d'échelle = 10 µm). **(C)** Racine de *Medicago truncatula* mycorhizée par *R. irregularis*. Les structures fongiques sont marquées à l'encre de Schaeffer (barre échelle = 100 µm). **(D)** Arbuscule de *R. irregularis*, marqué au Wheat Germ Agglutin-Fluorescein isothiocyanate et observé en microscopie à fluorescence (barre d'échelle = 10 µm). **(E)** Spores de *R. irregularis* nouvellement formées (barre d'échelle = 100 µm).

Crédit : Aurélie Le Ru, Bruno Guillotin et (Tisserant *et al.*, 2013)

produire des spores plus petites (Hildebrandt *et al.*, 2002). Les réserves lipidiques des spores (Olsson and Johansen, 2000) permettent une autonomie énergétique pour la germination, mais permettent également aux spores de germer plusieurs fois successivement (Koske, 1981) favorisant ainsi les rencontres avec un hôte (Bécard *et al.*, 2004).

1.2.2 - Dialogue moléculaire, la phase pré-symbiotique

Initialement, il a été observé qu'au voisinage de la racine d'une plante hôte, les hyphes des CMAs se ramifient (Graham, 1982; Bécard and Piché, 1989*b*; Giovannetti *et al.*, 1996). La purification partielle des exsudats racinaires a permis de mettre en évidence une fraction contenant un « branching factor » (Buée *et al.*, 2000). Une purification de cette fraction, couplée à des analyses de biochimie analytique, telles que la spectrométrie de masse, ont permis de mettre en évidence que les Strigolactones (SLs) étaient des molécules actives sur le CMA (Akiyama *et al.*, 2005). Initialement remarquées par leur rôle stimulateur dans la germination des graines de plantes parasites (Cook *et al.*, 1972), elles ont aussi été identifiées plus tardivement comme des hormones végétales, capables d'inhiber le développement des bourgeons axillaires et donc la ramification des parties aériennes (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008). Aujourd'hui, les SLs sont connues pour jouer de très nombreux rôles physiologiques chez la plante (Yang *et al.*, 2019). Chez les CMAs, il est aujourd'hui clairement établi que les SLs sont capables, à elles seules, de provoquer la germination des spores et la ramification des hyphes, en stimulant l'activité mitochondriale et la synthèse d'ATP (Besserer *et al.*, 2006, 2008). Cette ramification étendue permettrait au champignon d'augmenter les chances de rencontre avec des racines hôtes afin d'établir la symbiose. Toutefois, les SLs ne sont pas indispensables à l'établissement de la symbiose puisque des mutants incapables de les synthétiser, bien que faiblement colonisés, sont toujours capables de mettre en place la symbiose (Gomez-Roldan *et al.*, 2008).

Les CMAs sont également capables de sécréter des molécules de signalisation, perçues par la plante et impliquées dans l'établissement de la symbiose. Généralement appelées « Myc-factor », ces molécules sont composées de fragments de chitines, un enchainement d'unités de β-1,4 N-Acétylglucosamines. Ce type de molécules, de la famille des chitines, qui composent les parois fongiques, a d'abord été identifié comme

sécrété par les bactéries rhizobiennes et indispensable à la signalisation et à l'initiation de la symbiose nodulaire, et appelé « Nod-factors » (Lerouge *et al.*, 1990; Gough and Cullimore, 2011). Ils ont été décrits comme des lipochito-oligosaccharides (LCOs). Des légumineuses mutantes dans la voie de signalisation des facteurs Nod présentent également un phénotype mycorhizien réprimé (Oldroyd, 2013). L'hypothèse que les CMAs produiraient également ce type de molécules, pour déclencher une voie de signalisation commune aux deux symbioses, appelée CSSP (Common Symbiotic Signalling Pathway) a alors été émise. Ainsi, des « Myc-LCOs » ont été caractérisés en tant que premiers signaux fongiques favorisant la symbiose (Maillet *et al.*, 2011). Les LCOs sont capables d'activer des gènes symbiotiques, de stimuler la formation des racines latérales et d'augmenter le taux de mycorhization (Maillet *et al.*, 2011; Camps *et al.*, 2015). En plus des LCOs, les CMAs produisent également des chito-oligosaccharides (COs) courts capables de déclencher également la CSSP et leur production est induite en réponse aux strigolactones (Genre *et al.*, 2013; Volpe *et al.*, 2020). De manière combinée, il a récemment été démontré que la perception des COs et des LCOs par la plante hôte favorise l'établissement de la symbiose mycorhizienne (Feng *et al.*, 2019). De plus, il a été montré que de nombreux champignons du sol sont capables de produire ces molécules chitiniques, pouvant stimuler la germination des spores et inhiber la ramification des hyphes secondaires (Rush *et al.*, 2020).

Les modes de perception des signaux symbiotiques par les CMAs restent encore à être explorés. Pour les plantes, la perception des COs et LCOs se fait à l'aide de récepteurs de type Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinase (LRR-RLK) (Zipfel and Oldroyd, 2017). Cette reconnaissance entraine des oscillations calciques dans le noyau (Kosuta *et al.*, 2008), qui sont décodées par des protéines kinases Ca^{2+}/calmoduline-dépendante (Hayashi *et al.*, 2010). Celles-ci vont alors moduler l'activité de facteurs de transcription et induire l'expression de gènes symbiotiques, pour permettre la mise en place de la symbiose (Yano *et al.*, 2008).

1.2.3 - Etablissement des structures fongiques

Une fois le contact établi entre les deux partenaires, plusieurs mécanismes rentrent en jeu pour permettre la colonisation des racines hôtes par les CMAs. Au contact des racines, les hyphes vont former une structure d'adhésion et de pénétration appelée

hyphopode, qui sera leur point d'entrée dans la racine (Genre *et al.*, 2005). Les cellules épidermiques, au contact de ces structures fongiques, vont opérer, de façon concomitante, une restructuration cellulaire pour accueillir le CMA, grâce au dialogue moléculaire précédemment établi. Un pont cytoplasmique est ainsi formé par remodelage du cytosquelette, formant un canal intracellulaire appelé appareil de pré-pénétration (PPA). Une fois le PPA formé, l'hyphe en contact avec la cellule épidermique va pouvoir franchir la paroi et être guidé au travers de l'épiderme vers les couches plus internes de la racine (Genre *et al.*, 2005). L'hyphe va alors se développer dans les espaces intracellulaires, jusqu'à atteindre les cellules corticales pour y former les arbuscules (Figure 2, 3C et D).

L'arbuscule est une structure fongique hyper-ramifiée qui s'établit au sein des cellules corticales, jusqu'à occuper la quasi-totalité du volume cellulaire. Les mécanismes cellulaires et moléculaires contrôlant l'élaboration de cette structure fongique sont encore largement méconnus. Du point de vue de la plante, il est toutefois établi que la formation de l'arbuscule, comme pour celle du PPA, qui est corrélée à une réorganisation structurale importante, est provoquée par une reprogrammation transcriptomique (Siciliano *et al.*, 2007). La membrane plasmique va s'invaginer pour permettre au champignon de se développer dans la cellule, sans pour autant lui permettre l'accès au cytoplasme (Genre *et al.*, 2008). L'arbuscule est alors contenu dans un nouvel espace apoplastique, appelé espace péri-arbusculaire, qui constituera l'interface principale d'échange entre les deux partenaires (Paszkowski, 2006) (Figure 4B). Ces évènements nécessitent un repositionnement de l'appareil de Golgi à proximité des structures fongiques (Pumplin and Harrison, 2009), permettant d'adapter et réguler l'extension de la membrane péri-arbusculaire en fonction du développement fongique (Genre *et al.*, 2012).

De nombreux gènes de plantes contrôlent la progression du champignon dans la racine et l'établissement des structures d'échanges. On peut par exemple citer des facteurs de transcription de la famille des GRAS, comme « Required for Arbuscular Mycorhization 1 » (RAM1), « Nodulation Specific Pathway 1 and 2 » (NSP1/2), DELLA1/2, « Reduced Arbuscular Devellopment 1» (RAD1) (Maclean *et al.*, 2017). D'autres gènes impliqués dans les réarrangements membranaire et cellulaire ont également été décrits comme EXO70I, SYP132, VAMP721, VAPYRIN (Harrison and

Ivanov, 2017). Enfin de nombreux gènes régulant le transport de nutriments pour les échanges symbiotiques ont été caractérisés (Maclean *et al.*, 2017), et seront décrits ci-après.

1.2.4 - Croissance extra-racinaire

Une fois que les premiers arbuscules se sont développés et que les échanges symbiotiques s'opèrent, le champignon va alors développer un réseau mycélien extra-racinaire (ERM) (Bago, 2000). Les hyphes vont se développer et croitre dans le sol à la recherche de nutriments à fournir à la plante en agissant comme une extension des racines. En fonction de l'environnement, on peut retrouver entre 2 et 100 mètres de mycélium de CMA par gramme de sol, ou jusqu'à plusieurs centaines de mètres d'hyphes par mètre de racine hôte colonisée (Leake *et al.*, 2004). Comme les ERM explorent un volume de sol bien plus important que les racines et que leur surface totale d'échange avec leur environnement est bien plus grande, ils captent plus efficacement les nutriments (Leake *et al.*, 2004; Sawers *et al.*, 2017), qu'ils pourront échanger par la suite.

Les ERM ont également la capacité de coloniser une ou plusieurs plantes hôtes formant un réseau mycélien commun (CMN) (Selosse *et al.*, 2006). Deux plantes distinctes peuvent alors être interconnectées par le biais d'un seul et même champignon, permettant l'étude d'échanges tripartites. Un transfert de carbone entre deux plantes par le biais d'un CMN ectomycorhizien a par exemple été observé (Simard *et al.*, 1997; McKendrick *et al.*, 2000). Dans le cas des endomycorhizes, l'importance du CMN comme vecteur d'information, en cas d'attaque pathogène (champignon nécrotrophe, insectes) a pu être mis en évidence : le CMN permet un transfert d'information, de nature encore inconnue, entre une plante attaquée par le champignon pathogène *Altenaria solani*, ou différents insectes herbivores tels que des larves de *Manduca sexta*, de *Spodoptera litura* ou *Acrythosiphon pisum,* et une plante saine distante (*Lycopersicon esculentum, Nicotiana attenuata, Vicia faba*), permettant à cette dernière d'activer préemptivement les mécanismes de défense pour y faire face (Song *et al.*, 2010, 2015, 2019; Babikova *et al.*, 2013). Les CMAs peuvent donc jouer un rôle bien plus vaste que celui de simple biofertilisant et permettre aux différentes plantes d'interagir, grâce à eux, comme une communauté à part entière.

Pour finir, grâce aux ressources carbonées fournies par la plante hôte, le CMA va pouvoir produire de nouvelles spores au niveau des ERM, qui pourront germer à leur tour et ainsi poursuivre le cycle de vie du CMA (Bago *et al.*, 1998; Fortin *et al.*, 2005) (figure 2 et 3E).

1.3 - Echanges symbiotiques entre la plante et le champignon

Les échanges bidirectionnels de nutriments entre les deux partenaires sont au cœur de la symbiose mycorhizienne à arbuscules (Figure 4). Les CMAs sont des biotrophes obligatoires et ne peuvent pas se développer sans cette interaction, tandis que la plante bénéficie d'un avantage nutritif qui améliore sa croissance et sa résistance aux stress.

1.3.1 - Des échanges allant du champignon vers la plante…

Chez les plantes, comme chez tous les autres organismes vivants, le phosphore sert à la fabrication d'acides nucléiques, de membranes et joue un rôle dans le métabolisme énergétique et dans les processus de signalisation cellulaire. Sa disponibilité influence donc grandement le développement des plantes. Dans les sols, le phosphore est largement présent sous forme insoluble, non assimilable par les plantes (Schachtman *et al.*, 1998). Le phosphate inorganique (Pi) est en revanche assimilable par la plante, et est généralement retrouvé en concentrations suffisantes (>10 µM) (Bieleski, 1973). Cependant, il s'agit d'un élément peu mobile, et une zone de carence va se développer à proximité des racines au fur et à mesure que celles-ci l'assimilent (Schachtman *et al.*, 1998). En revanche, comme les CMAs explorent un volume de sol bien plus important, ils sont capables d'assimiler du phosphate -alors inaccessible pour la plante- supposément par le biais de transporteurs exprimées dans les ERM (Benedetto *et al.*, 2005; Fiorilli *et al.*, 2013) (Figure 4A). Cette assimilation est réalisée en synergie avec des bactéries capables de solubiliser le phosphore minéral, le rendant accessible aux CMAs (Zhang *et al.*, 2016). Le phosphate est ensuite transporté par voie vacuolaire, sous forme de polyphosphate jusqu'au lieu d'échange avec la plante (Hijikata *et al.*, 2010). Dans les arbuscules, les polyphosphates sont dépolymérisés, et le Pi est libéré dans l'espace péri-arbusculaire (Ezawa *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2013). L'import du Pi par la plante est réalisé à l'aide de transporteurs spécifiquement exprimés dans la membrane péri-arbusculaire, tels que

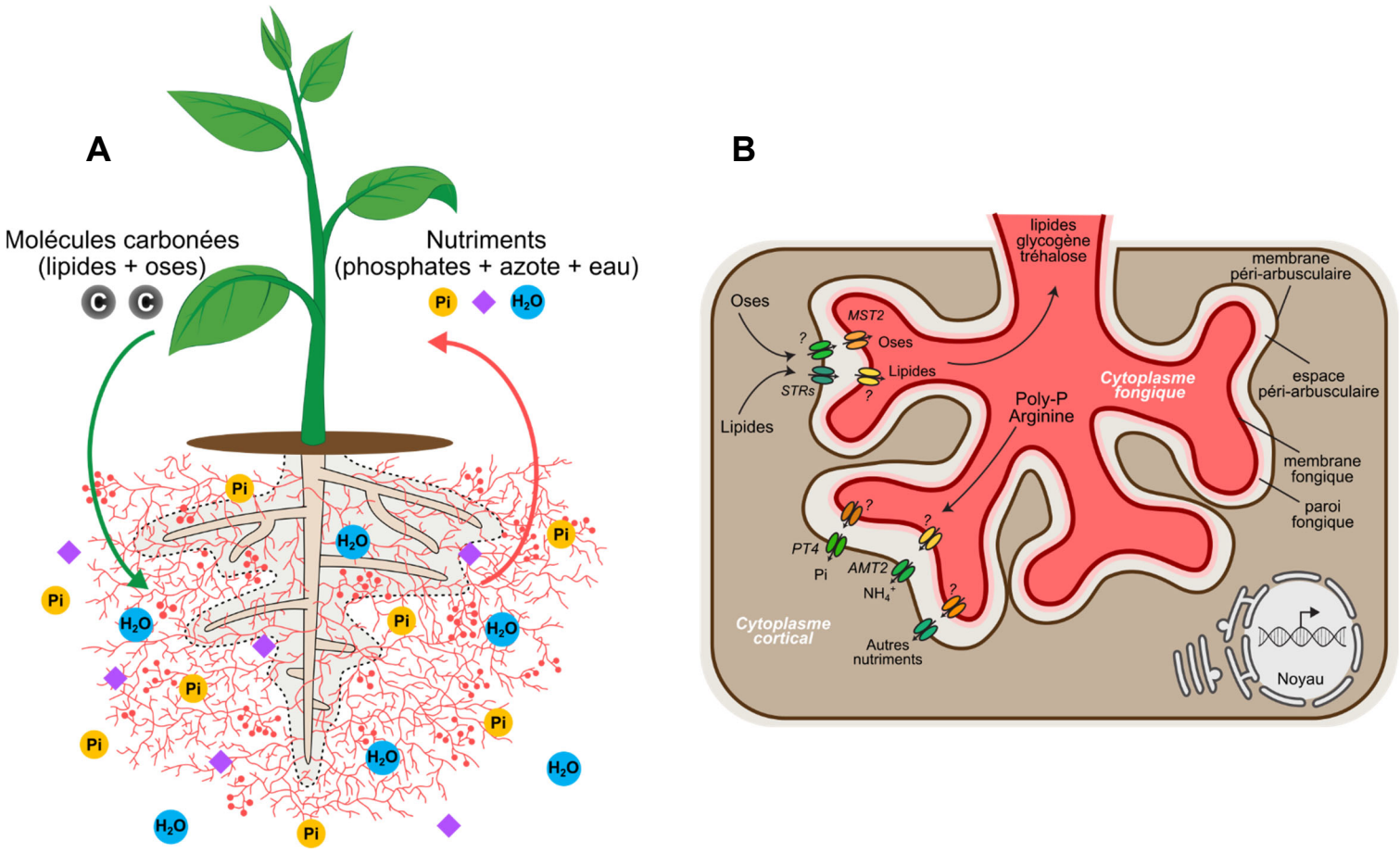


Figure 4 : Echanges trophiques entre la plante et les CMAs

(A) Le champignon développe dans le sol un réseau d'hyphes extra-racinaires (ERM), lui permettant d'assimiler de l'eau et des nutriments (principalement phosphore et azote) hors d'atteinte pour les racines seules. Il les transfère à la plante et reçoit en retour des molécules carbonées issues de la photosynthèse. **(B)** Schéma des échanges ayant lieu dans les cellules arbusculaires. L'arbuscule est contenu dans la cellule corticale par la membrane plasmique qui s'est invaginée, pour former l'espace péri-arbusculaire. C'est dans cet espace que le champignon relache pour la plante du phosphate et de l'azote (initialement convertis respectivement en poly-phosphate et en arginine, pour leur transport). De même, la plante transfère dans cet espace des oses et des lipides que le champignon importe et stocke sous forme de tri-glycérides, glycogène et tréhalose. Ils sont échangés à l'aide de transporteurs spécifiques végétaux (PT4 pour le phosphate, AMT2 pour l'azote, ou des ABC transporteurs tels que STRs pour les lipides) ou fongiques (MST2 pour les oses).

Adapté de (Luginbuehl and Oldroyd, 2017)

MtPT4, ou OsPT11 (Harrison *et al.*, 2002; Paszkowski *et al.*, 2002; Javot *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2012) (Figure 4B). Le phosphate est l'élément principal échangé par le champignon durant la symbiose et le CMA peut fournir, en fonction des espèces, jusqu'à 90% des besoins en phosphore de la plante (van der Heijden *et al.*, 2008).

L'azote est également un des éléments fournis par les CMAs à leur plante hôte. Bien que plus mobile que le phosphate dans le sol, son assimilation par le champignon plutôt que par les racines sera privilégiée par la plante (Kobae *et al.*, 2010; Koegel *et al.*, 2013). L'affinité des transporteurs d'ammonium fongiques est plus importante que celle observée chez les plantes et permet l'assimilation d'azote même en faible concentration (Pérez-Tienda *et al.*, 2012). L'azote est transporté jusqu'aux arbuscules sous forme d'arginine, pour y être relâché dans l'espace péri-arbusculaire (Govindarajulu *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2010). Il est alors assimilé par la plante hôte via des transporteurs localisés dans la membrane péri-arbusculaire (Koegel *et al.*, 2013; Breuillin-Sessoms *et al.*, 2015) (Figure 4B).

Pour finir, l'eau fait également partie des apports du champignon à la plante. En effet, la symbiose a pour effet d'augmenter la résistance des plantes mycorhizées face au stress hydrique (Augé, 2001). Deux aquaporines fongiques ont été identifiées et caractérisées. Elles sont exprimées dans les ERM et les cellules arbusculaires et leur expression est stimulée en cas de stress hydrique (Li *et al.*, 2013). Côté plante, on retrouve également des aquaporines dans les membranes des cellules arbusculaires (Giovannetti *et al.*, 2012), laissant penser qu'un transport actif d'eau entre les deux partenaires symbiotiques peut avoir lieu.

1.3.2 - … et de la plante vers le champignon

En échange des nutriments que les CMAs lui fournissent, la plante fournit l'entièreté des besoins carbonés du champignon. Cette contribution représente jusqu'à 20% du carbone fixé durant la photosynthèse (Bago *et al.*, 2000). Ce transfert était initialement considéré comme étant uniquement de nature glucidique. Le transfert direct d'hexose et l'expression d'un transporteur fongique de forte affinité dans les hyphes intracellulaires et les arbuscules, ont été démontrés (Pfeffer *et al.*, 1999; Helber *et al.*, 2011). Le champignon reçoit du glucose et du fructose, qu'il stocke sous forme de glycogène et de tréhalose (Bécard *et al.*, 1991; Bago *et al.*, 2003) (Figure 4B). De plus,

plusieurs transporteurs de sucre indispensables au maintien de la symbiose sont exprimés dans les arbuscules (Zhang *et al.*, 2010; Gutjahr *et al.*, 2012; Wipf *et al.*, 2019). Des données génomiques récentes ont révélé que les Gloméromycètes ont perdu le gène codant pour l'enzyme responsable de la biosynthèse des lipides, la fatty acid synthase (FAS) (Wewer *et al.*, 2014; Ropars *et al.*, 2016; Rich *et al.*, 2017). Or, les CMAs stockent majoritairement des lipides dans leurs spores, jusqu'à 70% de leur poids sec (Beilby and Kidby, 1980). Récemment, le transfert direct de lipides entre la plante hôte et son symbionte a pu être mis en évidence (Jiang *et al.*, 2017; Luginbuehl *et al.*, 2017; Keymer *et al.*, 2017) (Figure 4B). Les CMAs sont donc auxotrophes aux acides gras, que la plante est en mesure de leur fournir. Toutefois, les CMAs possèdent les fatty acid elongases et desaturases nécessaires pour permettre l'élongation et la désaturation des lipides fournis par la plante, ainsi que toutes les enzymes impliquées dans la ß-oxydation indiquant que leur mobilisation en tant que source de carbone et d'énergie est possible (Trépanier *et al.*, 2005; Tisserant *et al.*, 2012; Wewer *et al.*, 2014). La biotrophie obligatoire de ces champignons pourrait donc principalement être due à la perte de la FAS. Par ailleurs, le transfert de molécules complexes, comme potentiellement les mono-acyl glycerols (Rich *et al.*, 2017), suggère que d'autres molécules de taille similaire pourraient être également échangées par les deux partenaires durant la symbiose.

1.4 - Particularité, défi, et importance de l'étude des champignons endomycorhiziens à arbuscules

1.4.1 - Particularités notables des CMAs

Les champignons endomycorhiziens à arbuscules sont des organismes avec des particularités qui les rendent complexes à étudier. Comme présenté précédemment, les CMAs sont des organismes biotrophes obligatoires : leur croissance dépend intégralement des interactions symbiotiques avec leur hôte. Il est aujourd'hui impossible de produire des spores et du mycélium sans que le CMA soit en interaction avec une plante hôte. Récemment, la production *in vitro* de nouvelles spores de *R. irregularis*, sans que celui-ci soit en interaction avec une plante, a été accomplie (Kameoka *et al.*, 2019; Abdellatif *et al.*, 2019). Pour cela, les auteurs de ces études ont enrichi le milieu de culture avec différents lipides, comme l'acide (S)-12-methyltetradecanoique, l'acide

palmitoléique, le L-α-dimyristoylphosphatidyl-choline et –ethanolamine, ou en utilisant des souches bactériennes de *Variovorax paradoxus*, ce qui a permis d'induire la re-sporulation de spores mères de *R. irregularis* en spores filles. Cependant, celles-ci sont d'un diamètre plus petit que la spore mère et présentent des taux de germination plus faibles (Kameoka *et al.*, 2019). Ces nouveaux milieux de culture ne permettent donc pas une production de masse de spores de CMA en absence d'un partenaire végétal.

Un système de culture a été développé pour permettre la production de matériel fongique, en utilisant des racines de carottes transformées par *Agrobacterium rhizogenes* (Mugnier and Mosse, 1987). Cette rhizobactérie possède un ADN de transfert qui peut être intégré de façon stable dans le génome de la plante cible (Chilton *et al.*, 1982), induisant une croissance indéfinie des racines transformées, même en absence de parties aériennes, si du sucre est fourni dans le milieu de culture. Ces racines transgéniques sont appelées « hairy roots ». Cette propriété peut être exploitée pour créer un système de culture *in vitro*, axénique, en inoculant des hairy roots avec des spores de CMA, pour produire en quantité des spores et du mycélium (Chabot *et al.*, 1992; St-Arnaud *et al.*, 1996; Declerck *et al.*, 1996) (Figure 5). Les racines sont cultivées dans des boîtes de Petri à double compartiment (DC) : elles vont pouvoir se développer dans le premier compartiment, mais la barrière physique les isole du deuxième compartiment. En revanche, après colonisation des hairy roots, des ERM vont eux pouvoir franchir la séparation physique, et coloniser le deuxième compartiment. Ce système permet d'isoler d'un côté un compartiment contenant les racines mycorhizées et de l'autre des ERMs qui forment des spores. Malgré une croissance lente, les cultures DC permettent d'obtenir un matériel vierge de toute contamination d'origine végétale. On peut alors en collecter les spores nouvellement formées pour étudier ultérieurement leur germination, la croissance des hyphes germinatifs, leur réponse à différents traitements, et leur aptitude à coloniser une nouvelle plante hôte.

In vitro, en absence de plante hôte, la croissance des hyphes germinatifs est cependant limitée à quelques jours seulement (Smith and Read, 2008) et le métabolisme fongique reste dormant jusqu'à la perception des signaux symbiotiques d'origine végétale (Besserer *et al.*, 2006).

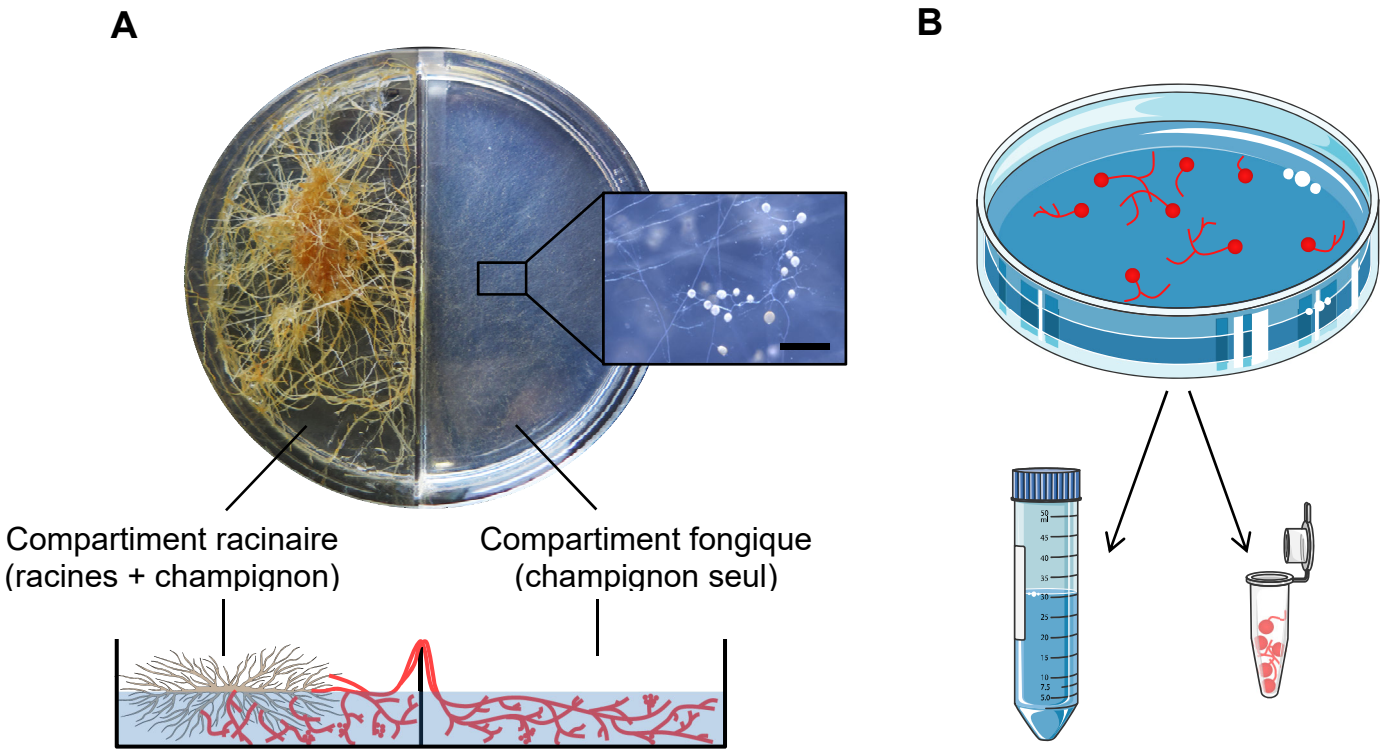


Figure 5 : Systèmes de culture et de germination des CMAs

(A) Système de culture des CMAs *in vitro* dans des boîtes à double compartiment (DC). Des racines de carotte transformées « hairy roots » sont inoculées avec des spores de *R. irregularis* dans le premier compartiment de la boîte, séparé du second par une barrière physique. Les racines ne peuvent pas franchir cette barrière, à l'inverse des ERM qui pourront se développer et produire des spores dans le compartiment fongique, tout en restant connectés à leur hôte (barre d'échelle = 500 µm). En haut, photo d'une boîte vue de dessus, avec un agrandissement du compartiment fongique (barre d'échelle = 500 µm), obtenue après plusieurs mois de co-culture. En bas, schéma d'une coupe d'une boîte, dont les racines sont représentées en marron et noir, et le champignon en rouge. **(B)** Production des exsudats de spores germées (GSE). Après rinçage du tampon de stockage, 10 000 spores sont mises à germer dans 25 mL d'eau Milli-Q pendant 7 jours. Les exsudats et les spores sont ensuite collectés indépendamment pour être analysés.

Dans les boîtes DC, les ERM peuvent être considérés comme un compartiment « fongique ». Il est toutefois important de noter que les ERM sont toujours reliés à leur plante hôte et que les échanges symbiotiques ont toujours lieu. Des molécules d'origine végétale peuvent être importées par le champignon et transférées dans le compartiment fongique. De même, lorsque les spores sont formées, elles sont connectées à un hyphe porteur et reliées à leur hôte. Dès lors, quand nous travaillons avec des spores axéniques, celles-ci peuvent exsuder des molécules fournies par la plante et stockées dans les spores. Il est également important de prendre en compte que l'import de molécules carbonées à partir du milieu de culture par les CMAs est très limité. Bien que l'assimilation de glucose ou d'acétate exogène par des spores en germination ait été rapportée (Bücking *et al.*, 2008), celle-ci est peu efficace. La source principale de carbone des CMAs provient des échanges avec la plante.

Les CMAs sont des champignons cœnocytiques, c'est-à-dire que les hyphes sont non cloisonnés. Plusieurs centaines de noyaux coexistent et circulent dans un même cytoplasme. De même pour les spores, certaines peuvent contenir plusieurs milliers de noyaux (Bécard and Pfeffer, 1993; Hosny *et al.*, 1998; Tisserant *et al.*, 2013) (figure 3B). Même si une transformation stable pourrait être réalisée en isolant des noyaux dans des protoplastes, la biotrophie obligatoire de ce champignon empêchera le développement de ce fragment isolé. A ce jour, aucune transformation génétique stable de CMA n'as pu être réalisée, bien que des transformations transitoires ont pu être obtenues, avec des efficacités très faibles, à l'aide de transformations médiées par *Agrobaterium tumefaciens* et par transformation biolistique (Forbes *et al.*, 1998; Helber and Requena, 2007). Ceci explique le faible nombre de gènes fongiques caractérisés au niveau fonctionnel, impliqués dans l'établissement de la symbiose, alors que de nombreux mutants de plantes ont permis d'identifier et de caractériser différents processus régulés par l'hôte. Il existe malgré tout des outils nous permettant de contourner ces limitations et de réprimer l'expression de gènes fongiques. La stratégie de « Host-Induced Gene Silencing » (HIGS) permet d'exploiter la machinerie de production d'ARN interférant de la plante, après transformation de ses racines, pour exprimer une structure tige boucle d'intérêt, qui sera maturée en ARNi pour cibler un transcrit fongique. Cependant, cette stratégie n'a montré son efficacité que sur quelques gènes fongiques uniquement (Helber *et al.*, 2011; Tsuzuki

et al., 2016; Sun *et al.*, 2018; Voß *et al.*, 2018; Hartmann *et al.*, 2020). La stratégie comparable du « Virus-Host-Induced Gene Silencing » (VHIGS), utilise l'infection d'une plante hôte et ses mécanismes de défense face à un virus génétiquement modifié pour cibler un transcrit fongique (Kikuchi *et al.*, 2016). Bien que le succès de ces techniques semble variable, et leur application lourde, ces approches ont tout de même permis de mettre en évidence le rôle de gènes fongiques clés dans la symbiose, tel que le transporteur de sucre MST2.

1.4.2 - Choix de l'organisme d'intérêt

Durant ce projet nous avons choisi d'utiliser *Rhizophagus irregularis* (anciennement *Glomus intraradices*) comme CMA modèle. Pour nos besoins expérimentaux, nous avons eu besoin d'utiliser de grandes quantités des spores axéniques, vierges de toutes traces de tissu végétal. Parmi les différents CMAs modèles utilisés dans d'autres travaux, tels que *Gigaspora rosea* ou *gigantea*, *Funeliformis mossae*, ou encore *Rhizophagus clarus*, *R. irregularis* a vu son génome être séquencé en premier (Tisserant *et al.*, 2013) et présente l'avantage d'être l'espèce la plus performante pour la production de spores *in vitro* (Bécard and Fortin, 1988; Bécard and Piché, 1989*a*; Chabot *et al.*, 1992; St-Arnaud *et al.*, 1996). Cette propriété est exploitée par un partenaire industriel local, Agronutrition, pour produire et vendre des inocula stériles de *R. irregularis*. Un partenariat privilégié (ANR Mycormones, coordonnée par Dr Soizic Rochange au LRSV) a été établi avec cette société, ce qui nous permet de bénéficier de millions de spores stériles pour nos recherches. Toutefois, chaque lot de spores est unique, et continue d'évoluer durant son stockage indépendamment des autres lots. Nous avons donc pu observer des différences de réponses mycorhizienne ou métabolique en fonction des lots analysés.

Durant cette thèse, nous avons choisi de travailler principalement avec des spores axéniques isolées, plutôt qu'avec des ERM en interaction symbiotique. Celles-ci permettent l'étude de molécules d'origine fongique, comme cela a été réalisé pour l'identification des LCOs (Maillet *et al.*, 2011), sans pour autant risquer la contamination des échantillons par des molécules d'origine végétale.

1.4.3 - Impact et utilisation de la mycorhize en agriculture durable

Grace aux échanges de nutriments qu'ils réalisent avec leur hôte, les CMAs peuvent être considérés comme des biofertilisants naturels. Comme présenté précédemment, les CMAs participent entre autre à la nutrition phosphatée et azotée de la plante, et la mycorhize permet un rendement plus important de la plante hôte (Koide *et al.*, 2000). Les engrais chimiques utilisés en agriculture intensive sont responsables de la pollution des cours d'eau et des nappes phréatiques, tout en étant disponibles de manière limitée et/ou nécessitant des coûts importants pour leur production. La production alimentaire est aujourd'hui dépendante de la disponibilité de ces ressources, mais la promotion d'une agriculture durable et responsable, exploitant les propriétés des CMAs, pourrait permettre de diminuer l'apport d'engrais chimiques. De même, la symbiose a un impact positif sur la résistance des plantes face à un stress hydrique modéré (Augé, 2001). Les dérèglements climatiques que nous observons depuis un siècle vont induire une diminution de la disponibilité en eau et des périodes de sècheresse seront de plus en plus fréquentes (Dai, 2011). La promotion de l'exploitation des mycorhizes en agriculture devrait permettre une meilleure résistance des cultures face à ces évènements climatiques (Compant *et al.*, 2010; Berruti *et al.*, 2016; Begum *et al.*, 2019). Bien sûr, la seule contribution de ces champignons sera insuffisante pour contrer l'ensemble des conséquences négatives directement et indirectement induites par le réchauffement climatique.

Il est également important de noter que la relation symbiotique entre les CMAs et les plantes permet une meilleure résistance de ces dernières face à des attaques de pathogènes (Whipps, 2004; Pozo and Azcón-Aguilar, 2007). Cet effet peut être dû à une nutrition améliorée des plantes, à l'influence des exsudats symbiotiques sur la rhizosphère, à la signalisation médiée par le réseau mycélien, ou encore à une induction des défenses initiée par la colonisation fongique (Hassan Dar *et al.*, 1997; Kasiamdari *et al.*, 2002; Whipps, 2004; Babikova *et al.*, 2013).

En considérant l'ensemble des avantages fournis par les CMAs (Berruti *et al.*, 2016; Begum *et al.*, 2019), leur exploitation pour une agriculture durable semble évidente. Cependant, leur promotion demande de mettre en place des expériences en champ qui démontreraient leur efficacité afin d'adapter les pratiques de culture actuelles. Enfin, si nous voulons utiliser efficacement et sur le long terme la symbiose endomycorhizienne

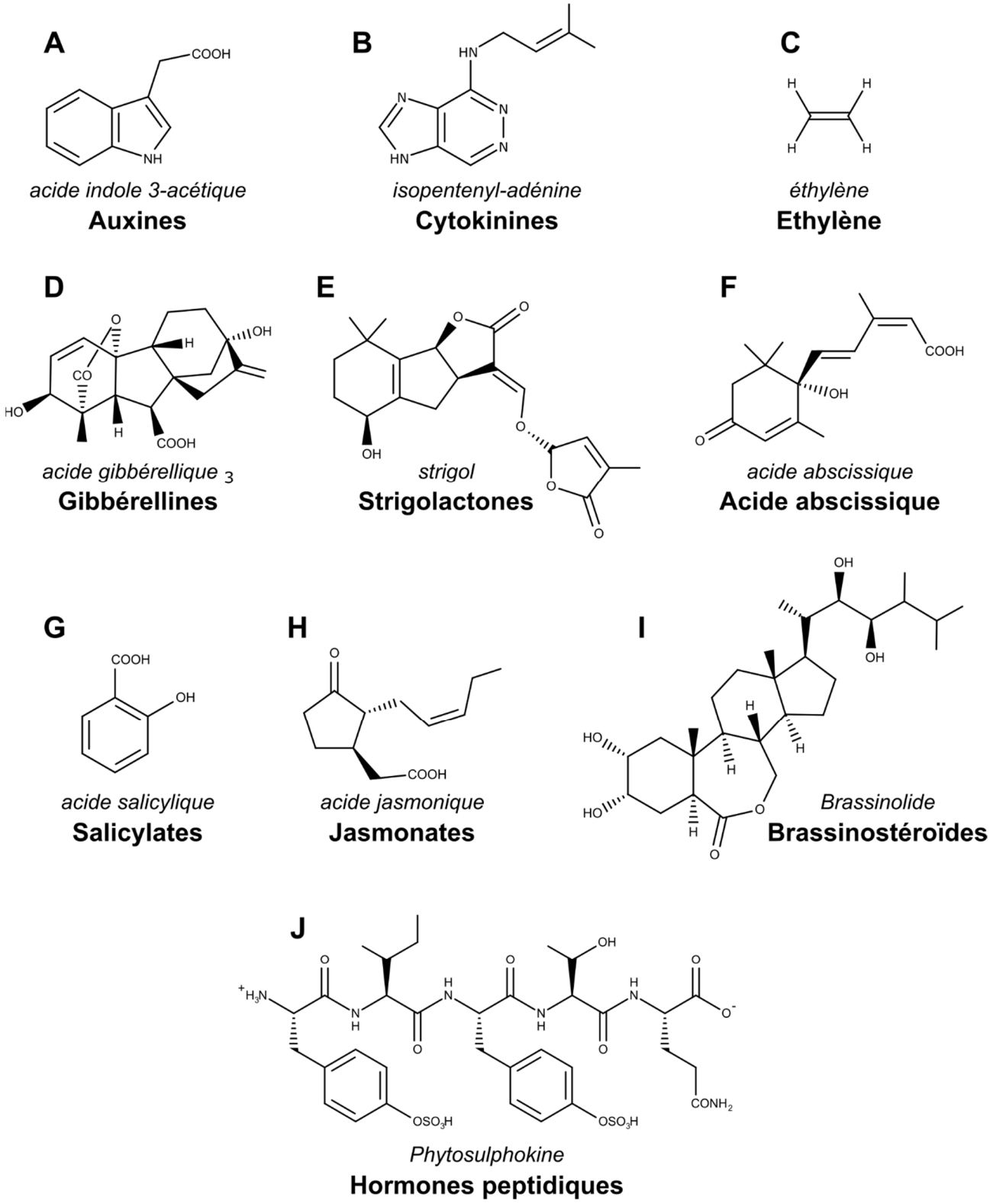


Figure 6 : Les hormones végétales

Représentation d'une structure caractéristique de chacune des neuf familles d'hormones végétales. Le nom de chaque molécule est précisé en italique, ainsi que le nom de la famille hormonale en gras.

pour une production agricole durable et respectueuse de l'environnement, une meilleure compréhension de la biologie de cette interaction est indispensable (Gosling *et al.*, 2006). En apportant de nouvelles connaissances sur les CMAs, ce travail de thèse s'inscrit donc dans cet objectif.

2 - Les hormones végétales

Les hormones sont des molécules de signalisation, synthétisées par un organisme et agissant à faible concentration. Elles régulent la physiologie, le développement et les réponses de cet organisme face aux différents stress biotiques et abiotiques. Chez les plantes, neuf familles de phytohormones différentes ont été identifiées et caractérisées (Figure 6), issues de différentes voies de biosynthèse (Figure 7), et chacune participe à différents rôles, de la germination des graines, jusqu'à la senescence des fruits.

2.1 - Fonctions, structures et voies métaboliques des hormones végétales

2.1.1 - Auxines

La famille des auxines (IAAs) est la première classe d'hormone végétale à avoir été identifiée comme telle (Went, 1926; Went and Thimann, 1937). Les auxines jouent de nombreux rôles dans le développement de la plante, contrôlant principalement certaines étapes de la division, l'élongation et la différenciation cellulaire dans la mise en place du système racinaire et des parties aériennes de la plante (Den Boer and Murray, 2000; Benková *et al.*, 2003; Overvoorde *et al.*, 2010; Sauer *et al.*, 2013). L'acide indole-3-acétique (IAA) (Figure 6A) est la forme active d'auxine la plus communément trouvée et étudiée chez les plantes, mais d'autres formes naturelles et biologiquement actives comme l'acide indole-3-butyrique, l'acide 4-chloroindole-3-acétique ou l'acide phénylacétique sont également retrouvées (Sauer *et al.*, 2013). Il existe également plusieurs formes conjuguées avec des sucres ou des acides aminés, pour permettre l'inactivation et le stockage des formes initialement actives (Korasick *et al.*, 2013). La synthèse de l'IAA fait intervenir le tryptophane en tant que précurseur (Figure 7), mais plusieurs voies peuvent aboutir à sa biosynthèse. La voie de l'acide indole-3-pyruvic

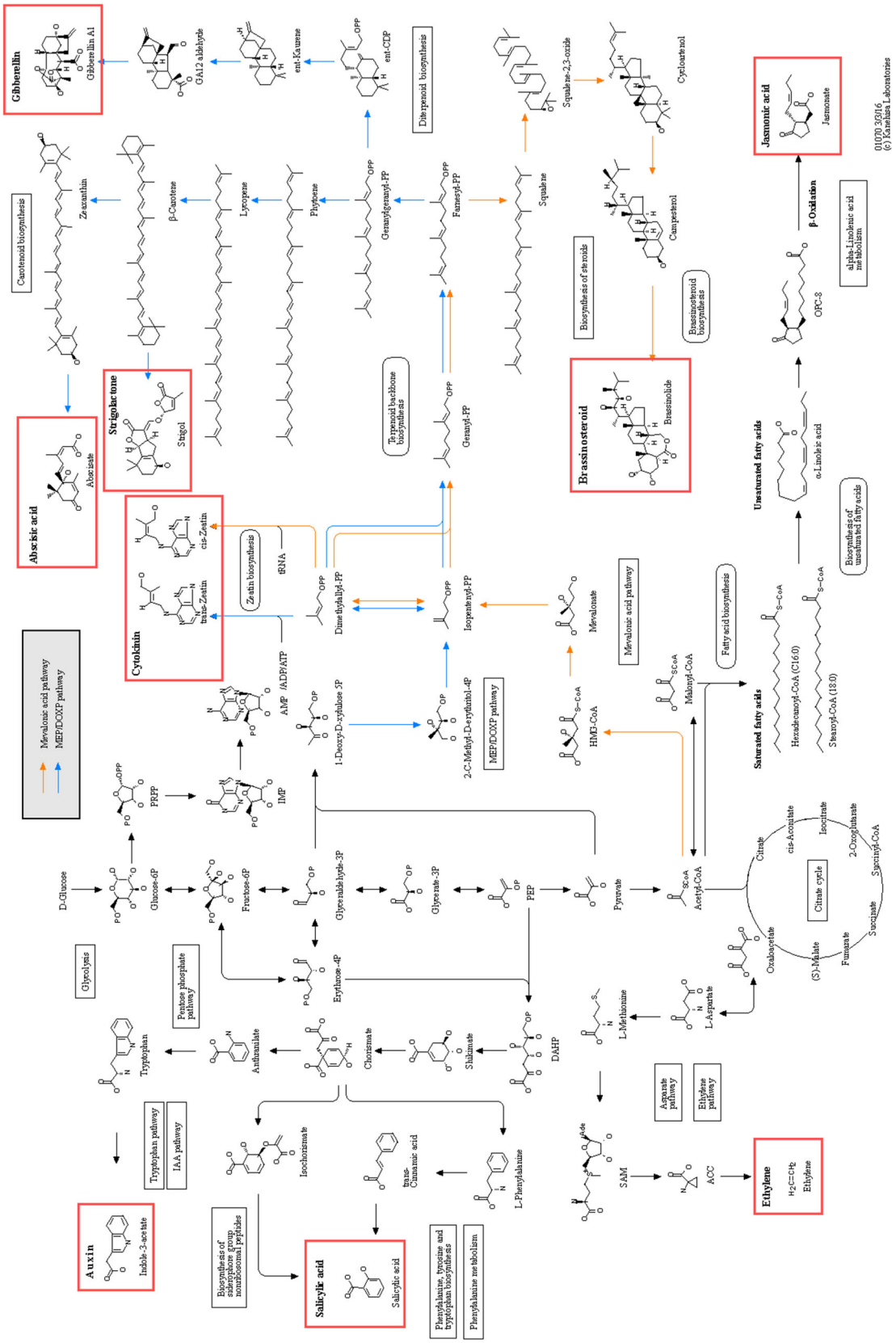


Figure 7 : Voies des biosynthèses végétales des phytohormones

Carte KEGG de la biosynthèse des phytohormones par les plantes.

Issu de genome.jp/kegg/ - Kanehisa Laboratories

(IPyA), qui semble être la voie principalement utilisée par les plantes pour la biosynthèse d'IAA, nécessite l'action successive de deux enzymes, une tryptophane aminotransferase, et une flavine mono-oxygénase de la famille YUCCA (Zhao, 2012). La voie de l'indole-3-acetaldoxime (IAox) quant à elle requiert l'action d'enzymes cytochromes P450 mono-oxygénases, CYP79B 2 et 3, et permet également de produire de l'auxine par la voie de l'indole-3-acétamide (IAM) (Sugawara *et al.*, 2009), mais l'ensemble des enzymes impliquées dans ces deux dernières voies n'ont pas encore été caractérisées. Enfin, il existe une voie de biosynthèse « tryptophane indépendant », médiée par une indole synthase cytosolique, mais le reste des acteurs enzymatiques demeure encore inconnu (Wang *et al.*, 2015).

2.1.2 - Cytokinines

La famille des cytokinines (CKs) est impliquée dans la division cellulaire, dans le développement des parties aériennes, l'inhibition du développement des racines secondaires, et régule d'autres processus développementaux comme le développement vasculaire, des gamétophytes, des feuilles et leur senescence (Den Boer and Murray, 2000; Kyozuka, 2007; Kieber and Schaller, 2014). Généralement, cette famille agit de façon antagoniste avec la famille des auxines (Kurepa *et al.*, 2019). Les CKs sont des dérivés isoprénylés de l'adénine. L'adénine est substituée en N^6 par une chaine isoprénoïde hydroxylé ou non (sous-famille des Zéatines (Z) ou isopentenyl-adénine (iP) (figure 6B), les formes les plus abondantes naturellement), mais peut également être substituée par des cycles aromatiques (Sakakibara, 2006). La biosynthèse des CKs est issue de l'isoprénylation d'une molécule d'ATP, ADP ou AMP par le diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP), médié par une isopentényle-transférase (IPT) (Kakimoto, 2001), pour donner une CK type iP (figure 7). L'intermédiaire réactionnel formé peut également être hydroxylé par une cytokinine trans-hydroxylase de la famille de cytochromes P450 mono-oxygénases, pour donner par la suite des CKs type Z (*trans*-zéatine (*tZ*) ou dihydrozéatine (DHZ)) (Takei *et al.*, 2004). Les CKs ribo-phosphatées sont ensuite converties en CKs actives libres *via* l'enzyme Lonely Guy (LOG) qui clive le ribo-phosphate (Kurakawa *et al.*, 2007). Il existe également une voie de biosynthèse alternative des CKs, issue de l'isoprénylation d'ARN de transfert (Vreman *et al.*, 1972). L'action de la tRNA-IPT (Golovko *et al.*, 2002), puis de LOG permet d'obtenir l'isomère

cis de la zéatine, qui peut être retrouvé par exemple dans le maïs ou le pois-chiche (Emery *et al.*, 1998; Veach *et al.*, 2003) (figure 7). De la même manière que les IAAs, les CKs peuvent être conjuguées avec des sucres, pour désactiver les CKs actives et les stocker, mais également pour les transporter à longue distance (Hou *et al.*, 2004; Kudo *et al.*, 2010).

2.1.3 - Ethylène

L'éthylène (ET) est une phytohormone responsable de la maturation des fruits, la floraison, le développement et l'abscission des feuilles et plus généralement de la senescence, mais joue également un rôle dans la réponse face à des stress biotiques et abiotiques (Hunter *et al.*, 1999; Ogawara *et al.*, 2003; Khan, 2005; Barry and Giovannoni, 2007; Abeles *et al.*, 2012; Shin *et al.*, 2014; Valluru *et al.*, 2016; Zapata *et al.*, 2017). Structuralement parlant, l'éthylène est l'hormone la plus simple : il s'agit du plus petit des alcènes, composé uniquement de deux atomes de carbone et quatre d'hydrogène (Figure 6C). Cependant, sa biosynthèse par les plantes est réalisée par un processus enzymatique complexe, où les deux premiers métabolites nécessaires sont produits dans le cycle de Yang (Yang and Hoffman, 1984; Pech *et al.*, 2010). La méthionine, principal précurseur de biosynthèse de l'éthylène, est métabolisée en S-adénosylmethionine (SAM) par la SAM synthétase, qui est à son tour métabolisée en acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) par l'ACC synthase (ACS), en libérant une molécule de 5-methylthioadenosine (Figure 7). Cette dernière est alors enzymatiquement recyclée en acide α-ketomethylthiobutyrique (KMBA), qui redonnera par la suite de la méthionine *via* une aminotransférase. L'ACC sera quant à lui converti par l'ACC oxydase (ACO) en éthylène. Il existe également d'autres voies de biosynthèse de l'éthylène, exploitées principalement par des micro-organismes (Fukuda *et al.*, 1993), présentées dans les paragraphes qui suivront.

2.1.4 - Gibbérellines

Les acides gibbérelliques (GAs), plus communément appelés Gibbérellines, sont impliqués dans la germination des graines, l'élongation des tiges, la croissance des feuilles, la maturation du pollen et l'initiation de la floraison (Cosgrove and Sovonick-Dunford, 1989; Karssen *et al.*, 1989; Singh *et al.*, 2002; Tyler *et al.*, 2004; Hedden and

Sponsel, 2015). Les GAs sont des acides diterpénoïdes tetracycliques (Figure 6D), synthétisés à partir de l'*ent*-kaurene, lui-même synthétisé à partir de DMAPP à travers la voie des terpénoïdes, à l'aide de terpène synthase (Figure 7). L'*ent*-kaurene est converti en GA_{12} par l'action successive de deux cytochromes P450 mono-oxygénases (CYP701A et CYP88A, appelées respectivement *ent*-kaurene oxydase et acide *ent*-kaurenoïque oxydase). La conversion du GA_{12} en GAs physiologiquement actifs est régulée par l'action successive de di-oxygénases 2-oxoglutarate dépendantes, principalement la GA_{20}ox responsable de la production de 19C-GAs, et GA_3ox introduisant la 3β-hydroxylation rendant les gibbérellines physiologiquement actives (Yamaguchi, 2008). Jusqu'à 136 structures différentes de GA ont été identifiées chez les plantes et les microorganismes (MacMillan, 2001; Piotrowska and Bajguz, 2011), mais seulement un petit nombre présente une activité biologique, comme le GA_1, le GA_3, le GA_4 ou le GA_7 (Yamaguchi, 2008). De plus, les GAs peuvent être conjugués avec des sucres, (O-glycosylation), par estérification ou méthylation, pour la désactivation et le transport de ces hormones (Schneider and Schliemann, 1994; Varbanova *et al.*, 2007; Piotrowska and Bajguz, 2011), ce qui augmente considérablement le nombre de structures GAs pouvant être naturellement présentes chez les plantes.

2.1.5 - Strigolactones

Les strigolactones (SLs) sont la dernière famille d'hormones végétales à avoir été identifiée (Umehara *et al.*, 2008). Elles contrôlent le développement des graines et leur germination, inhibent le développement des bourgeons axillaires et la ramification des parties aériennes, favorisent la senescence des feuilles, régulent le développement de l'architecture racinaire, et comme détaillé précédemment, favorisent l'initiation des interactions symbiotiques avec les CMAs (Cook *et al.*, 1972; Besserer *et al.*, 2006, 2008; Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008; Koltai, 2011; Stanga *et al.*, 2013; Ueda and Kusaba, 2015; Waters *et al.*, 2017). Les strigolactones sont des lactones tricycliques (cycles A, B et C) liées par une liaison énol-ether à un cycle buténolide hydroxyméthylé (cycle D) (Brooks *et al.*, 1985) (Figure 6E). Les SLs sont dérivées du métabolisme des caroténoïdes (Figure 7). Leur biosynthèse débute par l'isomérisation du β-carotène par DWARF27. L'isomère formé est clivé par la *Carotenoid Cleavage Dioxygenase 7* (CCD7), puis est pris en charge par CCD8 pour donner de la carlactone. Cette dernière sera

ensuite oxydée par une cytochrome P450 mono-oxygénase, puis enfin méthylée et oxydée (Seto and Yamaguchi, 2014). Il existe une certaine diversité de SLs, définie par les différentes méthylations et hydroxylations de la molécule, la stéréochimie du cycle C, ou de la structure non canonique prise par les cycles A, B et C (Bürger *et al.*, 2020). Toutefois, la stéréochimie et la structure du cycle D restent invariable (Alder *et al.*, 2012).

2.1.6 - Acide abscissique

L'acide abscissique (ABA) est capable d'induire et maintenir la dormance des graines et des bourgeons terminaux, est impliqué dans le développement embryonnaire et la réponse à certains pathogènes, mais régule surtout la réponse des plantes et leur adaptation face à de nombreux stress abiotiques, tels que la sécheresse, le froid, les stress induits par les sels ou les métaux lourds (Rikin and Richmond, 1976; Hilhorst, 1995; Zhu, 2002; Mohr and Cahill, 2003; Hsu and Kao, 2003; Fujii *et al.*, 2007; Rakitin *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2015). L'ABA agit généralement de façon antagoniste avec les GAs, notamment lors de la germination. L'ABA est une hormone isoprénoïque (Figure 6F) qui est produite à partir de la zeaxanthine, issue de la biosynthèse des caroténoïdes (Figure 7). Celle-ci est métabolisée en époxyde, qui est clivée par une dioxygènase, libérant la xanthoxine. Cette dernière est transformée enzymatiquement en ABA par déshydrogénation, puis oxydation (Kushiro *et al.*, 2004; Nambara and Marion-Poll, 2005). L'ABA peut être ensuite hydroxylé sur trois positions différentes, permettant subséquentiellement l'inactivation de l'hormone (Nambara and Marion-Poll, 2005). Il peut également être conjugué et former un glucosyl-ester, pour être inactivé et stocké (Lee *et al.*, 2006; Umehara *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2015; Waters *et al.*, 2017).

2.1.7 - Salicylates

Les salicylates (SAs) sont une famille qui intervient dans certains processus développementaux comme la germination des graines, la sénescence des feuilles ou la floraison, mais ils sont surtout impliqués dans la résistance des plantes face aux pathogènes biotrophes (White, 1979; Gaffney *et al.*, 1993; Morris *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2004; Rajjou *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2007; Bürger and Chory, 2019). L'acide salicylique (SA), qui est la principale forme active de cette famille, est un acide benzoïque mono-hydroxylé (Figure 6G). Sa biosynthèse est issue de l'acide shikimique puis de

l'acide chorismique. Deux voies de biosynthèse découlent de ce précurseur, la voie de l'iso-chorismate ou celle de la phenylalanine ammonia-lyase (Dempsey *et al.*, 2011) (Figure 7). Ces deux routes aboutissent à la biosynthèse du SA libre, qui peut, comme la plupart des autres hormones, être conjugué avec un acide aminé ou par glycosylation, méthylation, pour être inactivé, transporté ou stocké (Hennig *et al.*, 1993; Dean *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2007; Dempsey *et al.*, 2011).

2.1.8 - Jasmonates

La famille des jasmonates (JAs) est, comme celle des SAs, impliquée dans la résistance de la plante face aux stress biotiques, mais régule la réponse face aux nécrotrophes et aux herbivores, et joue également un rôle dans l'inhibition de la croissance racinaire, ou encore le développement des organes reproductifs (Howe, 2004; Reymond *et al.*, 2004; Acosta *et al.*, 2009; Mandaokar and Browse, 2009; Avanci *et al.*, 2010; Kazan, 2015). Les JAs appartiennent à la famille des oxylipines et l'acide jasmonique (JA) est un cyclopentanone (Figure 6H) dérivé de l'acide α-linoléique, par l'action successive de lipoxygènase, oxyde synthase et oxyde cyclase. Le précurseur subit finalement trois cycles de ß-oxydation (Delker *et al.*, 2006) (Figure 7). La conjugaison du JA avec l'isoleucine est alors nécessaire pour produire la structure physiologiquement active chez la plante (Fonseca *et al.*, 2009), mais le JA peut également former un metyl-esther ou être décarboxylé pour former des espèces volatiles (Dąbrowska and Boland, 2007; Stitz *et al.*, 2011). Il peut être hydroxylé ou carboxylé pour inactiver l'hormone (Miersch *et al.*, 2008; Koo and Howe, 2012) ou encore être O-glycosylé (Glauser *et al.*, 2008)

2.1.9 - Brassinostéroïdes

Les brassinostéroïdes (BRs) sont impliqués dans de nombreux processus développementaux chez la plante, comme la division et l'élongation cellulaire, la différenciation vasculaire, la floraison et la reproduction (Mandava, 1988; Hottiger and Boller, 1991; Clause and Sasse, 1998; Fukuda, 2004; Yu *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2010; González-García *et al.*, 2011). Les BRs sont des stéroïdes poly-hydroxylés (Figure 6I), présentant une grande variété de stéréo-isomères et de chaines latérales (Bajguz, 2007). Toutefois, leur biosynthèse suit une voie commune, impliquant la réduction du

campestérol jusqu'à l'obtention du campestanol (Figure 7). Deux voies divergent ensuite, faisant intervenir des hydroxylations, épimérisations et oxydations successives (Clouse, 2011). Les BRs possèdent de nombreux sites de conjugaison, permettant méthylation, épimérisation, estérification ou glycosylation (Fujioka and Yokota, 2003; Bajguz, 2007), pour permettre comme pour les autres familles d'hormones, leur inactivation et probablement leur transport à travers la plante (Ohnishi *et al.*, 2006)

2.1.10 - Hormones peptidiques

Pour finir, il existe une dernière famille de régulateur hormonal chez les plantes. Il s'agit d'hormones peptidiques, qui sont également impliquées dans plusieurs processus développementaux ou de résistance, comme les mécanismes de défense face aux herbivores, la division cellulaire, le maintien des méristèmes, le développement vasculaire ou du système racinaire, l'embryogenèse, etc. (Pearce *et al.*, 1991; Fletcher, 1999; Yang *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 2006; Whitford *et al.*, 2012; Yamaguchi *et al.*, 2016; Gancheva *et al.*, 2019). Ces peptides sont généralement issus de précurseurs protéiques de grande taille (> 100 acides aminés) possédant un peptide signal N-terminal et plusieurs sites protéolitiques (Matsubayashi, 2014). Ce précurseur peut alors être clivé pour libérer plusieurs copies d'un peptide de moins de 20 acides aminés, qui peut être modifié post-traductionnellement (Pearce *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2006; Okamoto *et al.*, 2013; Santiago *et al.*, 2016). La famille des hormones peptidiques contient plusieurs sous familles, comprenant par exemple les Systémines, les *Clavata/Embryo surrounding region-related* (CLE), les phytosulfokines (PSK) (Figure 6J), les peptides *early noduling* (ENOD) (Gancheva *et al.*, 2019). Ce champ d'étude est en pleine extension et de nombreux candidats restent à être découverts.

2.1.11 - Un bref aperçu de la perception des phytohormones

Chaque phytohormone est perçue par un ou plusieurs récepteurs spécifiques pour activer une cascade de signalisation (Haruta and Sussman, 2017). Les récepteurs des phytohormones peuvent être divisés en deux catégories. D'une part, on distingue les récepteurs transmembranaires pour les CKs, ET, BRs et les hormones peptidiques. Plus précisément, les CKs et l'ET sont perçus par des récepteurs à domaine histidine kinase (respectivement nommés CRE et ETR) localisés dans la membrane du réticulum

endoplasmique (Chang *et al.*, 1993; Inoue *et al.*, 2001). Les BRs et les hormones peptidiques sont perçues par des LRR-RLK, localisés dans la membrane plasmique (Wang *et al.*, 2001; Hirakawa *et al.*, 2017). D'autre part, on trouve des récepteurs hydrosolubles pour les IAAs, ABA, GAs, JAs, SAs et SLs, comprenant respectivement les protéines à motif F-Box cytosoliques TIR (Ruegger *et al.*, 1998), les pyrobactines cytosoliques PYRs (Park *et al.*, 2009), l' α/ß-hydrolases nucléaire GID1 (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005), les protéines à motif F-Box cytosoliques COI (Sheard *et al.*, 2010), les protéines cytosoliques à domaine Ankyrin NPR (Wu *et al.*, 2012), et l' α/ß-hydrolases nucléaire D14 (Hamiaux *et al.*, 2012). La liaison des phytohormones à leur récepteur respectif induit une cascade de signalisation spécifique, par phosphorylation du récepteur ou formation d'un complexe avec un co-récepteur, pour induire la transcription des différents gènes de réponse.

Comme indiqué dans les paragraphes précédents, chacune des phytohormones participe simultanément à de nombreux rôles physiologiques, recouvrant parfois les fonctions d'une autre famille d'hormones. De nombreux « cross-talks » peuvent alors avoir lieu dans une plante, avec des hormones pouvant combiner leurs effets ou être antagonistes l'une de l'autre (Moubayidin *et al.*, 2009; Thaler *et al.*, 2012; Golldack *et al.*, 2013; Zdarska *et al.*, 2015; Zwack and Rashotte, 2015; Ku *et al.*, 2018; Omoarelojie *et al.*, 2019). En conséquence, cela peut influer sur la régulation d'une autre hormone par différents mécanismes, tels que la régulation de la biosynthèse, la conjugaison ou l'expression des enzymes impliquées, mais aussi par la régulation de l'expression des récepteurs et partenaires associés dans la signalisation.

2.2 - Productions d'hormones végétales par des micro-organismes

Les hormones végétales ne sont pas des métabolites exclusivement produits par les plantes. De nombreux micro-organismes présents dans les sols, champignons ou bactéries, pathogènes ou symbiotiques, peuvent également produire ces molécules (Costacurta and Vanderleyden, 1995; Tudzynski, 1997) tout en produisant des effecteurs perturbant l'homéostasie hormonale de la plante (Kazan and Lyons, 2014). Il a été estimé que 80% des micro-organismes présents dans la rhizosphère sont capables de produire de l'auxine (Patten and Glick, 1996), de manière à favoriser le développement des plantes ou diminuer leur résistance pour favoriser leur invasion (Glick, 1995;

Jameson, 2000). La régulation et la signalisation hormonale de la plante ne peuvent donc pas être étudiées sans tenir compte de l'influence des micro-organismes. Sans réaliser un catalogue exhaustif de la production de phytohormones chez l'ensemble des micro-organismes, voici un descriptif de quelques exemples retrouvés dans la littérature.

2.2.1 - Chez les bactéries

Plusieurs bactéries sont capables de produire des hormones végétales (Kudoyarova *et al.*, 2019). Le premier exemple notable se trouve chez les bactéries provoquant des galles chez les plantes, comme chez les *Agrobacterium* ou certains pathovares de *Pseudomonas syringae,* qui sont connus de longue date pour produire des IAAs et des CKs (Akiyoshi *et al.*, 1987; Glickmann *et al.*, 1998). Des CKs peuvent également être produites par *Streptomyces turgidiscabies* (Loria *et al.*, 2006) ou encore *Ralstonia solanacearum,* qui est également capable de produire de l'éthylène (Valls *et al.*, 2006). De façon similaire, les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes peuvent produire des phytohormones, principalement de l'auxine (Spaepen and Vanderleyden, 2011) des CKs (García de Salamone *et al.*, 2001) des GAs (Gupta *et al.*, 2017), ou encore de l'éthylène *via* des ACC déaminases (Glick, 2005).

2.2.2 - Chez les champignons

A l'image des bactéries, les champignons sont également capables de produire des hormones (Chanclud and Morel, 2016). La découverte des GAs repose initialement sur l'identification d'un symptôme d'élongation extrême du riz causé par l'infection d'un champignon, *Gibberella fujikuroi*, qui a donné son nom à la molécule (Hori, 1898; Takahashi *et al.*, 1955). La production d'auxine a été identifiée chez certains champignons ectomycorhiziens, tels que *Laccaria bicolor* (Karabaghli *et al.*, 1998) ou encore *Tuber brochii* et *mélanosporum* (Splivallo *et al.*, 2009). De plus, ces derniers sont aussi capables de produire de l'éthylène, comme le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*, à l'aide d'une voie de biosynthèse dépendante de la méthionine et de la lumière, en photo-oxydant du KMBA relâché dans leur milieu (Chagué *et al.*, 2002; Splivallo *et al.*, 2009). Les CKs sont également produites par divers champignons, pathogènes comme symbiotiques (Murphy *et al.*, 1997; Morrison *et al.*, 2015*b*; Chanclud *et al.*, 2016), tout comme l'ABA (Crocoll *et al.*, 1991; Jiang *et al.*, 2010).

2.2.3 - Fonctions et rôles

Les effets des hormones végétales sur la biologie des champignons peuvent être très variables. Elles peuvent par exemple inhiber ou stimuler la germination des spores, en fonction de l'espèce fongique et de la famille d'hormone considérée. Par exemple, les IAAs et les GAs stimulent la germination des conidies de *Neurospora crassa*, de la même manière que l'éthylène chez *Alternaria alternata*, ou l'ABA chez *Magnaporthe oryzae*. A l'inverse, l'IAA inhibe la germination des spores de *Fusarium oxysporum*, de la même manière que l'IAA, les GAs, le SA et les CKs chez *Harpophora maydis* (Nakamura *et al.*, 1978; Kępczyńska, 1994; Sharaf and Farrag, 2004; Degani *et al.*, 2014; Spence *et al.*, 2015). Les phytohormones peuvent également réguler positivement ou négativement la croissance des hyphes, en fonction de la concentration. L'ACC favorise la croissance des hyphes de *Alternaria alternata*, comme l'IAA chez *Fusarium delphinoides*. Chez *Harpophora maydis* en revanche, l'IAA et une CK répriment la croissance fongique (Kępczyńska, 1994; Kulkarni *et al.*, 2013; Degani *et al.*, 2014), et stimulent la ramification des hyphes, comme les CKs chez *Boletus edulis*, ou les strigolactones chez les *R. irregularis et G. rosea* (Barker and Tagu, 2000; Akiyama *et al.*, 2005; Besserer *et al.*, 2006)

Les hormones produites par les champignons peuvent évidemment avoir un impact sur les plantes avec lesquelles ils interagissent, et les effets sont variables en fonction de leur mode de vie (Chanclud and Morel, 2016). Chez les champignons ectomycorhiziens, la production d'auxine peut être associée à une stimulation de croissance des racines de la plante hôte (Frankenberger and Poth, 1987; Tan and Zou, 2001; Splivallo *et al.*, 2009), et il est proposé que la production de CKs puisse induire un meilleur développement des parties aériennes pour promouvoir la photosynthèse (Wullschleger and Reid, 1990). Des phytohormones, comme l'ABA ou les CKs, jouent également un rôle dans l'initiation et la translocation des nutriments de la plante vers les cellules envahies par des champignons symbiotiques comme pathogènes (Blee and Anderson, 1998; Chanclud *et al.*, 2016). Enfin, la production fongique d'hormones végétales, comme la production d'IAA chez le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum*, ou le 12-OHJA chez *Magnaporthe oryzae*, peut également servir à perturber l'homéostasie hormonale de la plante hôte afin de favoriser sa colonisation (Gay *et al.*, 1994; Patkar *et al.*, 2015), et permettre au champignon pathogène l'induction de symptômes, comme les GAs produits par *Gibberela fujikoroi*, l'IAA chez *fusarium*

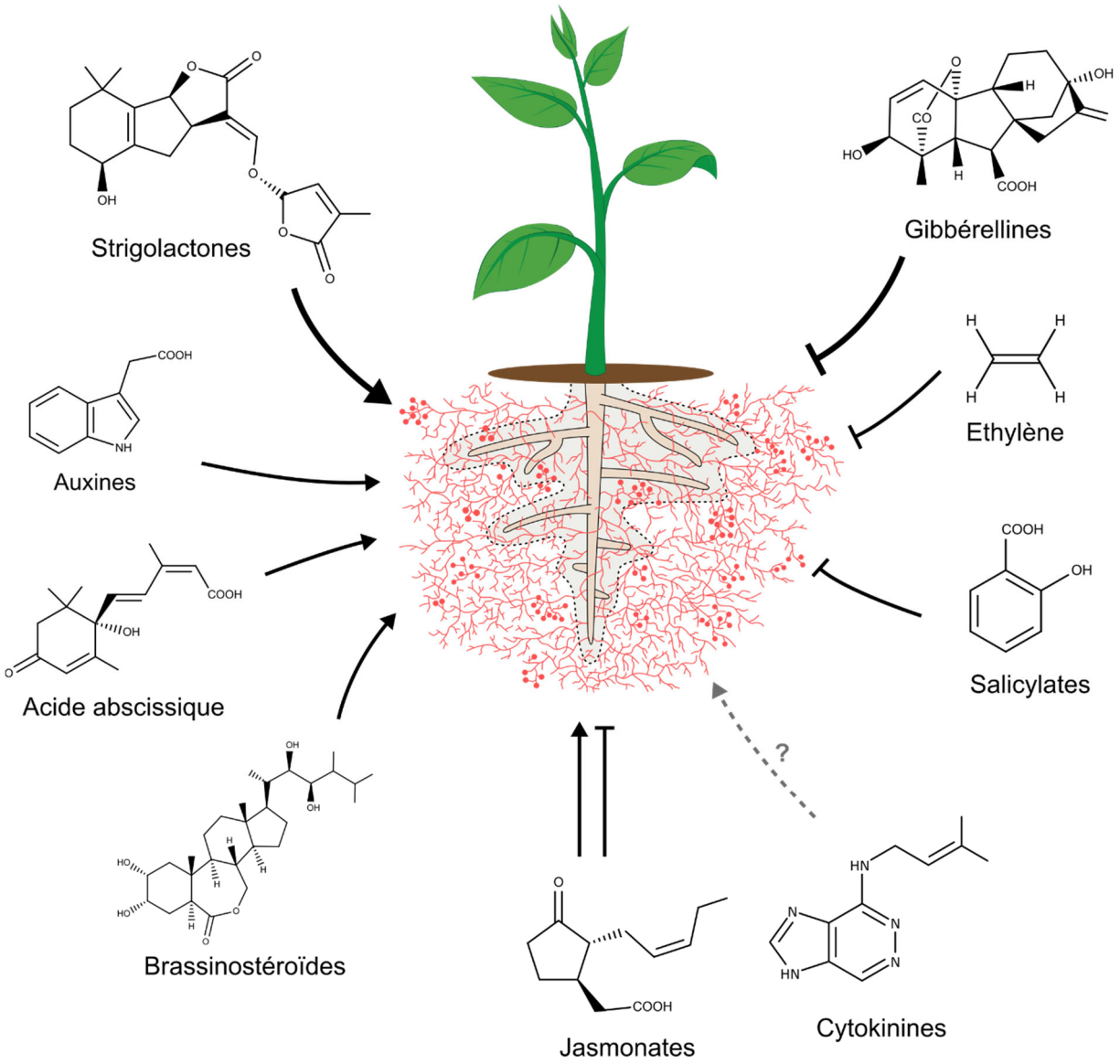


Figure 8 : Impact des hormones végétales sur la symbiose mycorhizienne à arbuscules

Rôles connus des hormones végétales sur la symbiose endomycorhizienne. Certaines hormones ont un impact bien caractérisé (traits épais), par rapport à d'autres où l'impact est moins documenté (traits fins). Pour les jasmonates et les cytokinines, le rôle de ces hormones reste encore débattu.

oxysporum et *arthrosporioides* ou encore *Puccinia graminis*, les CKs chez *Ustilago maydis*, et l'éthylène chez *Cochliobolus miyabeanus* (Desjardins *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2014; Morrison *et al.*, 2015*a*; Van Bockhaven *et al.*, 2015).

2.3 - Les hormones dans la symbiose mycorhizienne à arbuscules

2.3.1 - Chez la plante hôte

Dans la symbiose endomycorhizienne, l'impact des hormones végétales a été étudié de manière inégale entre les différentes classes, et la grande majorité des études menées se focalise sur l'effet des phytohormones sur la plante, en utilisant principalement des traitements exogènes ou des plantes mutantes dans les voies de biosynthèse ou de perception des hormones. Bien que leurs rôles, et leurs modes d'action ne soient pas encore parfaitement établis, et que des résultats contradictoires aient pu être obtenus en fonction des mutants choisis, des plantes modèles, et des conditions de traitement et de culture, un certain consensus se dégage concernant l'effet général de chacune des familles d'hormones sur la symbiose (Bedini *et al.*, 2018). On peut donc distinguer les hormones ayant généralement un rôle positif sur l'établissement et le maintien de la symbiose, celles ayant un rôle négatif, et enfin celles dont le rôle n'est pas encore clairement défini, ou variable suivant les conditions expérimentales (Figure 8).

Hormones favorisant la symbiose :

Parmi les hormones ayant un effet positif sur la symbiose, la famille des SLs est probablement la mieux documentée et caractérisée. Plusieurs expériences de traitement exogènes au GR24, un analogue synthétique des strigolactones, ont permis d'accroitre le taux de colonisation des racines par le CMA (Gomez-Roldan *et al.*, 2007; Breuillin *et al.*, 2010; Balzergue *et al.*, 2011; Illana *et al.*, 2011; Foo *et al.*, 2013*b*), et les mutants de biosynthèse des SLs, comme chez le pois *PsCCD8*, le pétunia *Psdad1* ou les lignées de tomate silencées pour *Sl-IAA27* (un facteur de transcription de réponse à l'auxine, qui contrôle positivement la biosynthèse des SLs) présentent un phénotype mycorhizien réduit (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Breuillin *et al.*, 2010; Illana *et al.*, 2011; Foo *et al.*, 2013*b*; Guillotin *et al.*, 2017). Les SLs ont un effet direct sur les CMAs, mais la perception de ces hormones par la plante pourrait également jouer un rôle dans la régulation de la

symbiose, car le mutant de perception du riz *Osd3* présente également un phénotype mycorhizien réduit (Yoshida *et al.*, 2012).

L'IAA a également un effet positif sur la symbiose. Les traitements exogènes avec de l'IAA, ou des analogues synthétiques induisent une augmentation du taux de mycorhization des racines (Niranjan *et al.*, 2007; Etemadi *et al.*, 2014) tandis que le traitement avec un inhibiteur de la réponse à l'auxine réduit ce pourcentage de colonisation (Liu *et al.*, 2014*b*), tout comme la répression du récepteur TIR1 grâce à la surexpression de miRNA (Etemadi *et al.*, 2014). L'utilisation de mutants *bushy* de *Pisum sativum* ou *dgt* de *Solanum lycopersicum*, respectivement déficient et résistant à l'auxine, présentent un phénotype mycorhizien réduit (Hanlon and Coenen, 2011; Foo, 2013*b*).

L'ABA a également été montré comme jouant un rôle positif sur la régulation de la symbiose en utilisant principalement le mutant déficient en ABA *sitiens* de *L. esculentum*. Ces études mettent en lumière un phénotype mycorhizien réduit par rapport aux plantes sauvages, ainsi que des arbuscules moins développés (Herrera-Medina *et al.*, 2007; Martín-Rodríguez *et al.*, 2011; Fracetto *et al.*, 2017).

Bien que très peu étudiés, les BRs semblent également avoir un impact positif sur la symbiose. Un traitement exogène de la plante hôte permet d'augmenter le nombre d'évènement de mycorhization (Tofighi *et al.*, 2017) et les études menées avec des mutants *DWARF* (tomate, *moneymaker*) ou *lk* (pois, *Torsdag*), déficients en brassinostéroïdes, montrent qu'ils sont moins mycorhizés que les plantes témoins (Bitterlich *et al.*, 2014; Foo *et al.*, 2016).

Hormones inhibant la symbiose :

Parmi les hormones ayant un impact négatif sur la symbiose, les GAs font partie de celles qui sont les mieux caractérisées. Les ajouts exogènes de GAs ont pour effet de réduire les taux de mycorhization et l'abondance des arbuscules chez plusieurs plantes (El Ghachtouli *et al.*, 1996; Foo *et al.*, 2013*a*; Floss *et al.*, 2013; Takeda *et al.*, 2015; Martín-Rodríguez *et al.*, 2015; Khalloufi *et al.*, 2017) et un traitement de la plante avec un inhibiteur de leur biosynthèse favorise la symbiose (Martín-Rodríguez *et al.*, 2015). Les études employant des mutants de biosynthèse (*PsNa-1*), de perception (*Sl-procera*) ou de signalisation (*MtDella1-Δ18* ou *PsCry-1*), permettent d'aboutir à des résultats similaires

(Foo, 2013*a*; Floss *et al.*, 2013; Martín-Rodríguez *et al.*, 2015). La perception des GAs par la plante induit la dégradation des facteurs de transcription DELLA, qui contrôlent un grand nombre de gènes nécessaires à l'établissement de la symbiose (Floss *et al.*, 2013; Pimprikar *et al.*, 2016; Maclean *et al.*, 2017). Les GAs jouent donc un rôle de régulateur négatif.

L'éthylène est également une phythormone présentant un rôle de régulateur négatif de la symbiose. Des traitements exogènes avec de l'éthylène ou de l'éthéphon, un analogue synthétique, ont pour effet de réduire les taux de mycorhization et l'abondance des arbuscules (Azcon-Aguilar *et al.*, 1981; Geil *et al.*, 2001; Geil and Guinel, 2002; Foo *et al.*, 2016). Les mutants *epinastic* surproduisant cette hormone ont un phénotype mycorhizien réduit (Zsögön *et al.*, 2008; Torres de Los Santos *et al.*, 2011; Fracetto *et al.*, 2013, 2017). Cependant, des résultats opposés peuvent être obtenus en analysant le phénotype de mutants insensibles comme *never ripe* (tomate *micro-tom*), *ein2* (pois *torsdag*) ou *etr1* (tomate *Rheinland ruhm*), dont les phénotypes mycorhiziens peuvent être respectivement réduits (Zsögön *et al.*, 2008), inchangés (Fracetto *et al.*, 2013; Foo *et al.*, 2016) ou augmentés (Martín-Rodríguez *et al.*, 2011) et il en va de même chez les mutants déficients en éthylène. Ces disparités peuvent s'expliquer par le « crosstalk » et l'action antagoniste d'autres hormones, comme l'ABA (Herrera-Medina *et al.*, 2007; Martín-Rodríguez *et al.*, 2011) ou l'IAA (Foo *et al.*, 2016) qui peuvent inhiber la production d'éthylène par la plante hôte.

Le SA est également un inhibiteur de la symbiose. De la même manière que pour les autres phytohormones décrites dans cette partie, les traitements exogènes au SA permettent de réduire le taux de mycorhization (de Román *et al.*, 2011; Ojha *et al.*, 2012), et de plus, le mutant surproducteur *NtCSA* présente un phénotyphe mycorhizien plus faible que le contrôle. A l'inverse, les racines du mutant déficient en SA *NtnahG* son plus mycorhizées que celles du contrôle (Herrera Medina *et al.*, 2003).

Hormones dont le rôle reste incertain :

L'acide jasmonique est une hormone qui présente un rôle ambigu dans la régulation de la symbiose. Les expériences d'ajout exogène ont montré à la fois une augmentation (Regvar *et al.*, 1996; Tejeda-Sartorius *et al.*, 2008; Greco *et al.*, 2012) ou une

diminution (Ludwig-Müller *et al.*, 2002; Herrera-Medina *et al.*, 2008; Gutjahr *et al.*, 2015) de la colonisation des racines par les CMAs, en fonction de la dose choisie et des conditions de culture (Gutjahr and Paszkowski, 2009). De plus, aucun phénotype mycorhizien notable n'a été observé dans les mutants de riz déficient en JA comme *OsCpm2* (Gutjahr *et al.*, 2015), alors que le mutant de tomate déficient *SlSpr2* présente une colonisation réduite de ses racines (Tejeda-Sartorius *et al.*, 2008), et celui insensible aux JAs *SlJa-1* possède quant à lui un phénotype mycorhizien supérieur au contrôle (Herrera-Medina *et al.*, 2008). Des clarifications sont donc nécessaires pour comprendre pleinement le rôle de cette hormone, d'autant plus que le JA est reconnu pour jouer un rôle important dans la symbiose car il est accumulé dans les racines mycorhizées et pourrait permettre d'inhiber la réponse SA-dépendante, induite par le contact cellulaire entre l'hôte et le symbionte, qui pourrait inhiber l'initiation de la symbiose (Gutjahr and Paszkowski, 2009).

L'implication des CKs dans la symbiose reste encore débattue dans la communauté. Les expériences menées avec les mutants *bushy roots* insensibles aux cytokinines, ou *cre1* muté sur le récepteur des CKs, n'ont révélé aucun phénotype par rapport aux plantes sauvages (Zsögön *et al.*, 2008; Laffont *et al.*, 2015). L'utilisation d'une lignée de *N. tabacum* déficiente en CK, *35S:CKX2*, semble favoriser la colonisation des racines (Cosme and Wurst, 2013), mais des résultats contradictoires ont été obtenus avec des plantes *Sym15* surproduisant des CKs, présentant un phénotype mycorhizien également amélioré (Jones *et al.*, 2015; Goh *et al.*, 2019). De plus, l'application exogène de CK semble réprimer ou ne pas avoir d'effet sur la mycorhization (Rabie, 2005; Bompadre *et al.*, 2015). L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques a pu en revanche mettre en évidence un rôle positif des CKs. Le PI-55, inhibiteur de la perception des CKs, induit une diminution de la mycorhization chez le mutant de pois *PsSym15*. L'INCYDE, inhibiteur de la dégradation des CKs endogène, induit une augmentation de la mycorhization chez les plantes sauvages (Goh *et al.*, 2019). L'ensemble de ces données ne permet donc pas de proposer un consensus évident. De nouvelles études sont donc indispensables pour pouvoir déterminer le rôle de cette famille de phytohormone.

2.3.2 - Chez le symbionte fongique

Dans la symbiose endomycorhizienne, l'impact des hormones végétales sur le champignon, et sa contribution dans la production de phytohormones ont été négligés par la communauté. La plupart des études, cherchant à établir l'impact d'une hormone sur la symbiose qui ont été citées précédemment, sont menées d'un point de vue phyto-centré, et n'ont pas cherché à évaluer l'impact de celles-ci sur le développement des CMAs. Toutefois, les effets de quelques hormones végétales sur la biologie des CMAs ont pu être identifiés dans certains travaux et des expériences anciennes de chimie analytique peuvent même laisser penser que les CMAs seraient également capables de produire des phytohormones.

Comme présenté précédemment, les hormones végétales les plus documentées comme ayant un effet sur les CMAs sont les strigolactones. La perception des SLs par le champignon induit la ramification des hyphes et active son métabolisme mitochondrial stimulant ainsi la germination des spores, la croissance des hyphes ainsi que la division nucléaire. Cette perception stimule également la sécrétion de COs, et améliore ainsi la colonisation de la plante hôte (Akiyama *et al.*, 2005; Besserer *et al.*, 2006, 2008; Kountche *et al.*, 2018; Taulera *et al.*, 2020). D'autres hormones ont été identifiées comme pouvant avoir un effet physiologique sur les CMAs. L'éthylène, en faible concentration (environ 0.05 ppm), est susceptible de stimuler la croissance des hyphes de *Glomus mossea* et *Gigaspora ramisporophora*, et améliore également le pourcentage de mycorhization de ce dernier, dans les racines de certains agrumes (Ishii *et al.*, 1996). De même, le JA a été montré comme stimulant la croissance des hyphes de *R. irregularis* (Nagata *et al.*, 2016). Plus récemment, l'ABA a été identifié comme pouvant induire la re-sporulation de spores de *R. irregularis* en stade a-symbiotique (Liu *et al.*, 2019) et comme pouvant inhiber la germination des spores, à l'inverse du GA_3 qui la stimule (Mercy *et al.*, 2017).

Concernant la production de phytohormones, les premières données suggérant la production de GAs et CKs ont été obtenues à l'aide de bio-essais, suite à la séparation de GSE par chromatographie sur couche mince (Barea and Azcón-Aguilar, 1982). Plus tardivement, de l'ABA a été détecté par chromatographie liquide couplée à un spectrophotomètre et par immuno-détection, à partir d'un extrait de *Glomus* non identifiés (Esch *et al.*, 1994). Par la suite, l'IAA a également été identifié dans des extraits de spores de *R. irregularis* par GC-MS (Ludwig-Müller *et al.*, 1997). Depuis, aucune

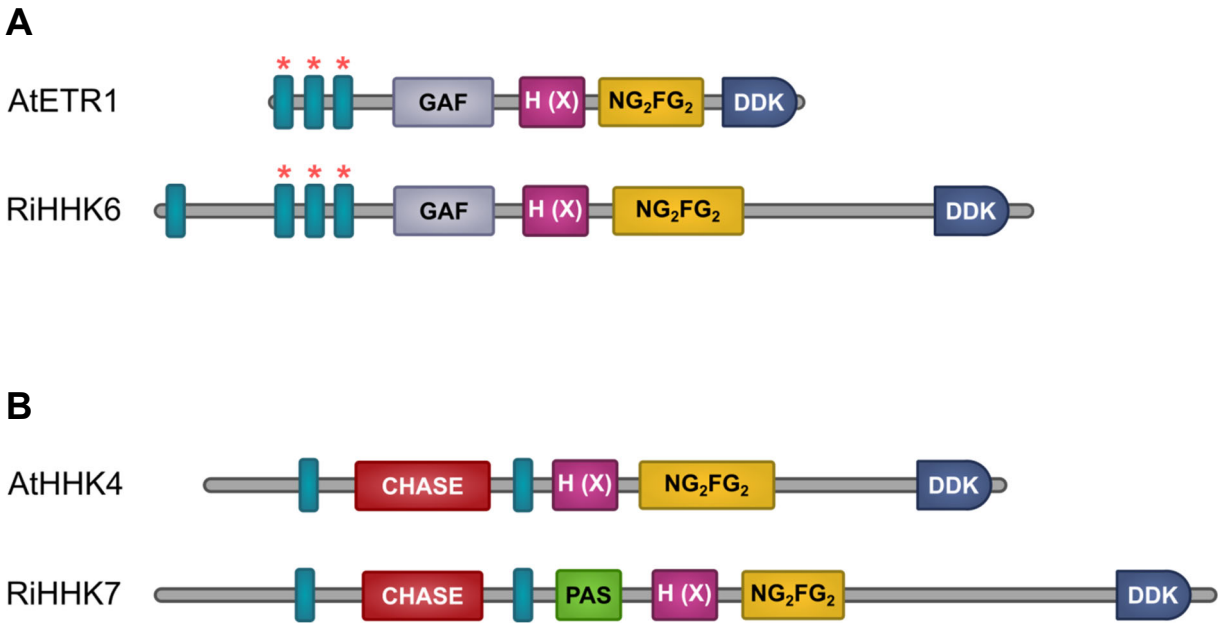


Figure 9 : Récepteurs putatifs fongiques à l'éthylène et aux cytokinines

(A) Domaines protéiques présents dans le récepteur à l'éthylène ETR1 de *Arabidopsis thaliana* (At), comparativement à ceux pour le récepteur putatif à l'éthylène de *R. irregularis* (Ri), **(B)** et le récepteur aux cytokinines. Les domaines bleus représentent les domaines transmembranaires, ceux surmontés d'une étoile rouge forment le domaine de liaison à l'éthylène. GAF : domaine cGMP-phosphodiesterases-adenylyl cyclase-FhIA. H(X) : domaine histidine kinase. NG_2FG_2 : domaine catalytique ATPase histidine-kinase-like. CHASE : Cyclase/Histidine kinase Associated Sensing Extracellular PAS : domaine Per-Arnt-Sim. DDK : domaine receveur.

Issu de (Hérivaux *et al.*, 2017)

analyse biochimique plus précise ou sensible n'a été réalisée. Plus récemment, des gènes codant pour une hormone peptidique de la famille CLE a été identifiée dans le génome de *R. irregularis* et *G. rosea*, mais la présence de ce peptide dans des échantillons fongiques n'a pas encore été mise en évidence (Le Marquer *et al.*, 2019).

2.3.3 - Des récepteurs putatifs fongiques

Enfin, une étude comparative des génomes des champignons *early diveging* a permis de mettre en évidence deux gènes codant pour des histidines kinases putatives chez *R. irregularis* et *G. rosea*. Ces deux gènes comportent de forts degrés d'identité avec les récepteurs de l'éthylène éthylène (ETR) et des cytokinines (CRE), retrouvés chez les plantes (Hérivaux *et al.*, 2017). HHK6 (identifié chez *R. irregularis*) code pour les trois domaines transmembranaires de liaison à l'éthylène en conservant les acides aminés nécessaires à sa fixation, ainsi que les autres domaines nécessaires à la transduction du signal (Figure 9A). HHK7 (identifié chez *R. irregularis* et *G. rosea*) code, de la même manière, pour le domaine de liaisons aux cytokinines avec les acides aminés essentiels conservés, ainsi que les autres motifs retrouvés chez le récepteur végétal (Figure 9B). Ces données suggèrent donc que *R. irregularis* possède deux récepteurs pour percevoir à la fois de l'éthylène et des cytokinines. Bien que des études fonctionnelles soient nécessaires pour prouver que ces récepteurs sont bel et bien capables de reconnaitre ces deux hormones et de transduire un signal, ces données suggèrent que des phytohormones, autres que les SLs, pourraient jouer un rôle déterminant dans la physiologie des CMAs. Combinées avec une potentielle production de ces hormones par les CMAs, cela pourrait signifier que les hormones végétales pourraient également jouer le rôle d'hormones fongiques, et permettrait de mettre en évidence un langage commun entre ces deux royaumes du vivant.

3 - Analyse des hormones végétales

L'identification et la quantification des hormones végétales requièrent des moyens d'analyse sensibles et efficaces. De par leurs faibles abondances dans les tissus végétaux, pouvant varier entre 1 nmol/g et 1 fmol/g de poids frais en fonction de la molécule (Huo

et al., 2012; Luo *et al.*, 2017), au milieu de matrices complexes, l'analyse des phytohormones est contrainte par la préparation des échantillons (extractions et purifications) et les méthodes de détection. Face à la diversité de propriétés physico-chimiques des hormones, deux stratégies d'extractions et purifications peuvent être employées. La première est une stratégie ciblée, visant l'étude d'une seule phytohormone, voire d'une famille de phytohormones (forme libre et formes conjuguées). Dans ce cas, tout le protocole est optimisé pour l'analyse de cette hormone, sa détection sera donc optimale. Cependant, comme les phytohormones possèdent des fonctions synergiques ou antagonistes (Kohli *et al.*, 2013) et qu'une plante fait face à plusieurs stress biotiques et abiotiques simultanés, il peut être important d'obtenir une image globale de son profil hormonal à un temps *t*. La seconde stratégie consiste à appliquer des protocoles d'extractions et purifications « globaux », permettant l'analyse simultanée de plusieurs classes d'hormones. Cependant, l'extraction ne sera pour autant pas optimale, à cause des compromis effectués pour réaliser l'analyse la plus globale possible, mais cette stratégie permet toutefois de comparer de façon relative la concentration d'une même hormone contenue dans différents échantillons de même nature. Concernant l'analyse de ces hormones, plusieurs méthodes sont utilisables et seront discutées (analyses indirectes et analyses directes).

3.1 - Les extractions et purifications des phytohormones

3.1.1 - Extractions et purifications ciblées

Bien que différentes méthodologies aient été développées en accord avec différents besoins expérimentaux, en général, après récolte de l'échantillon biologique, la première étape consiste à broyer les tissus (frais ou lyophilisés) tout en les conservant à froid pour éviter la dégradation -d'origine enzymatique ou chimique- des hormones (Ljung *et al.*, 2010).

Après broyage, un solvant d'extraction est ajouté, adapté pour solubiliser le contenu hormonal d'intérêt, suivi en général d'une agitation et d'une incubation à froid. Le choix du solvant d'extraction doit être adapté en fonction de la famille d'hormone ciblée et des besoins expérimentaux. Par exemple, dans le cas des auxines, une grande variété de solvants organiques et tampons aqueux ont été utilisés (Porfírio *et al.*, 2016)

mais un alcool relativement polaire, comme le méthanol ou l'isopropanol, est recommandé (Fu *et al.*, 2011). En revanche, des solvants plus apolaires comme le chloroforme ou l'acétonitrile sont recommandés pour l'extraction spécifique de brassinostéroïdes, molécules hydrophobes (Bajguz and Piotrowska, 2009; Ding *et al.*, 2013).

Plusieurs stratégies de purification des phytohormones ont été développées, mais les extractions liquide-liquide (LLE) et les extractions sur phase solide (SPE) sont les plus communément utilisées (Ramos, 2012; Cui *et al.*, 2015). Ces stratégies peuvent s'adapter facilement aux besoins expérimentaux, grâce à une large gamme de solvants et de phases stationnaires. Dans la bibliographie, différents protocoles basés sur ces méthodes sont disponibles pour extraire différentes familles d'hormones (Chu *et al.*, 2017), comme les IAAs (Porfírio *et al.*, 2016), les CKs (Svačinová *et al.*, 2012), les GAs (Csukasi *et al.*, 2011), l'ABA (Liu *et al.*, 2019), les JAs (Böttcher *et al.*, 2015), les SAs (Kim *et al.*, 2006), les SLs (Foo and Davies, 2011), les BRs (Ding *et al.*, 2013). Les avancées et le développement des miniaturisations et du haut débit permettent par ailleurs la démocratisation de la micro-extraction en phase liquide (LPME) ou en phase solide (SPME).Ces nouvelles approches permettent de réduire les quantités de matériel biologique nécessaires (Liu *et al.*, 2012, 2014*a*) et tendent également à être exploitées dans des protocoles d'extractions globales, pour analyser plusieurs familles d'hormones à l'aide d'une seule extraction.

3.1.2 - Extractions et purifications globales

Pour extraire simultanément un maximum de phytohormones de familles différentes, divers solvants ont été comparés. L'objectif a été de trouver le meilleur compromis entre la solubilisation du plus grand nombre de phytohormones, sans pour autant extraire trop d'autres molécules, en particulier des contaminants lipidiques ou chlorophylliens.

Le solvant Bieleski modifié (méthanol/eau/acide formique, 75/20/5 v/v/v (Hoyerova *et al.*, 2006)) est privilégié pour extraire simultanément plusieurs familles d'hormones –IAA, CKs, ABA, GAs, SAs et JAs- (Kojima *et al.*, 2009; Izumi *et al.*, 2009; Bulíčková *et al.*, 2013; Schäfer *et al.*, 2016). Ce mélange permet une bonne solubilisation de ces différentes hormones, même des plus apolaires comme les GAs, mais la polarité

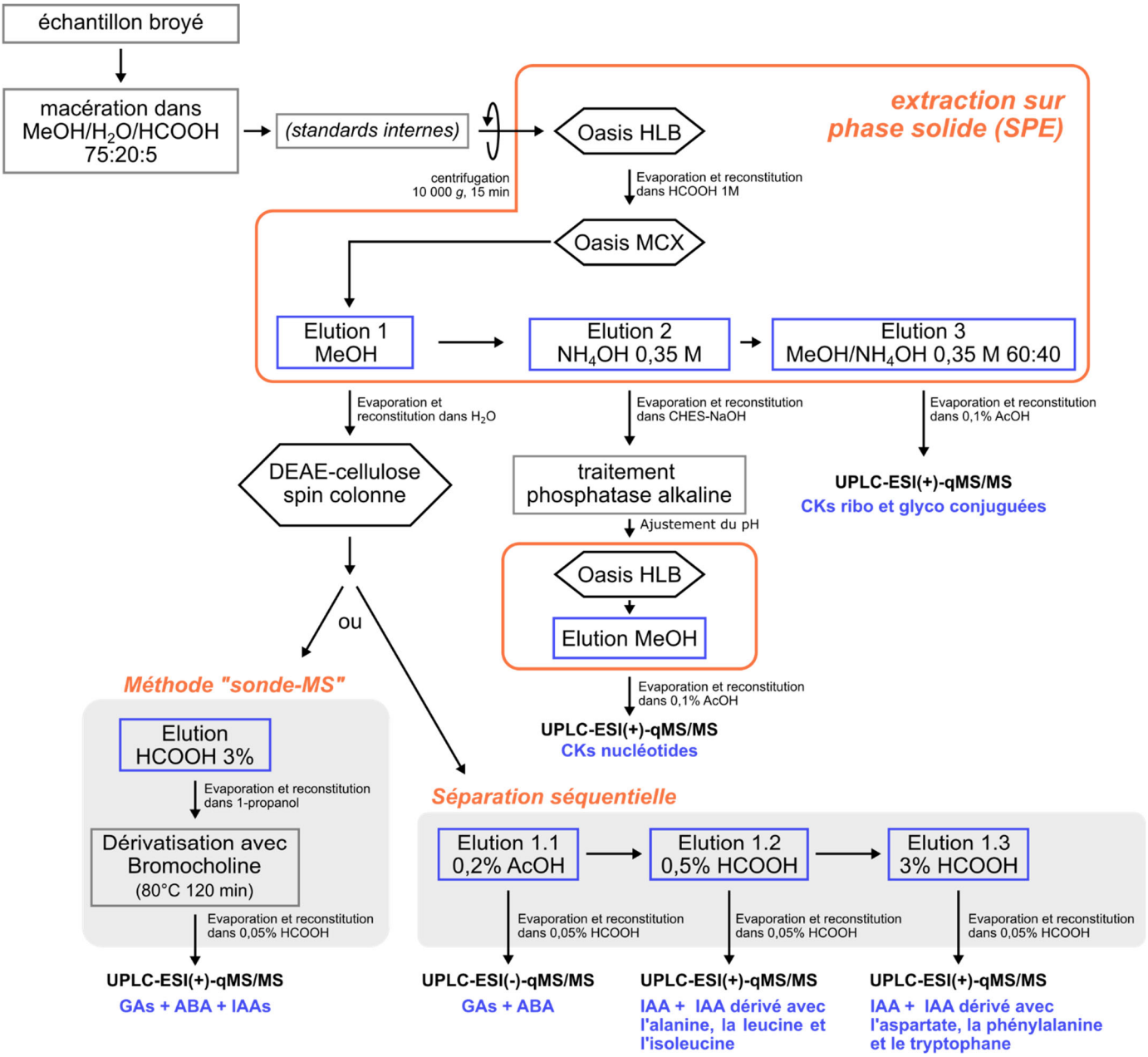


Figure 10 : Exemple d'un protocole d'extraction globale des phytohormones, proposé par (Kojima *et al.*, 2009)

Protocole d'extraction globale de quatre familles d'hormones végétales (GAs, ABA, IAA et CKs). L'échantillon, sous forme de poudre congelée, est extrait à l'aide du solvant Bieleski modifié. L'extrait brut subit ensuite deux étapes d'extraction sur phase solide (SPE), d'abord sur une phase hydrophile/lipophile (HLB), puis sur une phase inverse échangeuse de cations (MCX). Trois fractions sont obtenues à l'issue de la deuxième SPE. La première contient les hormones acides (GAs, ABA et IAAs), la deuxième contient les CKs ribo-phosphatées et la troisième contient les CKs libres ou conjuguées avec un ose. Des étapes supplémentaires de purification peuvent être ajoutées pour purifier d'autant plus certaines fractions ou analyser les CKs nucléotides.

élevée permet d'éviter l'extraction des lipides (Tarkowská *et al.*, 2014). Un pH acide, apporté par l'ajout d'une faible proportion d'acide formique, permet de stabiliser certaines phythormones comme les GAs (Urbanová *et al.*, 2013), sans trop impacter sur la stabilité des molécules des autres familles. D'autres solvants, tels que les mélanges propanol/eau/acide chlorhydrique, méthanol/eau, ou tout simplement de l'acétonitrile peuvent être également utilisés (Pan *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011*b*,*a*). Plus récemment, (Šimura *et al.*, 2018) ont augmenté l'apolarité de leur solvant d'extraction par rapport au solvant Bieleski modifié, en utilisant un mélange acétonitrile/eau, pour permettre en plus des hormones précédemment citées, de solubiliser les brassinostéroïdes, tout en limitant l'extraction de contaminant comme la chlorophylle.

Après extraction, l'extrait brut est purifié, cette fois-ci à l'aide d'un protocole « global », pour concentrer le maximum d'hormones différentes tout en éliminant les contaminants. (Kojima *et al.*, 2009) ont développé un protocole permettant d'extraire et purifier 43 phytohormones issues de quatre familles différentes, en utilisant deux SPE successives (Figure 10). L'extrait brut est pré-purifié sur une première SPE de phase hydrophile/lipophile, capable de retenir à la fois les contaminants les plus hydrophobes et les plus hydrophiles, tandis que les hormones, n'interagissant pas avec la phase, sont immédiatement éluées. La deuxième SPE permet de séparer l'extrait en trois fractions, afin de réduire sa complexité. Une phase inverse échangeuse de cation est utilisée et permet les élutions successives des hormones acides ou neutres dans une première fraction (IAAs, ABA, GAs, SAs et JAs), l'élution des CKs ribo-phosphatées dans une deuxième fraction, puis finalement, l'élution des CKs et CKs glyco-conjuguées dans une troisième fraction. Récemment, un protocole permettant l'extraction et la purification de 101 phytohormones différentes (adapté de Kojima *et al.*, 2009), propose de réduire le processus d'extraction en éliminant la deuxième étape de SPE, réduisant considérablement le temps requis pour la préparation de l'échantillon (Šimura *et al.*, 2018).

3.2 - Détection et quantification des hormones végétales

3.2.1 - Les bio-essais, ancêtres de la détection des phytohormones

La détection, voire la quantification d'hormones végétales présentes dans des extraits biologiques ont d'abord été réalisées par bio-essais. Leurs principes résidaient dans l'observation et/ou la mesure d'une réponse biologique spécifique induite après traitement d'une plante par une ou plusieurs fractions actives (Reeve and Crozier, 1980). Par exemple, la présence de CKs dans un extrait a été évaluée par l'expansion des cotylédons de radis (Letham, 1971) ou encore, la présence de GAs a été identifiée par la mesure de l'extension des hypocotyles de laitue (Frankland and Wareing, 1960). Bien que la limite de détection soit satisfaisante, ces expériences restent lourdes, variables, peu quantitatives mais surtout peu sélectives car plusieurs autres molécules, présentes dans les matrices complexes en plus de l'hormone d'intérêt, peuvent induire ou participer à l'induction des réponses observées.

3.2.2 - Détection par immuno-affinité

Afin d'améliorer la sensibilité de détection et de surmonter la faible sélectivité des bio-essais, les méthodes de détection par immuno-affinités ont été développées, comme les tests de dosages d'immuno-absorption par enzyme liée (ELISA) (Weiler, 1984). Ces protocoles reposent sur l'obtention d'anticorps spécifiques d'hormones. La sélectivité de ce type de méthode est importante, mais plusieurs hormones issues d'une même famille peuvent se lier à un même anticorps (Li *et al.*, 2005), réduisant la précision des résultats obtenus. Toutefois, ces tests sont relativement peu coûteux, grâce à la disponibilité de kits d'immuno-detection pour les différentes familles d'hormones et permettent une détection sensible, sans dépendre d'appareillages lourds de chimie analytique (Prado *et al.*, 2014; Pradko *et al.*, 2015). Cependant, ils ne permettent pas de répondre à la demande croissante d'analyses simultanées de plusieurs familles d'hormones dans un même échantillon.

3.2.3 - Analyses chromatographiques

Les techniques de chimie analytique utilisant les chromatographies liquides (LC) ou gazeuses (GC), couplées à un détecteur, sont actuellement utilisées pour réaliser la séparation, l'identification et la quantification d'hormones végétales. Elles offrent une

bonne reproductibilité, efficacité, résolution avec une durée de vie suffisamment longue et se sont donc imposées comme outils de choix pour ces analyses (Müller *et al.*, 2002; Zadra *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Tansupo *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2011). La GC permet l'analyse des hormones gazeuses, comme pour la détection et quantification de l'éthylène (Le Henry *et al.*, 2017), mais nécessite en revanche, une étape de dérivatisation pour l'analyse des autres hormones hydrosolubles, afin de les rendre volatiles, et certaines hormones sensibles à la température élevée de l'injecteur seront dégradées rapidement (Fu *et al.*, 2011).

La LC reste la méthode séparative la plus universelle pour des analyses globales de phytohormones. Différentes chimies de phases stationnaires pourront être utilisées, mais en général une phase inverse est choisie (C18). Elle est associable à une grande variété de détecteurs différents comme les spectromètres (UV ou infrarouges), spectrofluororimètres, refractomètres, etc… (Reeve and Crozier, 1980), mais aujourd'hui c'est principalement la détection par spectrométrie de masse (MS) qui est privilégiée. Des doubles ou triples détections peuvent être utilisées pour augmenter le degré de confiance dans l'identification ou la quantification des hormones, en apportant des informations structurales complémentaires.

3.2.4 - Analyses par spectrométrie de masse couplée à une séparation chromatographique

La spectrométrie de masse est aujourd'hui une des méthodes de chimie analytique parmi les plus sensibles permettant de réaliser des détections de métabolites présents en faibles concentrations (Lei *et al.*, 2011). Son principe repose d'abord sur l'ionisation des molécules, pour ensuite mesurer le rapport masse sur charge (m/z) de chaque ion et son abondance. Le m/z de chaque ion est déterminé par sa composition atomique, donc sa formule brute, et son état de charge après ionisation (généralement mono-chargé pour les phytohormones).

Parmi les sources d'ionisation existantes, l'ionisation par Electrospray (ESI) reste la plus communément utilisée dans l'analyses des phytohormones (Kojima *et al.*, 2009; Izumi *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2010; Šimura *et al.*, 2018). Les métabolites contenus dans la phase mobile, à l'issue de la séparation LC, sont pulvérisés en fines gouttelettes à l'extrémité d'un capillaire chauffé (entre 200 et 600°C) en présence d'un gaz

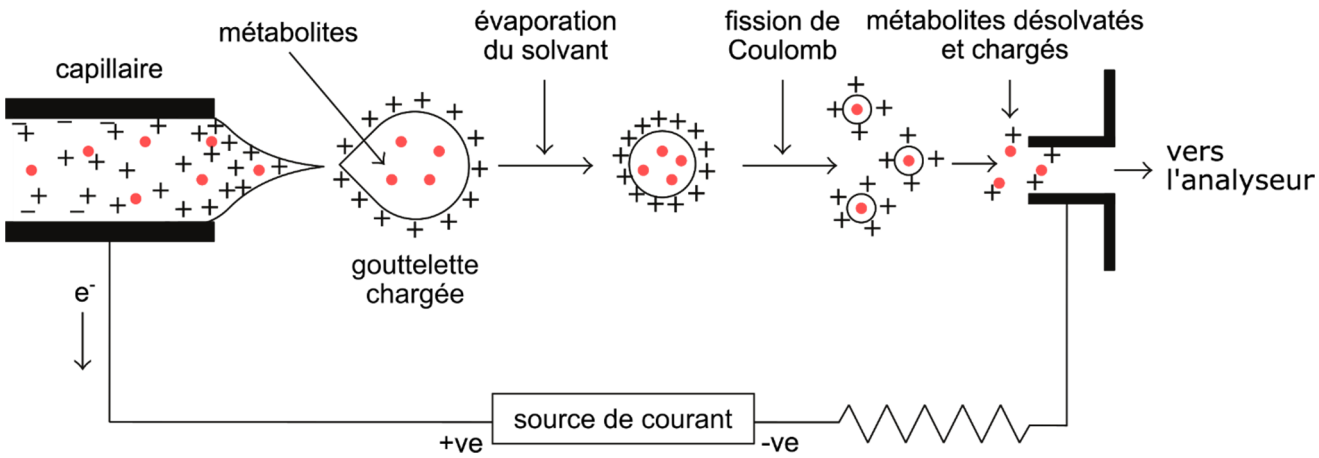


Figure 11 : Source d'ionisation Electrospray

Cette source est utilisée pour ioniser les métabolites en spectrométrie de masse. A l'issue de la séparation des métabolites par chromatographie liquide, l'échantillon est ionisé pour être analysable en spectrométrie de masse. La tension appliquée entre le capillaire et l'orifice du détecteur (+ve et –ve) induit une séparation des charges à la surface du liquide. La solution liquide prend la forme d'un cône à l'extrémité du capillaire, qui se détache et se disperse sous forme de gouttelettes chargées. La taille des gouttelettes se réduit progressivement -par évaporation grâce aux gaz et à la température élevée, ainsi que par fission de Coulomb-, permettant l'obtention de métabolites ionisés et désolvatés, qui peuvent ensuite être analysés par le spectromètre de masse.

Issu de (Banerjee and Mazumdar, 2012)

(généralement de l'azote) pour favoriser l'évaporation du solvant. Les molécules en suspension dans les gouttelettes sont attirées vers l'entrée de l'analyseur par un haut potentiel électrique (entre ±2 kV et ±5 kV). La réduction de la taille des gouttelettes, par fission de Coulomb ou par évaporation du solvant (selon les modèles proposés (Dole *et al.*, 1968; Iribarne and Thomson, 1976)), libère les ions désolvatés avant leur entrée dans l'analyseur du spectromètre de masse (Awad *et al.*, 2015) (Figure 11). Ce mode d'ionisation est considéré comme « doux », et limite les fragmentations des molécules en source (El-Aneed *et al.*, 2009). Les ions créés peuvent correspondre à l'addition ou la perte d'un ou plusieurs hydrogènes, et sont notés $[M + nH]^{n+}$ ou $[M - nH]^{n-}$, ou par la formation d'adduits (Keller *et al.*, 2008). Le nombre et la nature de la charge obtenue sont définis par la polarité du courant appliqué au capillaire, mais également par la composition du solvant et de la matrice, la nature chimique de la molécule et sa capacité à accepter ou céder un proton ou former un adduit. Par exemple, les molécules présentant une fonction acide seront plus facilement chargées négativement et observables en mode négatif et les molécules possédant une fonction amine seront majoritairement chargées positivement et observables en mode positif.

Les ions formés en source sont ensuite focalisés par une succession de lentilles dans le spectromètre de masse jusqu'aux différents analyseurs. Comme pour les sources d'ionisation, il existe une grande variété d'analyseurs, présentant différents avantages et inconvénients (Haag, 2016). Les quadripôles et les pièges à ions sont des analyseurs de basse résolution, permettant de mesurer les valeurs de m/z des ions à une unité près, tandis que les analyseurs à temps de vol (TOF), à résonance cyclotronique d'ion (FT-ICR) ou les trappes orbitales (ou orbitrap) sont considérés comme des analyseurs de haute résolution. En mode balayage, (MS simple, mesure d'une gamme de m/z), ils permettent de mesurer la valeur de m/z des ions avec une précision proche d'une partie par million (ppm), permettant de proposer, de ces mesures, les formules brutes des métabolites analysés.

Ces analyseurs peuvent également être montés en tandem (mode MS/MS) pour augmenter la sélectivité et la précision de l'analyse. Dans ce cas, un ion d'intérêt (ion parent) repéré en MS, est sélectionné dans le premier analyseur, puis fragmenté en ions fils dans le second analyseur (cellule de collision). Les ions fils formés sont ensuite

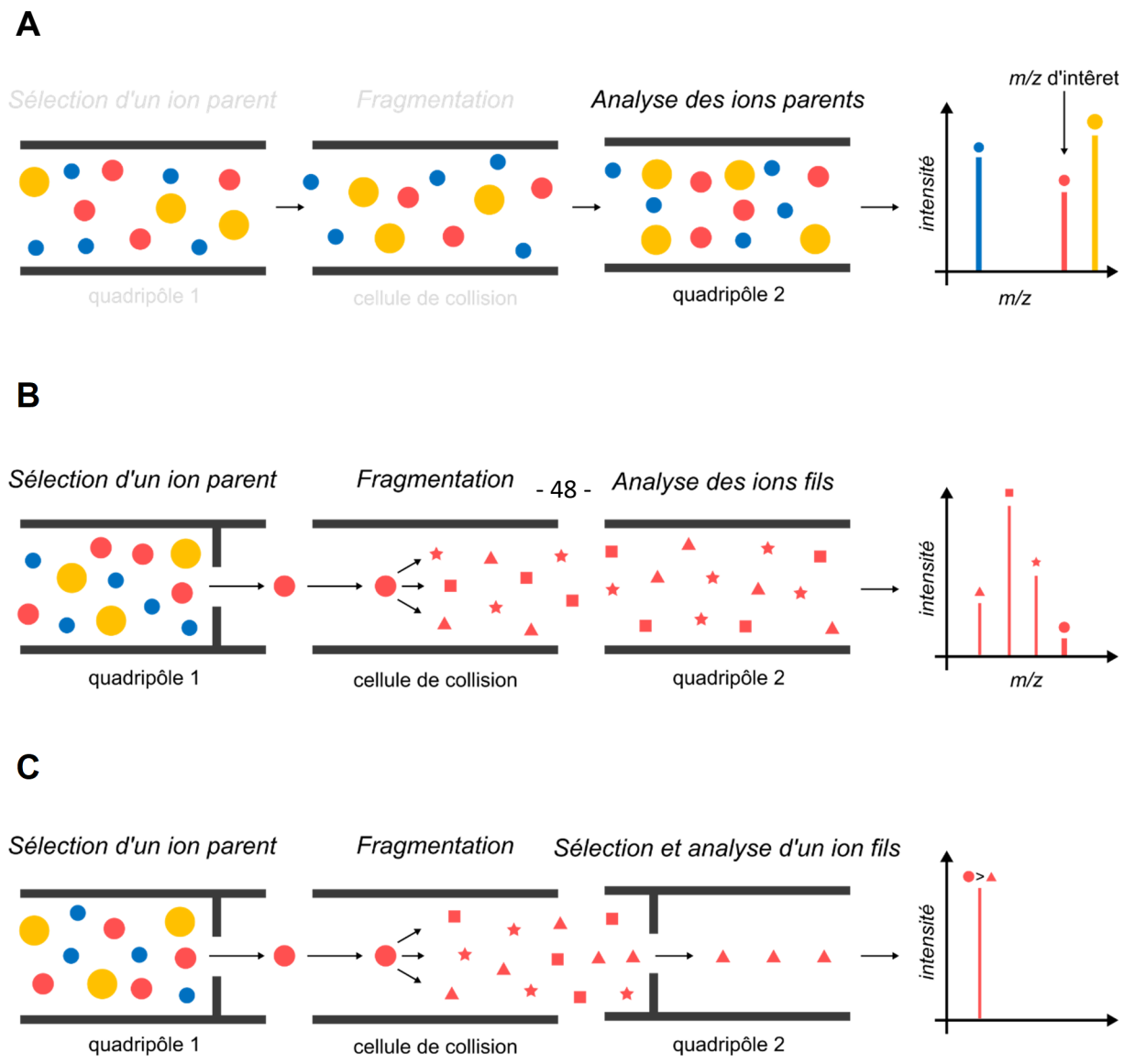


Figure 12 : Principe des trois mode d'analyses : balayage, MS/MS et MRM

Représentation de différents modes d'analyses utilisés couramment en spectrométrie de masse. **(A)** Mode balayage (full-scan) : tous les ions issus de la source d'ionisation sont analysés par le dernier analyseur (trappe linéaire ou orbitrap) sans fragmentation. Si un m/z d'intêret est détecté, l'ion associé sera ensuite selectionné pour être fragmenté en mode MS/MS ou MRM. **(B)** Mode MS/MS : l'ion parent précédement identifié est selectionné par le premier quadripôle, pour être fragmenté dans la cellule de collision. L'ensemble des ions fils formés est analysé par l'orbitrap, leurs m/z et leurs intensités sont enregistrés. **(C)** Mode MRM : l'ion parent d'intêret est sélectionné par le premier quadripôle, pour être fragmenté dans la cellule de collision. Parmi les ions fils formés, un seul sera selectionné par le troisième quadripôle, et son intensité sera enregistrée.

mesurés dans un troisième analyseur. Ces analyses en MS/MS sont possibles en mettant en ligne plusieurs analyseurs (par exemple un couplage triple-quadripôles (Figure 12A)) et permettent de proposer ou confirmer une structure associée à un ion parent (Kind *et al.*, 2018), ainsi que de quantifier des métabolites. Pour finir, ces analyseurs sont finalement associés à un détecteur qui permet de transformer le signal ionique en signal numérique amplifié.

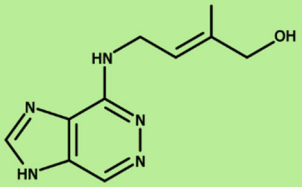
Spectrométrie de masse en haute résolution, pour l'identification des molécules

Comme expliqué précédemment, les spectromètres de masse haute résolution sont capables de déterminer le rapport m/z des ions avec une grande précision, de l'ordre du ppm (Makarov and Scigelova, 2010) tant sur les ions précurseurs que sur les ions fils, obtenus après fragmentation. Grâce à ces mesures précises, il est possible de déterminer la formule brute des ions parents et fils, et ainsi proposer une structure de la molécule identifiée, comparativement aux standards ou à des banques de données. Dans le cas où on recherche des molécules connues, les analyses sont réalisées en mode balayage de m/z (mode MS), suivies d'une analyse après fragmentations ciblées (mode MS/MS), grâce à une liste d'inclusion d'ions précurseurs d'intérêt pré-enregistrée. Par ailleurs, le mode full-scan présente l'avantage d'aller rechercher *a posteriori* dans les données déjà enregistrées, de nouvelles molécules en recherchant des valeurs d'ions précises. Ces spectromètres sont toutefois souvent relativement peu sensibles, les limites de détections (LOD) sont élevées et ils sont souvent assez sensibles aux matrices complexes, d'où la nécessité de réaliser des séparations chromatographiques efficaces en amont de l'analyse.

Plusieurs niveaux de confiance peuvent être accordés en fonction de l'analyse et de l'identification d'un composé, en fonction de la quantité et qualité de l'information apportées par l'analyse (Schymanski *et al.*, 2014) (Figure 13). Le niveau de confiance le plus élevé, niveau 1, est obtenu quand la molécule est identifiée au même temps de rétention chromatographique qu'un standard et que l'analyse menée en MS et MS/MS ou une autre méthode d'analyse complémentaire, produit des résultats similaires. Si aucun standard n'est disponible, mais que les spectres MS/MS peuvent être comparés à des banques de données expérimentales ou théoriques, alors, le niveau d'identification est

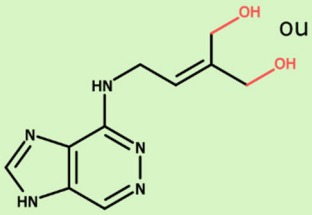
Niveau 1 - Structure confirmée
(avec un standard)

Temps de rétention + MS + MS/MS ou MRM



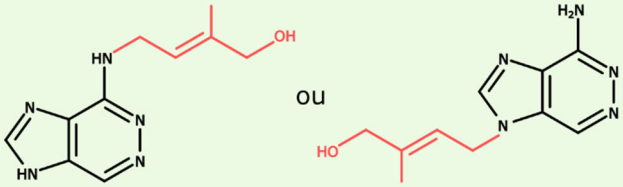
Niveau 2 - Structure probable
(absence de standards)

MS + MS/MS ou MRM
+ comparaison avec des banques de données MS/MS ou données exérimentales



Niveau 3 - Structure partielle

MS + MS/MS ou MRM
+ données expérimentales



Niveau 4 - Formule brute

MS (+ adduits et isotopes ou MS/MS) **$C_{10}H_{13}N_5O$**

Niveau 5 - Masse exacte

MS seule *m/z* = 220,1193

Figure 13 : Différents niveaux de confiance accordés à une analyse en spectrométrie de masse en haute résolution proposés par (Schymanski *et al.*, 2014) (exemple pour l'analyse de la zéatine)

Le degré de certitude d'identification d'une molécule augmente en fonction de la quantité de données expérimentales à disposition, allant de 1 pour une analyse menée en LC-MS, avec des données de MS, de MS/MS et un temps de rétention (RT) comparés à ceux obtenus avec un standard, jusqu'à 5 quand seulement une masse exacte a pu être obtenue.

de 2. Le niveau 3 signifie que la structure de la molécule est probable, mais des incertitudes isomériques demeurent. Au niveau 4, seule la formule brute a pu être identifiée, mais aucune structure moléculaire ne peut être déterminée. Le niveau 5 correspond seulement à l'enregistrement d'une masse exacte (avec une précision de 5 ppm ou moins) sans pour autant pouvoir proposer une formule brute (Schymanski *et al.*, 2014).

Spectrométrie de masse en basse résolution, pour la quantification des molécules

Les analyses en mode Multiple Reaction Monitoring (MRM) sont privilégiées sur un spectromètre de masse triple quadripôles (TSQ) ou quadripôle-cellule de collision-trappe à ions linéaire (Q-Trap), pour détecter des molécules connues en faibles abondances, ou dans des matrices complexes. Le premier quadripôle permet de sélectionner un ion présentant un m/z spécifique (ion parent), qui sera ensuite fragmenté dans la cellule de collision (Figure 12B). Le troisième quadripôle, sert ensuite à sélectionner un des ions fils formés. Ainsi, ce mode d'analyse permet d'atteindre une sensibilité élevée en éliminant l'ensemble des ions non spécifiques, tout en permettant également une double sélectivité qui permet une identification des molécules avec un fort degré de certitude malgré l'absence de détecteur haute résolution (Vidova and Spacil, 2017). Cette méthode requiert en amont l'analyse de standards, afin de confirmer le temps de rétention du composé à analyser, de sélectionner les transitions MRM les plus intenses, optimiser les différents paramètres de guidage des ions et de fragmentation et de déterminer les énergies de collision optimales à appliquer à chaque ion parent pour obtenir les ions fils en plus grande abondance. L'absence de standards peut toutefois être compensée par des données bibliographiques, listant les transitions, les paramètres adaptés et les temps de rétention, mais le degré de certitude accordé à l'analyse diminue. Ces analyses ne peuvent être réalisées que sur des molécules connues, elles sont donc dédiées à la quantification, ou à la recherche de leur présence à l'état de traces. Ces spectromètres de masse présentent une grande gamme de linéarité, permettant une quantification relativement précise de plusieurs molécules en mélanges et en concentrations variées.

4 - Hypothèses et objectifs

Les champignons mycorhiziens et les plantes ont évolué en interaction depuis plus de 450 millions d'années et mis en place des moyens de communication, à l'échelle moléculaire, pour établir et maintenir leur relation symbiotique. Les hormones végétales, produites par la plante, sont connues pour être impliquées dans la régulation de la symbiose. Il est probable que les CMAs produisent aussi des hormones végétales, mais qu'en est-il réellement ? Et s'ils en produisent, quelle sont leurs fonctions biologiques sur le champignon, et sur la symbiose ?

Le premier objectif de cette thèse a consisté à détecter la présence de phytohormones dans des échantillons fongiques purs. Pour cela, une analyse ciblée, la plus exhaustive possible, a été réalisée. Cette analyse a été faite en recherchant, par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse et par chromatographie gazeuse, le plus grand nombre de phytohormones présentes dans des exsudats et des extraits de spores axéniques de *R. irregularis*. Ces expériences nous ont conduit à l'identification et la validation de la présence de quatre phytohormones chez ce CMA.

Le deuxième objectif de ma thèse a été d'accumuler des données pour tenter de déterminer l'origine de biosynthèse des phytohormones précédemment identifiées, qui peuvent être exportées de la plante vers le champignon durant les échanges symbiotiques, ou biosynthétisées par le CMA lui-même. Nous avons cherché à déterminer si *R. irregularis* est capable de synthétiser ces hormones végétales à travers différentes expériences, allant de cinétiques d'exsudations, d'analyses d'hormones produites par le champignon par rapport à celles présentes dans la plante mycorhizée, ou encore à l'aide de premières expériences utilisant des marquages isotopiques.

Pour finir, nous avons initié la description du rôle de ces hormones dans la physiologie du champignon. *R. irregularis* possède deux récepteurs putatifs histidine kinase, lui permettant potentiellement de percevoir les cytokinines et l'éthylène. A l'aide d'ajouts exogènes de ces deux hormones, nous avons mis en place différentes expériences pour commencer à identifier leur impact sur la germination des spores, l'établissement de la symbiose et enfin la régulation transcriptomique.

- Chapitre 1 -
Détection d'hormones végétales chez *R. irregularis*

Préambule

Ce chapitre se consacre à la détection d'hormones végétales par des approches biochimiques. Le premier objectif de ma thèse était de vérifier si les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) étaient capables de « produire » des hormones végétales. Certaines études ont démontré la présence de certaines hormones chez ces champignons, la plupart du temps par des procédés indirects ou peu spécifiques (Barea and Azcón-Aguilar, 1982; Esch *et al.*, 1994; Ludwig-Müller *et al.*, 1997). De nombreux autres micro-organismes sont capables de produire et sécréter des hormones végétales (Gay *et al.*, 1994; Chanclud and Morel, 2016; Kudoyarova *et al.*, 2019). Nous avons donc entrepris la recherche et l'identification d'hormones végétales dans des échantillons fongiques par des approches biochimiques sensibles et précises.

Les CMA sont des organismes biotrophes obligatoires, et leur survie dépend intégralement de leurs interactions symbiotiques. La présence d'une plante hôte dans les cultures fongiques nous empêche de distinguer les hormones produites par la plante de celles produites par le champignon. De plus, une grande quantité de matrice fongique est requise pour permettre par la suite l'extraction et l'analyse des hormones végétales. Notre partenaire, l'entreprise Agronutrition, a été en mesure de produire de grandes quantités de spores de CMA *in vitro* dans des boîtes DC. Les hyphes extra-racinaires se développent dans le second compartiment, produisant ainsi des spores et du mycélium. Ce second compartiment est inaccessible pour les racines, et le champignon s'y développe en absence de tissu végétal, en étant toutefois toujours connecté à son hôte. Afin d'éliminer d'éventuelles contaminations d'origine végétale, les spores sont rincées avec de l'eau Milli-Q stérile au début de chaque expérience. Les échantillons sont donc

analysables sans craindre une contamination d'hormones produites par la plante hôte, ou d'autres micro-organismes.

Les hormones végétales étant généralement présentes en faible concentration, leur analyse nécessite des moyens de détection sensibles, couplés à des processus de concentration et d'échantillonnage efficaces. De plus, les hormones sont réparties dans neuf familles, présentant des caractéristiques physico-chimiques très variées. Avant le début de ce projet, la plateforme MétaToul, et plus précisément le plateau AgromiX, rattaché au laboratoire, a développé un protocole d'extraction globale des hormones végétales (Pons *et al.*, 2020). L'application de ce protocole à nos matrices fongiques, la mise à disposition de spectromètres de masse, ainsi que l'accès à de grande quantités de matériel biologique, nous ont permis de réaliser l'analyse des hormones végétales dans des échantillons de CMA.

Résumé de l'article

Dans cet article, nous avons analysé par spectrométrie de masse, les hormones présentes dans des échantillons de spores de *R. irregularis* et dans leurs exsudats. Par comparaison avec 38 standards et modèles théoriques de fragmentation de phytohormones, nous avons identifié et confirmé la présence de trois hormones végétales chez *R. irregularis*. Une auxine (l'IAA) et une cytokinine (isopentenyl-adénosine (iPR)) ont été retrouvées dans les exsudats et dans les spores, tandis qu'une gibbérelline (acide gibbérellique 4 (GA_4)) n'a été identifiée que dans les échantillons de spores.

Nous avons également montré la production d'éthylène par des spores en germination de *R. irregularis*, détecté par GC-FID dans l'espace de tête des tubes contenants les spores en germination. L'exposition des spores à la lumière induit la production d'éthylène, et celle-ci est amplifiée par des ajouts exogènes de méthionine au milieu de germination. Enfin, l'acide α-keto γ-methylthiobutyrique (KMBA), molécule photo-oxydable en éthylène et issue de la déamination de la méthionine, a été identifiée dans des exsudats de spores traitées à la méthionine. L'ensemble de ces résultats suggère que *R. irregularis* produit de l'éthylène par la voie de biosynthèse du KMBA.

Ainsi, nous avons démontré la présence de quatre hormones végétales chez un CMA, dont trois étant relâchées dans le milieu extracellulaire, et une piégée dans les spores. L'éthylène est effectivement produit par les spores en germination, mais l'origine de biosynthèse, fongique ou végétale, de l'auxine, de la cytokinine et de la gibbérelline reste à démontrer, et leurs rôles dans la biologie des CMA restent à explorer.

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Phytohormone production by the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*

Simon Pons[1,2], Sylvie Fournier[1,2], Christian Chervin[3], Guillaume Bécard[1], Soizic Rochange[1], Nicolas Frei Dit Frey[1]*, Virginie Puech Pagès[1,2]*

1 Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Castanet-Tolosan, France, **2** MetaboHub-Metatoul AgromiX, Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Castanet-Tolosan, France, **3** Génomique et Biotechnologie des Fruits, Université de Toulouse, Toulouse INP, INRA, Castanet-Tolosan, France

* puech@lrsv.ups-tlse.fr (VPP); frei-dit-frey@lrsv.ups-tlse.fr (NFDF)

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Pons S, Fournier S, Chervin C, Bécard G, Rochange S, Frei Dit Frey N, et al. (2020) Phytohormone production by the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. PLoS ONE 15(10): e0240886. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240886

Editor: Richard A. Wilson, University of Nebraska-Lincoln, UNITED STATES

Received: July 29, 2020

Accepted: October 5, 2020

Published: October 16, 2020

Copyright: © 2020 Pons et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was partially financed by the ANR Mycormones (ANR-18-CE20-0001), MetaboHUB network (ANR-11-INBS-0010), the Tulip LabEx (10-LABX-0041), and the French ministry of Higher Education, Research and Innovation.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Arbuscular mycorrhizal symbiosis is a mutualistic interaction between most land plants and fungi of the glomeromycotina subphylum. The initiation, development and regulation of this symbiosis involve numerous signalling events between and within the symbiotic partners. Among other signals, phytohormones are known to play important roles at various stages of the interaction. During presymbiotic steps, plant roots exude strigolactones which stimulate fungal spore germination and hyphal branching, and promote the initiation of symbiosis. At later stages, different plant hormone classes can act as positive or negative regulators of the interaction. Although the fungus is known to reciprocally emit regulatory signals, its potential contribution to the phytohormonal pool has received little attention, and has so far only been addressed by indirect assays. In this study, using mass spectrometry, we analyzed phytohormones released into the medium by germinated spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. We detected the presence of a cytokinin (isopentenyl adenosine) and an auxin (indole-acetic acid). In addition, we identified a gibberellin (gibberellin A_4) in spore extracts. We also used gas chromatography to show that *R. irregularis* produces ethylene from methionine and the α-keto γ-methylthio butyric acid pathway. These results highlight the possibility for AM fungi to use phytohormones to interact with their host plants, or to regulate their own development.

Introduction

Arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis is a 460 million-year-old interaction [1] between glomeromycotina fungi and over 70% of land plants [2]. In angiosperms, AM fungi colonize the inner root cortex of their host to develop intracellular ramified structures called arbuscules. These arbuscules are the main site for nutrient exchange between the plant and the fungus. AM fungi provide their host plant with water and minerals, and in return receive carbon sources (mainly sugars and lipids) [3, 4]. As AM fungi are obligate biotrophs, this interaction is essential for their growth, development and reproduction. On the plant side, this interaction is most often beneficial as it can improve nutrition and/or resistance to biotic and abiotic stresses [5–7].

Prior to physical contact, the two partners of the AM symbiosis interact via signalling molecules [8, 9]. Host roots release several types of compounds affecting the presymbiotic development of AM fungi, such as some flavonoids, phenolic compounds, hydroxy fatty acids [10, 11]. Particular attention has been paid to the root-exuded strigolactone phytohormones: they stimulate the germination of AM fungal spores, the oxidative metabolism and branching of germinating hyphae, and finally root colonization [12–15]. In addition, *N*-acetylglucosamine-based compounds could be exchanged in two directions. Lipochitooligosaccharides (LCOs) and chitooligosaccharides (COs) are released by germinating spores of AM fungi and stimulate the initiation of the symbiosis via the activation of the common symbiosis signalling pathway and the activation of lateral root formation [16–18]; and a plant exporter of N-acetylglucosamine has been shown to be required for the first steps of the interaction [19]. Finally, additional, yet unidentified, signals of plant or fungal origin may act prior to root colonization [20–23].

Later stages of AM interactions are regulated by a number of factors, including nutrient exchange [23] and phytohormones [24, 25]. Analysis of AM symbiosis regulation by phytohormones has revealed a complex pattern of modified hormonal contents or altered response to hormones in mycorrhizal plants. Reciprocal effects of exogenous hormone application on the symbiotic interaction have also been found. Although observations were made across a wide range of combinations of plant/fungal species and experimental conditions, it is possible to draw broad conclusions about the role of the different hormone families. Auxins (AUX), abscisic acid (ABA) and brassinosteroids (BRs) have been identified as positive regulators of the AM symbiosis [26–28]. On the contrary, gibberellins (GAs) and salicylic acid (SA) have been described as negative regulators of the interaction [29–31]. The effects of cytokinins have not yet been clearly established [32]. Finally, the role of ethylene (ET) and jasmonic acid (JA) seems to vary with their concentration [33–36].

Importantly, these studies have addressed the role of phytohormones in the AM symbiosis by two main approaches: the analysis of plant mutants affected in phytohormone synthesis or perception, and the treatment of mycorrhizal plants with exogenous hormones. The study of hormone perception mutants clearly addresses the effects of hormones on the plant. In contrast, both exogenous treatments and hormone deficiency in the plant result in modified hormonal contents in colonized roots, which could impact either or both symbionts. In spite of this, and because phytohormones are generally seen as plant signals, results of such studies are commonly interpreted exclusively in terms of impacts on the plant. Likewise, changes in hormonal contents measured in mycorrhizal plants are usually attributed to modifications of hormonal metabolism in plant cells. This interpretation ignores a potential contribution of the fungal partner to the hormonal pool. Yet, many microorganisms can produce phytohormones and this could also be the case of AM fungi. Among soil microorganisms interacting with plants, plant growth-promoting rhizobacteria and fungi have been shown to produce auxin, cytokinins, ABA and gibberellins [37, 38], and this can contribute to their growth-promoting effects [39]. In the fungal kingdom, phytohormone production has been documented in symbionts like ectomycorrhizal fungi [40, 41], as well as in pathogens [37]. Ethylene is quite common among phytohormones produced by fungi [42–45] and in some cases the biosynthetic pathways have been characterized. The α-keto γ-methylthio butyric acid (KMBA) pathway, well described in *Botrytis cinerea* [44], requires the deamination of methionine into KMBA. Subsequently, KMBA can be oxidised into ethylene through different means. It can either be oxidized by hydroxyl radicals [46], by peroxidases [47], or by the photo-oxidation of flavins [48]. In contrast, the second ethylene-producing pathways in microorganisms involves a very specific enzyme. The Ethylene Forming Enzyme (EFE), described in *Penicillium digitatum*, or *Fusarium oxysporum* [42, 49], produces ethylene through two simultaneous reactions using L-arginine and 2-oxoglutarate as co-substrates. Both pathways differ from the main pathway for

ethylene production in plants which involves a light-independent and methionine-dependent pathway requiring the aminocyclopropane-carboxylate (ACC) synthase (ACS) and ACC oxidase (ACO).

The fact that many plant-associated microorganisms produce phytohormones raises the possibility of a similar behaviour in AM fungi which have co-evolved with plants for over 400 million years. This question is challenging to address experimentally, essentially because of the obligate biotrophy of these fungi. This feature implies that isolated fungi can only be kept in culture for short periods of time, and limits the availability of biological material. Nevertheless, previous studies have provided indirect evidence for the presence of phytohormones in AM fungi. ELISA tests indicated that spores and hyphae of *Rhizophagus* (formerly *Glomus*) species could contain aglycone and glycosylated ABA [50], while indirect bioassays suggested the presence of gibberellin-like and cytokinin-like molecules [51]. A direct analysis by GC-MS of spore extracts revealed the presence of small amounts of IAA in *Glomus intraradices*, but in this study spores were directly taken from maize pot cultures, hence not in axenic conditions, and may have been contaminated with root fragments or other microorganisms [52].

In this study, we analysed the presence of phytohormones in germinating spores, or in their exudates, of the model AM fungus *Rhizophagus irregularis* grown axenically. We used a combination of gas/liquid chromatography and mass spectrometry to allow unambiguous compound identification. In the case of ethylene, we investigated the putative biosynthetic pathways through the use of metabolic precursors.

Materials & methods

Chemicals, reagents and standards

Phytohormone standards were purchased from Olchemim [isopentenyl adenine (iP), isopentenyl adenosine (iPR), isopentenyl adenine-9-glucoside (iP9G), kinetine (Ki), *meta*-topoline (*m*T), *trans*-zeatine (*t*Z), *cis*-zeatine (*c*Z), *trans*-zeatine riboside (*t*ZR), *cis*-zeatine riboside (*c*ZR), dihydrozeatine (DHZ), benzyladenine (BAP), gibberellic acid 1 (GA_1), indole-3-acetic acid aspartate (IAA-Asp), abscisic acid glucose ester (ABA-GE), brassinolide (BL)], Fluka [indole-3-butyric acid (IBA), naphtalenic acetic acid (NAA)], Acros Organics [indole-3-acetic acid (IAA), indole-3-propionic acid (IPA), abscisic acid (ABA)], Sigma-Aldrich [indole-3-acetic acid alanine (IAA-Ala), jasmonic acid (JA), strigol], Fisher chemical [gibberellic acid 3 (GA_3)] and Duchefa [gibberellic acid 4 (GA_4)]. We prepared the standards following the manufacturer's recommendations, and stored solutions at -20˚C. L-Methionine and α-keto-γ-methylthio butyrate (KMBA) were purchased from Sigma-Aldrich. LC/MS-grade acetonitrile and HPLC-grade methanol were purchased from Fisher Chemical, formic acid from Acros Organics, and ammonium hydroxide from Sigma-Aldrich.

Fungal culture and exudate preparation

Rhizophagus irregularis DAOM 197198 sterile spores were purchased from Agronutrition (Labège, France). The spores were produced in axenic conditions. Spore numbers were determined by the supplier by counting spores in an aliquot of the sold suspension with a binocular microscope. Spores were rinsed from their storage buffer using a 40 μm nylon cell strainer (VWR) by five washes with sterile UHQ water. Spores were resuspended in sterile UHQ water and stored at 4˚C before use.

For the production of germinated spore exudates (GSE), spores were germinated in sterile UHQ water in a CO_2 incubator (30˚C, 2% CO_2) for 7 days with a concentration of 400 spores. mL^{-1} in 25 mL Petri dishes. GSE were filtered through a glass-fiber frit (Chromabond,

Macherey-Nagel, France), then frozen in liquid nitrogen and freeze-dried. Filtered spores were collected and stored at -80˚C.

Phytohormone and KMBA extraction

From germinated spore exudates. Freeze-dried GSE from 10,000 spores or 250,000 spores of *R. irregularis* were reconstituted in 100 μL of 1 M formic acid and stored at -20˚C before MS analysis.

From ground spores. The protocol of phytohormone extraction and separation by Solid Phase Extraction (SPE) was adapted from Kojima *et al.* [53] as follows. Two hundred and fifty thousand spores were hand-ground in liquid nitrogen with a mortar and pestle, resuspended in 1 mL of cold modified Bieleski's solvent (methanol/water/formic acid 75:20:5, v:v:v; [54]) and left overnight at -20˚C to achieve complete extraction. The crude extracts were centrifuged for 15 min at 10,000 x *g*, at 4˚C. The pellet was reextracted in 200 μL modified Bieleski's solvent for 30 min at -20˚C, centrifuged 15 min at 10,000 x *g*, and the supernatant pooled with the first one. Extracts were pre-purified on SPE Oasis HBL cartridges (1 mL per 30 mg, Waters). Cartridges were conditioned in 1 mL methanol and equilibrated in 1 mL of 1 M formic acid. Two-mL samples were loaded and eluted with 1 mL modified Bieleski's solvent. Eluates containing phytohormones were dried under nitrogen stream and reconstituted in 1 mL of 1 M formic acid. The separation of phytohormones was achieved with SPE Oasis MCX cartridges (1 mL per 30 mg, Waters). Cartridges were conditioned in 1 mL methanol and equilibrated in 1 mL of 1 M formic acid. Samples were successively eluted by 1 mL methanol (fraction 1, containing neutral and acidic hormones), 1 mL of 0.35 M ammonium hydroxide (fraction 2) and 1 mL methanol/0.35 M ammonium hydroxide 60:40 (fraction 3, containing cytokinins) [53]. The three fractions were dried under nitrogen stream and kept at 4˚C before analysis. Fractions were reconstituted in 100 μL 1 M formic acid and then analysed by LC-MS.

LC-MS analysis of phytohormones

Samples (GSEs or fractions obtained from ground spores as previously described) were analysed by UHPLC-MS with two types of mass spectrometers, a Q-Trap 5500 (AB Sciex) in MRM mode for higher detection sensitivity, and a Q-Exactive Plus™ (Thermo Scientific) for higher mass accuracy by high resolution analysis, each of them having their own advantages. The Q-trap 5500 mass spectrometer allows to perform analysis in multiple reaction monitoring (MRM) mode, which improves selectivity and detection sensitivity for targeted metabolites [55], whereas the Q-Exactive plus is equipped with an orbitrap analyzer, allowing to measure the *m/z* ratio of each ion with greater mass accuracy for structural confirmation [56].

Twenty-one biological replicates of GSE were used to perform phytohormone detection. IPR was consistently identified in GSE, but probably due to biological variability, IAA was detected in 76% of them. Thirteen samples were used to perform quantification. Twelve replicates of ground spores were used for detection of phytohormones. GA_4 was detected in 66% of them.

Multiple reaction monitoring (MRM) analysis. A UHPLC system (Dionex Ultimate 3000, Thermo Scientific) was equipped with a Kinetex C18 column (100 × 2.1 mm, 2.6 μm, 100 Å, Phenomenex) heated at 45˚C. Five-μL samples were injected. Separation was performed at a constant flow rate of 0.3 $mL.min^{-1}$, in a gradient of solvent A (water + 0.1% formic acid) and B (acetonitrile + 0.1% formic acid): 1 min 5% B; 11 min 5% to 100% B; 2 min 100% B, and re-equilibration to the initial conditions in 4 min. The Q-Trap 5500 mass spectrometer was equipped with an electrospray source. Curtain gas was set to 30 psi, nebulizer to 40 psi and turbo gas to 60 psi. Capillary voltage was set to 5.5 kV (positive mode) or -4.5 kV (negative

mode) on Electrospray Ionization (ESI) source (400˚C). Samples were monitored in positive and negative modes in scheduled Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode (60s). Using 25 standards of free or conjugated hormones, in infusion mode (7 μL.min^{-1}), the best parameters for declustering potential, collision energy and collision cell exit potential were selected for precursor and product ions measurement. Ionization mode, selected MRM transitions, limit of detection (LOD) and retention time for each hormone are listed in S1 Table. Limits of detection (signal to noise ratio > 3) were determined using standards diluted from 0.1 mM to 1pM in methanol. By this approach, we could perform an approximate quantification of phytohormones in fungal samples. Data processing was performed using Analyst 1.6.2 software.

High resolution mass spectrometry (HRMS) analysis. A UHPLC system (Ultimate 3000 RSLC system, Thermo Scientific) was equipped with a Hypersil Gold aQ C18 column (100 mm x 2.1 mm, 1.9 μm, 175 Å, Thermo Scientific #25302102130), heated at 35˚C. Five-μL samples were injected. Separation was performed at a constant flow rate of 0.3 mL.min^{-1}, in a gradient of solvent A (water + 0.05% formic acid) and B (acetonitrile + 0.05% formic acid): 1 min 5% B; 7 min 5% to 96% B; 1 min 96% B and re-equilibration to the initial conditions in 3 min. The Q-Exactive Plus™ mass spectrometer was equipped with a H-ESI II probe, heated at 256˚C. Sheath gas was set to 48, sweep gas to 2, auxiliary gas to 11, and heated at 413˚C. Capillary voltage was set to 3.5 kV in positive mode and -2.5 kV in negative mode. Ionization was performed in positive and negative modes, in full scan analysis (centroid), with a resolution of 35,000. Automatic Gain Control was set to 3.10^6, with a 50 to 600 *m/z* scan range. A Target-MS/MS scan of confirmation of the phytohormone, based on the specified inclusion list (5 ppm), was triggered when the mass spectrometer detected a known phytohormone in an MS spectrum. In this case, Automatic Gain Control was set to 2.10^5, and resolution to 17,500. Data processing was performed by Xcalibur 3.0 and Tracefinder 3.2 softwares.

Ethylene detection

20,000 spores in 2 mL of sterile UHQ water, either untreated, or supplemented with 10 mM of methionine or 1 μM of KMBA, were incubated in a sterilized glass tube (Ø = 1.35 cm, H = 6.10 cm, V = 7.5 mL, dead volume = 5.5 mL) wrapped in tinfoil to avoid light exposure, and sealed with a porous silicone stopper (Hirschmann Instruments). They were germinated for three days in a CO_2 incubator (30˚C, 2% CO_2). The stopper was then replaced by an air-tight rubber stopper, and spores were confined for 1 day and exposed or not to light **(100 μmol photons m^{-2} s^{-1}**, 21˚C).

The headspace ethylene content was assayed by gas chromatography as described previously [57]. One mL of headspace gas was manually injected into a GC-FID (Agilent 7820a), equipped with a 80/100 alumina column (1/8" x 2 mm x 1.5 m, Agilent) and set with the following parameters: oven temperature 70˚C, injector temperature 110˚C, N_2 vector gas flow rate 28 mL.min^{-1}, flame ionization detector temperature 250˚C. Ethylene peak area was measured and normalized with the O_2 injection peak area. Its retention time and calibration were determined with an external standard of 4 ppm of ethylene.

For ethylene production assays: darkness without spores n = 13, light without spores n = 16, darkness with spores n = 17, light with spores n = 18, light and methionine without spores n = 7, darkness and methionine with spores n = 9, light and methionine with spores n = 24, light and KMBA without spores n = 6, light and KMBA with spores n = 6.

KMBA detection by LC-MS

A UHPLC system (Dionex Ultimate 3000, Thermo Scientific) was equipped with a reverse-phase column Acquity UPLC BEH-C18 (2.1 × 150 mm, 1.7 μm, Waters) heated at 45˚C. Ten-

μL samples were injected. Separation was performed at a constant flow rate of 0.3 $mL.min^{-1}$, in a gradient of solvent A (water + 0.1% formic acid) and B (acetonitrile): 1 min 5% B; 8 min 5% to 100% B; 2 min 100% B, and re-equilibration to the initial conditions in 2 min.

A Q-Trap 4500 mass spectrometer (AB Sciex) was used with an electro-spray ionization source in the negative ion mode. Curtain gas was set to 30 psi, nebulizer to 40 psi and turbo gas to 60 psi. Capillary voltage was set to -3.5 kV (negative mode) on Electrospray Ionization (ESI) source (400˚C). Optimizations of the source parameters were done using the KMBA standard at 10^{-5} M water by infusion at 7 $\mu L.min^{-1}$, using a syringe pump. Three GSE sample were analysed for each condition. Data processing was performed using Analyst 1.6.2 software.

Sequence analysis

Glomeromycotina (taxid:214504) nucleotide and protein sequences were analysed using TBLASTN and BLASTP searches with default parameters on the NCBI website. The 2-oxoglutarate-dependent ethylene/succinate-forming enzyme from *Penicillium digitatum* XP_014538251.1 was chosen as query to identify putative EFEs in *R. irregularis*.

Statistical analysis

The version 4.0.0 of R [58], with the version 1.3–1 of package Agricolae [59] and the version 3.1.0 of package GGPlot2 [60] were used for statistical analysis. In order to compare ethylene production between all groups, a non-parametric analysis was carried out using Kruskal-Wallis test and pairwise comparisons were performed using FDR adjustment for multiple comparisons.

Results

Detection of phytohormones in germinated spore exudates and germinated spore extracts

The aim of this study was to investigate the production of phytohormones by the model AM fungus *R. irregularis*. To avoid any contamination with plant-borne phytohormones, it was crucial to start from pure fungal material. We used spores of *R. irregularis* produced in axenic conditions, and the spores, free of root debris, were carefully rinsed to eliminate the storage solution.

We started with an analysis of exudates produced by *R. irregularis* spores germinated in water for seven days. At this stage, although not stimulated by root exudates, the germinating hyphae continue to grow a little and the spores resemble in all respects (shape, density, presence of lipid droplets) to what they were on the first day. These germinated spore exudates (GSE) were concentrated and analysed by Liquid Chromatography (LC) coupled to Mass Spectrometry (MS). The detection of a total of 38 compounds, covering eight hormone families (S1 Table), was attempted. Synthetic standards were available for 25 of these compounds, allowing direct comparison of retention times and MS data. Two types of MS analyses were successively carried out. The highly sensitive Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode was used to look for characteristic precursor-to-product-ion *m/z* transitions upon fragmentation. The retention times associated with these *m/z* transition signals were compared with the retention times of corresponding standards. To further ascertain hormone identification, High-Resolution Mass Spectrometry (HRMS) was then used to extract signals for precursor and product ions of the expected accurate *m/z* (+/- 5 ppm), and again was performed in comparison with standards.

Using these two approaches, we identified two hormones in GSE samples produced by 10,000 spores: the cytokinin isopentenyl adenosine (iPR) and the auxin indole-acetic acid (IAA) (Fig 1A and 1D). In the MRM mode, iPR was detected with the *m/z* transitions

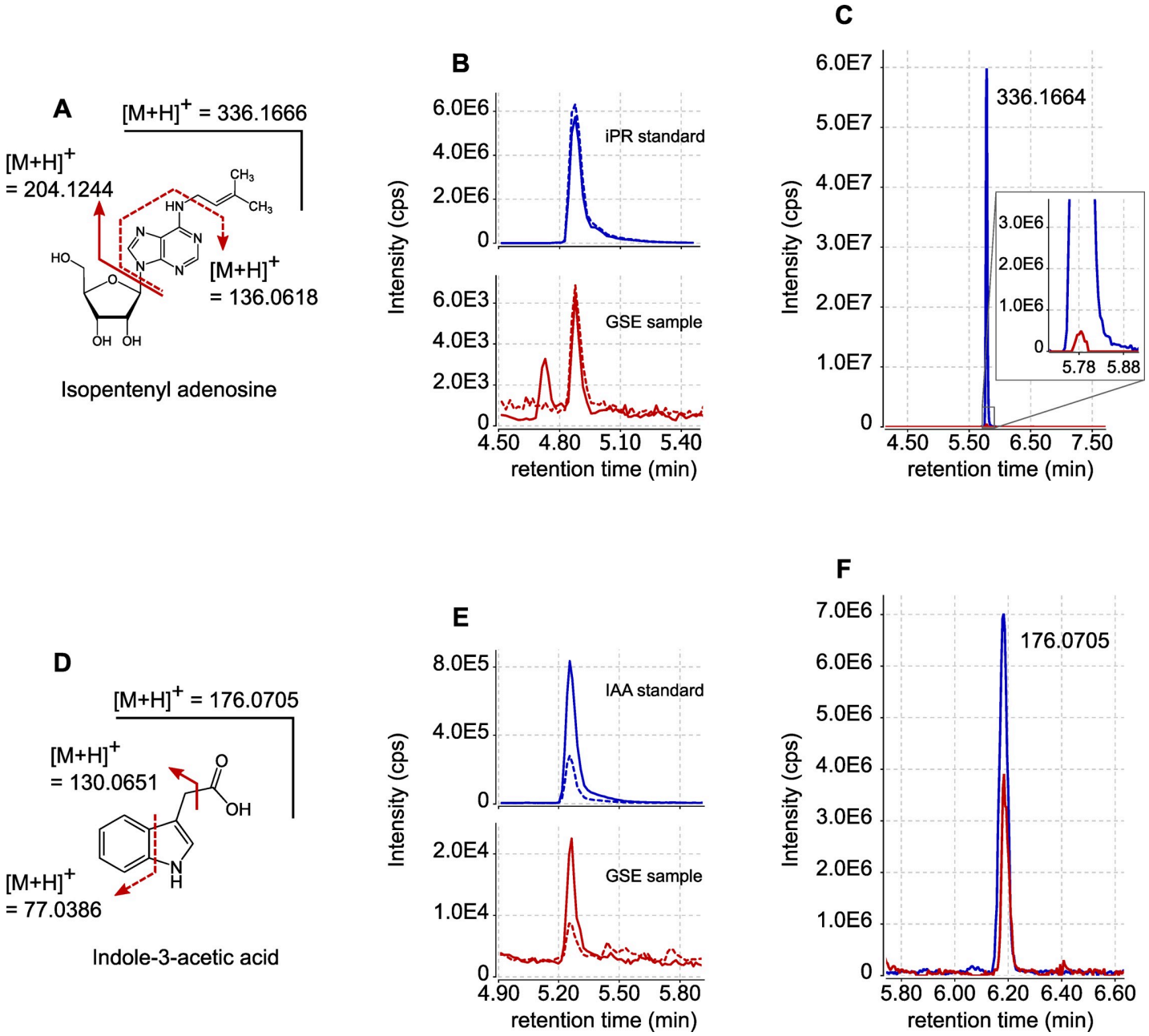


Fig 1. Detection by LC-MS of iPR and IAA exuded by *R. irregularis spores*. (A) Structure and fragmentation pattern of iPR. (B) UPLC-MRM-MS chromatograms of iPR in positive mode. Blue lines represent the signals obtained for iPR external standard (100 nM). Red lines represent the signals obtained with GSE produced by 10,000 *R. irregularis* spores. Plain lines are for *m/z* transition 336 > 204. Dashed lines are for *m/z* transition 336 > 136. (C) LC-HRMS extracted ion chromatogram (XIC) for *m/z* = 336.1666 (+/-5ppm). The blue line represents the signal obtained for iPR external standard (300 nM). The red line represents the signal obtained with GSE produced by 250,000 *R. irregularis* spores. (D) Structure and fragmentation pattern of IAA. (E) UPLC-MRM-MS chromatograms of IAA in positive mode. Blue lines represent the signals obtained for IAA external standard (100 nM). Red lines represent the signals obtained with GSE produced by 10,000 *R. irregularis* spores. Plain lines are for *m/z* transition 176 > 131. Dashed lines are for *m/z* transition 176 > 77. (F) LC-HRMS XIC for *m/ z* = 176.0705 (+/-5ppm). The blue line represents the signal obtained for IAA external standard (300 nM). The red line represents the signal obtained with GSE produced by 250,000 *R. irregularis* spores. Signal intensities are displayed in counts per second (cps).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240886.g001

336 > 204 and 336 > 136; IAA was identified with the *m/z* transitions 176 > 130 and 176 > 77 (Fig 1B and 1E). For both compounds, the observed retention times matched those of the corresponding standards (Fig 1B and 1E). We were able to detect accurately iPR and IAA in 16 out of 21 biological replicates. The other phytohormones presented in S1 Table were not detected in the GSE samples. According to external standard curves, we estimated that one spore could on average exude 1.2 x 10^{-18} mol of iPR (+/- 1.3 x 10^{-18} mol) and 29 x 10^{-18} mol of IAA (+/- 25 x 10^{-18} mol), during seven days of germination. Compound identification was confirmed through HRMS using GSE from 250,000 spores. The precursor ion of *m/z* 336.1662 for iPR, detected at a retention time of 5.78 min (Fig 1C), yielded after selection and fragmentation a product ion of *m/z* 204.1246 (S1 Fig). The precursor ion of *m/z* 176.0706 for IAA, detected at a retention time of 6.18 min (Fig 1F), yielded after selection and fragmentation a product ion of *m/z* 130.0650 (S2 Fig). The mass data, as well as retention times, matched those of the corresponding standards (Fig 1C and 1F).

To investigate whether additional hormones could be present in *R. irregularis* spores, but not released (or in very low amounts) into GSE, we next analysed extracts of 250,000 ground spores. Extracts were pre-purified through two solid-phase extraction (SPE) steps and the fractions where hormones were expected (in the first fraction for acidic and neutral hormones such as auxins and gibberellic acids, and in the third fraction, for basic hormones such as cytokinins) were analysed by LC-MS/MS. In these samples, IAA and iPR were detected, but as trace amounts, perhaps due to the complex nature of the matrix. However, this approach allowed the detection in MRM mode of MS-MS transition signals characteristic of a third phytohormone, gibberellic acid 4 (GA_4). Transitions *m/z* 331 > 257 and 331 > 213 (Fig 2A) were detected in our samples, at almost the same retention time as the standard (retention time shift = -0.09 min, Fig 2B). To investigate whether this slight shift was due to matrix interactions [61], we spiked our sample with the GA_4 standard. This addition yielded a single chromatographic peak without any splitting, at the same retention time as the spore sample alone and with a doubled intensity. We can therefore attribute the slight retention time difference in Fig 2B to matrix interactions during chromatographic separation.

Production of ethylene by *R. irregularis* germinated spores

The release of ethylene by germinating spores was analysed by gas chromatography. To this end, spores were first allowed to germinate for three days in water, in test tubes closed with a gas-permeable stopper. The stopper was then replaced by a gas-tight rubber stopper, and spores were incubated for an additional 24 hours. Gas in the headspace was then sampled for ethylene analysis. We used light dependency as a criterion to distinguish between ethylene biosynthesis pathways. Indeed, light exposure allows to reveal KMBA-dependent ethylene production [44, 45]. Therefore, ethylene production was assessed comparatively in spores protected or not from light.

We noticed in control tubes containing no spores that a background quantity of ethylene was produced in the dark as well as in the light (Fig 3, conditions 1 and 2) [62]. The presence of spores slightly enhanced ethylene production in the dark (Fig 3, conditions 1 and 5). When exposed to light, germinating spores produced about 3 times more ethylene than in the dark, suggesting that this production was dependent on the KMBA pathway (Fig 3, conditions 5 and 7) [44, 46, 48].

To investigate whether the KMBA pathway for ethylene synthesis was used by *R. irregularis*, we tested the effects of adding methionine into the incubation medium. In the dark, methionine addition increased ethylene production by 55% (Fig 3, conditions 5 and 6). While in the light, methionine addition did not increase ethylene production in the absence of spores (Fig

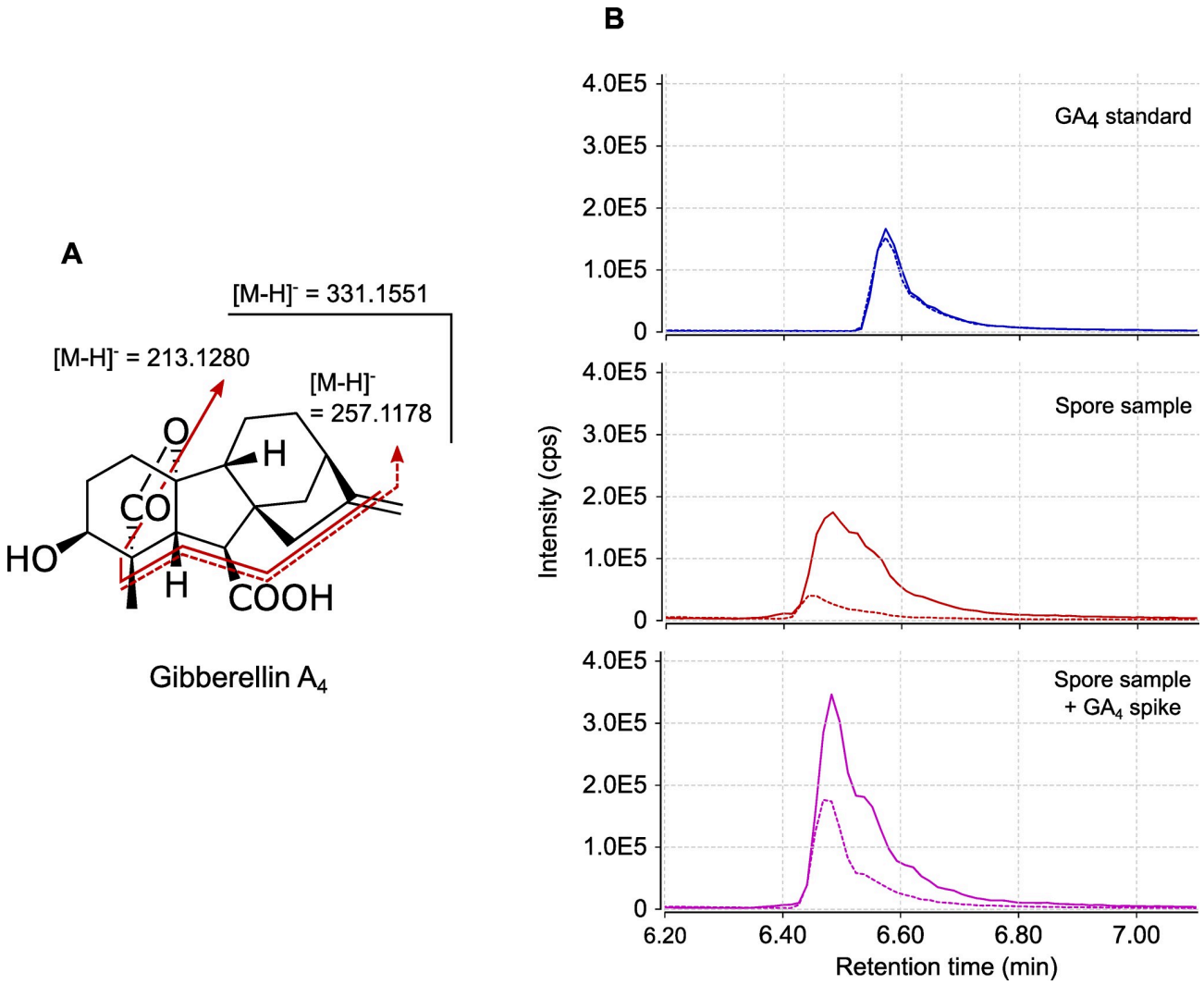


Fig 2. GA_4 detection in multiple reactions monitoring (MRM) mode. (A) Structure and fragmentation pattern of GA_4. (B) UPLC-MRM-MS chromatogram of GA_4 in negative mode. Top (blue lines): External standard (30 nM) of GA_4. Middle (red lines): pre-purified SPE fraction from 250,000 ground spores of *R. irregularis*. Bottom (purple lines): pre-purified SPE fraction from 250,000 ground spores of *R. irregularis* spiked with GA_4 standard to a final concentration of 30 nM. Plain lines are for *m/z* transition 331 > 213. Dashed lines are for *m/z* transition 331 > 257. Signal intensities are displayed in counts per second (cps).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240886.g002

3, conditions 2 and 3), this addition in the presence of spores increased ethylene production by 56% (Fig 3, conditions 7 and 8). We then tested the effects of added KMBA. In the light and in the absence of spores, KMBA did not yield ethylene (Fig 3, conditions 2 and 4). In contrast, in the presence of spores, KMBA addition stimulated an ethylene production (Fig 3, conditions 7 and 9) similar to the methionine treatment.

Finally, we analysed by LC/MS the presence of KMBA in the exudates of spores germinated in the presence or not of methionine. This experiment was carried out in the dark to avoid light oxidation of KMBA. We could not detect the presence of KMBA in samples without methionine whereas we detected a strong KMBA signal in the methionine-treated samples, at a retention time of 3.7 min in MRM mode (*m/z* transitions 147 > 46 and 147 > 99) (S3 Fig).

Genomic sequences of Glomeromycotina were analysed for the presence of genes associated with the different ethylene biosynthesis pathways. The KMBA pathway requires the

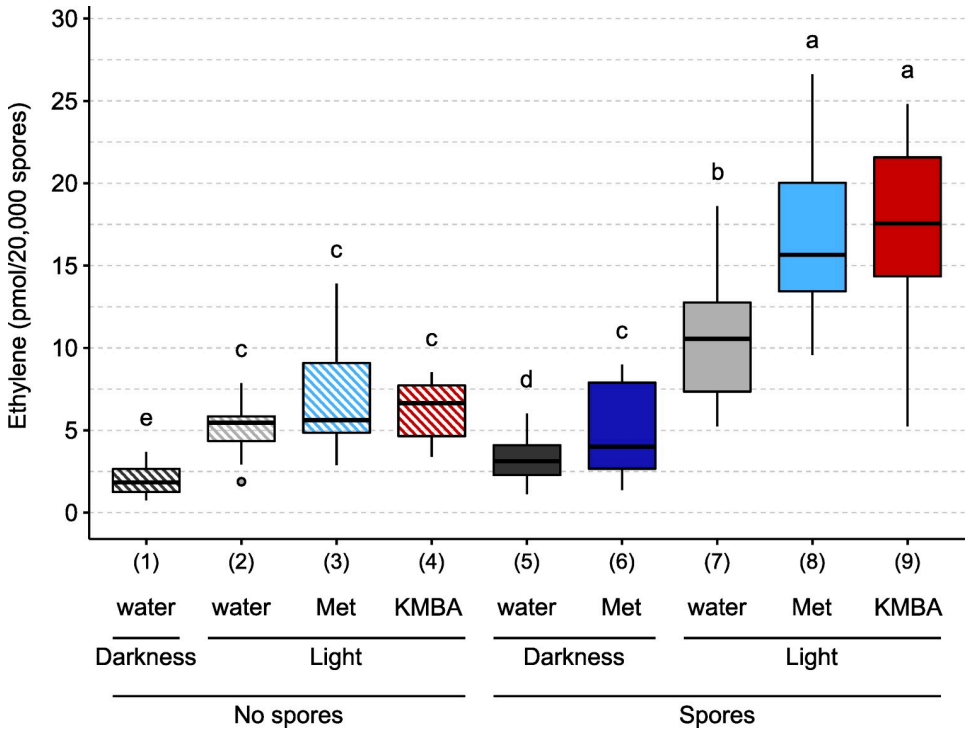


Fig 3. Ethylene production by *R. irregularis* in response to different treatments. 20,000 spores were germinated for three days in the dark, in the presence or absence of 10 mM methionine (Met) or 1 μM α-keto γ-methylthio butyric acid (KMBA). Tubes were then sealed with a gas-tight stopper and exposed to light or darkness for 24h. One mL of the headspace gas was then analysed by gas chromatography. Different letters indicate different statistical groups (pairwise Kruskal-Wallis test with FDR correction, $P < 0.05$).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240886.g003

deamination of methionine into KMBA, which can be mediated by any transaminase, and the oxidation of KMBA into ethylene can be carried out non-specifically by peroxidases, or chemically [46, 63, 64]. Therefore, sequence analyses are not suitable to investigate the existence of this pathway. To look for genes associated with the major ACC pathway used by plants, AtACS1, AtACS8 and AtACS7 were chosen as representative of the three ACS clades described in Arabidopsis [65]. In the three cases, a tyrosine aminotransferase (GLOIN_2v1675208) and a pyridoxal phosphate-dependent transferase (GLOIN_2v1486204) were found as the best hits in *R. irregularis* genome, with only a maximum of 24% identity at the amino acid level with the query sequence. We also used AtACO2, AtACO1 and AtACO5 as representative of the three ACC oxidases (ACO) clades [66]. With these three queries, only hypothetical proteins with less than 26% of identity were found in *R. irregularis* datasets. To look for genes of the EFE pathway, BLAST analysis using the *Penicillium digitatum* EFE protein as query allowed the identification of two isoforms of a protein annotated as Fe (2+) and 2-oxoglutarate (2OG)-dependent dioxygenases in *R. irregularis* (GBC41587.1 and GBC41586.1). However, the similarity with the *P. digitatum* protein was very low (23–24% of identity).

Discussion

Germinated spore exudates of AM fungi are known to trigger a number of symbiotically relevant responses in host root cells (e.g.: activation of nuclear calcium spiking in the root epidermis, transcriptional reprogramming in root cells [67–69]). This indicates that these spore exudates contain molecular signals released by isolated AM fungal spores within a few days of

incubation. GSE form a matrix of relatively low complexity, which favours sensitive compound detection through mass spectrometry. We thus started our study by analysing GSE for the presence of a wide variety of phytohormones. The presence of iPR and IAA was unambiguously demonstrated by a combination of MRM and HRMS analyses, in GSE samples obtained from relatively small amounts of fungal material (10,000 spores). The estimated concentrations are in the same range as those already observed with ectomycorhizal fungal species or in plants [70, 71]. Although the presence of cytokinin-like compounds and of IAA was already suspected or hypothesized in AM fungi [51, 52, 72], the present study is to our knowledge the first conclusive report for the release of these two phytohormones by an AM fungus. It is of course possible that other phytohormones are present in low amounts in GSE, and have escaped detection despite the high sensitivity of the MRM approach (see S1 Table for detection limits).

Analysis of spore extracts was undertaken as a complementary approach to look for hormones that would not be released into GSE. This allowed the detection of MRM signals corresponding to GA_4, at a retention time very close to that of the standard. Despite pre-purification, the fractions of spore extracts remain a complex matrix, which can induce slight shifts in chromatographic retention times. Using a GA_4 standard to spike our sample allowed us to observe that the retention times recorded in the spore sample for both MRM transitions were identical to those of the standard in this matrix (Fig 2). Unfortunately, complex matrices decrease the sensitivity of HRMS analysis. We were thus unable to confirm the identity of this compound through accurate *m/z* determination. Our preliminary observations are however consistent with the previous bioassay-based detection of gibberellin-like compounds in AM fungi [51]. Given that gibberellins can be synthesised (and were actually discovered) in other fungi [73], it would make evolutionary sense to find them also in AM fungi.

In contrast with Esch *et al.* [50], we did not detect the presence of ABA or glycosylated ABA. This difference might be due to the use of different fungal materials. The study of Esch *et al*. was carried out on an unspecified species of the genus *Rhizophagus* (formerly *Glomus*), and perhaps more importantly, the analysed material consisted of extraradical mycelium and spores obtained non axenically after several weeks of culture in pots. Furthermore, in this study, ABA detection was based on indirect ELISA tests, which likely differ from mass spectrometry in terms of sensitivity and specificity.

The detection of an auxin, a cytokinin and a gibberellin in *R. irregularis* does not mean that this fungus is actually able to synthesize these molecules. They could have been produced by the host plant (here the hairy roots of *Daucus carota*), imported by the fungus during the symbiotic exchanges between the two partners and stored in spores. Isotopic labelling experiments could be used to investigate the biosynthetic origin of these hormones, and these approaches could benefit from a very recent work revealing that myristate can be used as an exogenous carbon source and support *in vitro* growth of *R. irregularis* [74].

Unlike the above hormones, there is no doubt about the fungal biosynthetic origin of ethylene. *De novo* ethylene production was measured over a period of 24 h and could be stimulated by the addition of methionine, a metabolic precursor. The addition of methionine strongly enhanced the synthesis of KMBA by the fungus (S3 Fig) and acted synergistically with exposure to light to promote ethylene production (Fig 2). Light- and methionine-dependency are characteristic features of the KMBA pathway described in other fungi [44]. Hence, although we cannot rule out the existence of additional ethylene biosynthetic pathways, our biochemical data support the KMBA pathway as being involved in the synthesis of ethylene in *R. irregularis*. Interestingly, KMBA-derived ethylene was also demonstrated in the ectomycorrhizal fungi *Tuber brochii* and *T. melanosporum* [45]. To further investigate the existence of alternative pathways for ethylene synthesis in *R. irregularis*, we analysed Glomeromycotina genomic sequences. BLAST analyses failed to identify genes with a high homology with those involved

in the classical ACC pathway found in plants. Similarly, the best hits obtained when searching for a fungal EFE exhibited limited identity with the query sequence. The fact that enzymes in the EFE family can be involved in the biosynthesis of a multitude of products [75] sheds further doubt on the role of their *Rhizophagus* homologs in ethylene synthesis. Further studies would be necessary to formally exclude the existence of these two biosynthetic pathways in *R. irregularis*, but in view of these initial investigations, their existence seems unlikely.

The observation that iPR, IAA and ethylene are released by germinating spores into their environment is consistent with a signalling role in the AM symbiosis. A similar hypothesis was proposed by Le Marquer *et al.* [76] with CLAVATA3/Embryo surrounding region-related (CLE) peptides, another type of plant hormone potentially produced and excreted by AM fungi. First, if these hormones are still released at late stages, they could contribute directly to changes in hormonal contents in mycorrhizal plants. For example, AM colonization has been shown to increase auxin concentration in roots of *M. truncatula*, *Zea mays* and *Glycine max* [52, 77, 78]. In tomato roots, the expression of the auxin-dependent reporter DR5-GUS was higher in arbuscule-containing cells than in the surrounding cells [26]. This higher auxin concentration could be partly due to the AM fungus exudation and exportation to root tissues. Second, the release of these hormones by AM fungi could have profound effects on the symbiosis itself, such as the positive effects observed upon auxin treatment, which improves mycorrhization frequency and arbuscule abundance [26, 79]. These hormones could also act through a modulation of plant development. For example, the simultaneous exudation of IAA and Myc-LCOs by the fungus could have synergistic effect on lateral root formation, as shown by Buendia *et al.* [80] with exogenous treatments on *Brachypodium distachyon*. The possible effects of ethylene released by the fungus are more difficult to predict. In arbuscular mycorrhiza, ethylene is mostly described as a negative regulator [30, 67, 81, 82]. This conclusion was mainly drawn from studies using plant mutants disturbed in the production or perception of ethylene. As already proposed, the negative downstream effect of these mutations on AM symbiosis may also result from crosstalks with additional phytohormones and not directly from modifications in ethylene signalling *per se* [35]. Whether through direct or indirect mechanisms, the production of ethylene by AM fungi could serve to prevent excessive colonization of the root system. It is also important to note that ethylene inhibition of AM symbiosis was shown to be concentration-dependent [35] and that, in some cases, a low ethylene concentration was able to stimulate root colonization [36].

In addition to hormonal signalling to the plant, it is also possible that AM fungi use phytohormones to regulate their own development. In support of this hypothesis, candidate genes putatively encoding ethylene and cytokinin receptors were recently identified in the genome of *R. irregularis* [83] and await functional characterization. This study was focused on histidine kinases, and thus does not exclude the existence of other types of receptors for other phytohormones in AM fungi. Indeed, a variety of hormones can affect AM fungal development *in vitro* [12–14, 36, 84, 85]. It can also be noted that phytohormone exudation by plant roots is not restricted to strigolactones, and has also been reported for auxin, abscisic acid, jasmonate, salicylate and a cytokinin [86–89]. Bringing together these observations, it is tempting to speculate on the exchange of several hormonal signals in both directions during AM symbiosis, in addition to the well-known effects of phytohormones as internal regulators of plant physiology. The use of a common language has also been reported in other contexts of host-microbe interactions. For example, plant bacterial pathogens produce cytokinin and have evolved a corresponding receptor [90], and gut bacteria produce and possess sensors for neuroendocrine hormones that were once thought to be specific of their host [91, 92]. In this line, it would be tempting to reconsider the historical name "phytohormones" when these molecules trigger bidirectional cross-kingdom activities. Plants have lived with AM symbionts since they

colonized land, and the molecular language underlying this long-standing and intimate relationship is only beginning to be unravelled. Deciphering the hormonal biosynthesis and perception pathways in AM fungi will certainly help to understand how this common language developed through evolution.

Supporting information

S1 Table. List of molecules analyzed by LC-MS in highly sensitive MRM mode. The hormone family, molecule name, abbreviation, formula, retention time, preferential detection mode, precursor and product ions for MRM analysis and limit of detection (determined using direct infusion of standards diluted from 0.1 mM to 1 pM in methanol) are indicated. Grey lines correspond to theoretical fragmentation values when standards were not available [71, 93].
(XLSX)

S1 Fig. High resolution mass spectra (HRMS) of iPR in positive mode. (A) and (B) HRMS spectra of iPR standard (300 nM), at 5.78 min. (C) and (D) HRMS spectra of 250,000 *R. irregularis* GSE at 5.78 min. (A) and (C), MS spectra. (B) and (D) MS/MS (*m/z* 336.1666 +/- 0.5 Da) spectra.
(EPS)

S2 Fig. High resolution mass spectra (HRMS) of IAA in positive mode. (A) and (B) HRMS spectra of IAA standard (300 nM) at 6.19 min. (C) and (D) HRMS spectra of 250,000 *R. irregularis* GSE, at 6.19 min. (A) and (C) MS spectra. (B) and (D) MS/MS (*m/z* 176.0705 +/- 0.5Da) spectra.
(EPS)

S3 Fig. KMBA detection in multiple reaction monitoring (MRM) mode. (A) Structure and fragmentation pattern of KBMA. (B) UPLC-MRM-MS chromatogram of KMBA in negative mode. Top (blue lines): External standard (500 nM) of KMBA. Middle (red lines): GSE produced by 20,000 spores treated with 10 mM methionine. Bottom (green lines): GSE produced by 20,000 untreated spores. Plain lines are for *m/z* transition 147 > 47. Dashed lines are for *m/z* transition 147 > 99. Signal intensity is displayed in counts per second (cps).
(EPS)

Acknowledgments

We thank Cyril Libourel, Marielle Aguilar and Helene San Clemente for their help with statistical analyses. We thank Maryne Laigle, Virginie Durand and Thibaut Perez for their help with mass spectrometry analysis.

Support for mass spectrometry analyses was provided by the ICT-Mass spectrometry and MetaboHUB-MetaToul- AgromiX Facilities.

Author Contributions

Conceptualization: Simon Pons, Sylvie Fournier, Christian Chervin, Guillaume Bécard, Soizic Rochange, Nicolas Frei Dit Frey, Virginie Puech Pagès.

Data curation: Simon Pons.

Formal analysis: Simon Pons.

Funding acquisition: Soizic Rochange.

Investigation: Simon Pons, Sylvie Fournier, Christian Chervin, Guillaume Bécard, Nicolas Frei Dit Frey, Virginie Puech Pagès.

Methodology: Simon Pons.

Supervision: Christian Chervin, Guillaume Bécard, Nicolas Frei Dit Frey, Virginie Puech Pagès.

Writing – original draft: Simon Pons, Christian Chervin, Guillaume Bécard, Nicolas Frei Dit Frey, Virginie Puech Pagès.

Writing – review & editing: Simon Pons, Christian Chervin, Guillaume Bécard, Soizic Rochange, Nicolas Frei Dit Frey, Virginie Puech Pagès.

References

1. Redecker D. Glomalean Fungi from the Ordovician. Science. 2000; 289: 1920–1921. https://doi.org/10.1126/science.289.5486.1920 PMID: 10988069
2. Brundrett MC, Tedersoo L. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. New Phytol. 2018; 220: 1108–1115. https://doi.org/10.1111/nph.14976 PMID: 29355963
3. Smith S, Read D. Mycorrhizal Symbiosis. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press; 2008. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370526-6.X5001-6
4. Keymer A, Gutjahr C. Cross-kingdom lipid transfer in arbuscular mycorrhiza symbiosis and beyond. Curr Opin Plant Biol. 2018; 44: 137–144. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.04.005 PMID: 29729528
5. Smith SE, Smith FA, Jakobsen I. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. Plant Physiol. 2003; 133: 16–20. https://doi.org/10.1104/pp.103.024380 PMID: 12970469
6. Pozo MJ, Azcón-Aguilar C. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. Current Opinion in Plant Biology. 2007. pp. 393–398. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.05.004 PMID: 17658291
7. Mohammadi K, Shiva Khalesro, Sohrabi Y, Heidari G. A Review: Beneficial Effects of the Mycorrhizal Fungi for Plant Growth. J Appl Environ Biol Sci. 2011; 1: 310–319.
8. Choi J, Summers W, Paszkowski U. Mechanisms Underlying Establishment of Arbuscular Mycorrhizal Symbioses. Annu Rev Phytopathol. 2018; 56: 135–160. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035521 PMID: 29856935
9. Maclean AM, Bravo A, Harrison MJ. Plant signaling and metabolic pathways enabling arbuscular mycorrhizal symbiosis. Plant Cell American Society of Plant Biologists; 2017 pp. 2319–2335. https://doi.org/10.1105/tpc.17.00555 PMID: 28855333
10. Bécard G, Kosuta S, Tamasloukht M, Séjalon-Delmas N, Roux C. Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. Canadian Journal of Botany. 2004. pp. 1186–1197. https://doi.org/10.1139/B04-087
11. Nagahashi G, Douds DD. The effects of hydroxy fatty acids on the hyphal branching of germinated spores of AM fungi. Fungal Biol. 2011; 115: 351–358. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.01.006 PMID: 21530917
12. Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. Nature. 2005; 435: 824–827. https://doi.org/10.1038/nature03608 PMID: 15944706
13. Besserer A, Bécard G, Jauneau A, Roux C, Séjalon-Delmas N. GR24, a Synthetic Analog of Strigolactones, Stimulates the Mitosis and Growth of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus Gigaspora rosea by Boosting Its Energy Metabolism. Plant Physiol. 2008; 148: 402–413. https://doi.org/10.1104/pp.108.121400 PMID: 18614712
14. Besserer A, Puech-Pagès V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, Roy S, et al. Strigolactones Stimulate Arbuscular Mycorrhizal Fungi by Activating Mitochondria. PLoS Biol. 2006; 4: e226. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040226 PMID: 16787107
15. Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pagès V, Dun EA, Pillot J-P, et al. Strigolactone inhibition of shoot branching. Nature. 2008; 455: 189–194. https://doi.org/10.1038/nature07271 PMID: 18690209
16. Maillet F, Poinsot V, André O, Puech-Pagés V, Haouy A, Gueunier M, et al. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. Nature. 2011; 469: 58–64. https://doi.org/10.1038/nature09622 PMID: 21209659

17. Genre A, Chabaud M, Balzergue C, Puech-Pagès V, Novero M, Rey T, et al. Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca2+ spiking in Medicago truncatula roots and their production is enhanced by strigolactone. New Phytol. 2013; 198: 190–202. https://doi.org/10.1111/nph.12146 PMID: 23384011

18. Volpe V, Carotenuto G, Berzero C, Cagnina L, Puech-Pagès V, Genre A. Short chain chito-oligosaccharides promote arbuscular mycorrhizal colonization in Medicago truncatula. Carbohydr Polym. 2020; 229: 115505. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115505 PMID: 31826410

19. Nadal M, Sawers R, Naseem S, Bassin B, Kulicke C, Sharman A, et al. An N-acetylglucosamine transporter required for arbuscular mycorrhizal symbioses in rice and maize. Nat Plants. 2017; 3. https://doi.org/10.1038/nplants.2017.73 PMID: 28548655

20. Gutjahr C, Gobbato E, Choi J, Riemann M, Johnston MG, Summers W, et al. Rice perception of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi requires the karrikin receptor complex. Science. 2015; 350: 1521–1524. https://doi.org/10.1126/science.aac9715 PMID: 26680197

21. Choi J, Lee T, Cho J, Servante EK, Pucker B, Summers W, et al. The negative regulator SMAX1 controls mycorrhizal symbiosis and strigolactone biosynthesis in rice. Nat Commun. 2020; 11: 2114. https://doi.org/10.1038/s41467-020-16021-1 PMID: 32355217

22. Sun X guang, Bonfante P, Tang M. Effect of volatiles versus exudates released by germinating spores of Gigaspora margarita on lateral root formation. Plant Physiol Biochem. 2015; 97: 1–10. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.09.010 PMID: 26397199

23. Lanfranco L, Fiorilli V, Gutjahr C. Partner communication and role of nutrients in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. New Phytologist. 2018. pp. 1031–1046. https://doi.org/10.1111/nph.15230 PMID: 29806959

24. Liao D, Wang S, Cui M, Liu J, Chen A, Xu G. Phytohormones regulate the development of arbuscular mycorrhizal symbiosis. International Journal of Molecular Sciences. 2018. p. 3146. https://doi.org/10.3390/ijms19103146 PMID: 30322086

25. Gutjahr C. Phytohormone signaling in arbuscular mycorhiza development. Current Opinion in Plant Biology. 2014. pp. 26–34. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.04.003 PMID: 24853646

26. Etemadi M, Gutjahr C, Couzigou JM, Zouine M, Lauressergues D, Timmers A, et al. Auxin perception is required for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis. Plant Physiol. 2014; 166: 281–292. https://doi.org/10.1104/pp.114.246595 PMID: 25096975

27. Martín-Rodríguez JÁ, León-Morcillo R, Vierheilig H, Ocampo JA, Ludwig-Müller J, García-Garrido JM. Ethylene-dependent/ethylene-independent ABA regulation of tomato plants colonized by arbuscular mycorrhiza fungi. New Phytol. 2011; 190: 193–205. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03610.x PMID: 21232061

28. Bitterlich M, Krügel U, Boldt-Burisch K, Franken P, Kühn C. The sucrose transporter SlSUT2 from tomato interacts with brassinosteroid functioning and affects arbuscular mycorrhiza formation. Plant J. 2014; 78: 877–889. https://doi.org/10.1111/tpj.12515 PMID: 24654931

29. Foo E, Ross JJ, Jones WT, Reid JB. Plant hormones in arbuscular mycorrhizal symbioses: An emerging role for gibberellins. Ann Bot. 2013; 111: 769–779. https://doi.org/10.1093/aob/mct041 PMID: 23508650

30. Torres de Los Santos R, Vierheilig H, Ocampo JA, García Garrido JM. Altered pattern of arbuscular mycorrhizal formation in tomato ethylene mutants. Plant Signal Behav. 2011; 6: 755–758. https://doi.org/10.4161/psb.6.5.15415 PMID: 21543888

31. Herrera Medina MJ, Gagnon H, Piché Y, Ocampo JA, García Garrido JM, Vierheilig H. Root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi is affected by the salicylic acid content of the plant. Plant Sci. 2003; 164: 993–998. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00083-9

32. Boivin S, Fonouni-Farde C, Frugier F. How auxin and cytokinin phytohormones modulate root microbe interactions. Frontiers in Plant Science. 2016. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01240 PMID: 27588025

33. Landgraf R, Schaarschmidt S, Hause B. Repeated leaf wounding alters the colonization of Medicago truncatula roots by beneficial and pathogenic microorganisms. Plant Cell Environ. 2012; 35: 1344–1357. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02495.x PMID: 22329418

34. 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. J Plant Physiol. 2002; 159: 517–523. https://doi.org/10.1078/0176-1617-00731

35. Khatabi B, Schäfer P. Ethylene in mutualistic symbioses. Plant Signal Behav. 2012; 7: 1634–1638. https://doi.org/10.4161/psb.22471 PMID: 23072986

36. Ishii T, Shrestha YH, Matsumoto I, Kadoya K. Effect of ethylene on the growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and on the mycorrhizal formation of trifoliate orange roots. J Japanese Soc Hortic Sci. 1996; 65: 525–529. https://doi.org/10.2503/jjshs.65.525

37. Chanclud E, Morel J-B. Plant hormones: a fungal point of view. Mol Plant Pathol. 2016; 17: 1289–1297. https://doi.org/10.1111/mpp.12393 PMID: 26950404

38. Ferguson BJ, Mathesius U. Phytohormone Regulation of Legume-Rhizobia Interactions. Journal of Chemical Ecology. 2014. pp. 770–790. https://doi.org/10.1007/s10886-014-0472-7 PMID: 25052910

39. Spaepen S, Bossuyt S, Engelen K, Marchal K, Vanderleyden J. Phenotypical and molecular responses of Arabidopsis thaliana roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium Azospirillum brasilense. New Phytol. 2014; 201: 850–861. https://doi.org/10.1111/nph.12590 PMID: 24219779

40. Gay G, Normand L, Marmeisse R, Sotta B, Debaud JC. Auxin overproducer mutants of Hebeloma cylindrosporum Romagnesi have increased mycorrhizal activity. New Phytol. 1994; 128: 645–657. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb04029.x

41. Raudaskoski M, Kothe E. Novel findings on the role of signal exchange in arbuscular and ectomycorrhizal symbioses. Mycorrhiza. 2015. pp. 243–252. https://doi.org/10.1007/s00572-014-0607-2 PMID: 25260351

42. Chou TW, Yang SF. The biogenesis of ethylene in Penicillium digitatum. Arch Biochem Biophys. 1973; 157: 73–82. https://doi.org/10.1016/0003-9861(73)90391-3 PMID: 4716963

43. Graham JH, Linderman RG. Ethylene production by ectomycorrhizal fungi, Fusarium oxysporum f.sp. pini, and by aseptically synthesized ectomycorrhizae and Fusarium-infected Douglas-fir roots. Can J Microbiol. 1980; 26: 1340–1347. https://doi.org/10.1139/m80-222 PMID: 7214223

44. Chagué V, Elad Y, Barakat R, Tudzynski P, Sharon A. Ethylene biosynthesis in Botrytis cinerea. FEMS Microbiol Ecol. 2002; 40: 143–149. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00946.x PMID: 19709221

45. Splivallo R, Fischer U, Göbel C, Feussner I, Karlovsky P. Truffles regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene. Plant Physiol. 2009; 150: 2018–2029. https://doi.org/10.1104/pp.109.141325 PMID: 19535471

46. Ogawa T, Takahashi M, Fujii T, Tazaki M, Fukuda H. The Role of NADH:Fe(III)EDTA Oxidoreductase in Ethylene Formation from 2-Keto-4-Methylthiobutyrate. J Ferment Bioeng. 1990; 69: 287–291. https://doi.org/10.1016/0922-338X(90)90107-8

47. Yang SF, Ku HS, Pratt HK. Photochemical production of ethylene from methionine and its analogues in the presence of flavin mononucleotide. J Biol Chem. 1967; 242: 5274–5280. PMID: 6065098

48. Billington DC, Golding BT, Pr1mroset SB, Primrose SB. Biosynthesis of ethylene from methionine. Isolation of the putative intermediate 4-methylthio-2-oxobutanoate from culture fluids of bacteria and fungi. Biochem J. 1979; 182: 827–836. https://doi.org/10.1042/bj1820827 PMID: 42392

49. Hottiger T, Boller T. Ethylene biosynthesis in Fusarium oxysporum f. sp. tulipae proceeds from glutamate/2-oxoglutarate and requires oxygen and ferrous ions in vivo. Arch Microbiol. 1991; 157: 18–22. https://doi.org/10.1007/BF00245329

50. Esch H, Hundeshagen B, Schneider-Poetsch H, Bothe H. Demonstration of abscisic acid in spores and hyphae of the arbuscular-mycorrhizal fungus Glomus and in the N2-fixing cyanobacterium Anabaena variabilis. Plant Sci. 1994; 99: 9–16. https://doi.org/10.1016/0168-9452(94)90115-5

51. Barea JM, Azcón-Aguilar C. Production of plant growth-regulating substances by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. Appl Environ Microbiol. 1982; 43: 810–3. https://doi.org/10.1128/AEM.43.4.810-813.1982 PMID: 16345991

52. Ludwig-Müller J, Kaldorf M, Sutter EG, Epstein E. Indole-3-butyric acid (IBA) is enhanced in young maize (Zea mays L.) roots colonized with the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices. Plant Sci. 1997; 125: 153–162. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(97)00064-2

53. Kojima M, Kamada-Nobusada T, Komatsu H, Takei K, Kuroha T, Mizutani M, et al. Highly sensitive and high-throughput analysis of plant hormones using ms-probe modification and liquid chromatographytandem mass spectrometry: An application for hormone profiling in oryza sativa. Plant Cell Physiol. 2009; 50: 1201–1214. https://doi.org/10.1093/pcp/pcp057 PMID: 19369275

54. Hoyerova K, Gaudinova A, Malbeck J, Dobrev PI, Kocabek T, Solcova B, et al. Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. Phytochemistry. 2006; 67: 1151–1159. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.03.010 PMID: 16678229

55. Vidova V, Spacil Z. A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: Targeted and data independent acquisition. 2017. https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.059 PMID: 28351641

56. Makarov A, Scigelova M. Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. J Chromatogr A. 2010; 1217: 3938–3945. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.022 PMID: 20299023

57. Chen Y, Althiab Almasaud R, Carrie E, Desbrosses G, Binder BM, Chervin C. Ethanol, at physiological concentrations, affects ethylene sensing in tomato germinating seeds and seedlings. Plant Sci. 2020; 291: 110368. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110368 PMID: 31928675

58. R core team. R: A language and environment for statistical computing. R Found Stat Comput Vienna, Austria. 2020. Available: http://www.r-project.org/

59. de Mendiburu F. agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. 2020. Available: https://myaseen208.github.io/agricolae/

60. Wickham H. ggplot2—Elegant Graphics for Data Analysis. Springer. Springer International Publishing; 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4

61. Fang N, Yu S, Ronis MJJ, Badger TM. Matrix effects break the LC behavior rule for analytes in LC-MS/MS analysis of biological samples. Exp Biol Med. 2015; 240: 488–497. https://doi.org/10.1177/1535370214554545 PMID: 25304311

62. Jacobsen J V, Mcglasson WB, Selby HB. Ethylene Production by Autoclaved Rubber Injection Caps Used in Biological Systems. Plant Physiol. 1970.

63. Primrose SB. Evaluation of the Role of Methional, 2-Keto-4-methylthiobutyric Acid and Peroxidase in Ethylene Formation by Escherichia coli. J Gen Microbiol. 1977; 98: 519–528. https://doi.org/10.1099/00221287-98-2-519

64. Yang SF. Biosynthesis of ethylene. Ethylene formation from methional by horseradish peroxidase. Arch Biochem Biophys. 1967; 122: 481–487. https://doi.org/10.1016/0003-9861(67)90222-6 PMID: 6066254

65. Booker MA, DeLong A. Producing the ethylene signal: Regulation and diversification of ethylene biosynthetic enzymes. Plant Physiol. 2015; 169: 42–50. https://doi.org/10.1104/pp.15.00672 PMID: 26134162

66. Houben M, Van de Poel B. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACO): The enzyme that makes the plant hormone ethylene. Frontiers in Plant Science. 2019. p. 695. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00695 PMID: 31191592

67. Mukherjee A, Ané J-MM. Germinating Spore Exudates from Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Molecular and Developmental Responses in Plants and Their Regulation by Ethylene. Mol Plant-Microbe Interact MPMI. 2011; 24: 260–270. https://doi.org/10.1094/MPMI-06-10-0146 PMID: 21043574

68. Giovannetti M, Mari A, Novero M, Bonfante P. Early Lotus japonicus root transcriptomic responses to symbiotic and pathogenic fungal exudates. Front Plant Sci. 2015; 6: 480. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00480 PMID: 26175746

69. Chabaud M, Genre A, Sieberer BJ, Faccio A, Fournier J, Novero M, et al. Arbuscular mycorrhizal hyphopodia and germinated spore exudates trigger Ca2+ spiking in the legume and nonlegume root epidermis. New Phytol. 2011; 189: 347–355. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03464.x PMID: 20880223

70. Morrison EN, Knowles S, Hayward A, Greg Thorn R, Saville BJ, Emery RJN. Detection of phytohormones in temperate forest fungi predicts consistent abscisic acid production and a common pathway for cytokinin biosynthesis. Mycologia. 2015; 107: 245–257. https://doi.org/10.3852/14-157 PMID: 25572099

71. Šimura J, Antoniadi I, Široká J, Tarkowská D, Strnad M, Ljung K, et al. Plant Hormonomics: Multiple Phytohormone Profiling by Targeted Metabolomics. Plant Physiol. 2018; 177: 476–489. https://doi.org/10.1104/pp.18.00293 PMID: 29703867

72. Barker SJ, Tagu D. The Roles of Auxins and Cytokinins in Mycorrhizal Symbioses. J Plant Growth Regul. 2000; 19: 144–154. https://doi.org/10.1007/s003440000021 PMID: 11038224

73. Wulff EG, Sørensen JL, Lübeck M, Nielsen KF, Thrane U, Torp J. *Fusarium* spp. associated with rice Bakanae: ecology, genetic diversity, pathogenicity and toxigenicity. Environ Microbiol. 2010; 12: 649–657. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02105.x PMID: 20002135

74. Sugiura Y, Akiyama R, Tanaka S, Yano K, Kameoka H, Kawaguchi M, et al. Myristate as a carbon and energy source for the asymbiotic growth of the arbuscular mycorrhizal fungus Rhizophagus irregularis. Proc Natl Acad Sci. 2020; 202006948. https://doi.org/10.1073/pnas.2006948117 PMID: 32999061

75. Dunwell JM, Purvis A, Khuri S. Cupins: The most functionally diverse protein superfamily? Phytochemistry. 2004; 65: 7–17. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.08.016 PMID: 14697267

76. Le Marquer M, Bécard G, Frei dit Frey N. Arbuscular mycorrhizal fungi possess a CLAVATA3/embryo surrounding region-related gene that positively regulates symbiosis. New Phytol. 2019; 222: 1030–1042. https://doi.org/10.1111/nph.15643 PMID: 30554405

77. Jentschel K, Thiel D, Rehn F, Ludwig-Müller J. Arbuscular mycorrhiza enhances auxin levels and alters auxin biosynthesis in Tropaeolum majus during early stages of colonization. Physiol Plant. 2006; 129: 320–333. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00812.x

78. Meixner C, Ludwig-Müller J, Miersch O, Gresshoff P, Staehelin C, Vierheilig H. Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supernodulating soybean mutant nts1007. Planta. 2005; 222: 709–715. https://doi.org/10.1007/s00425-005-0003-4 PMID: 16025340

79. Foo E. Something old, something new: Auxin and strigolactone interact in the ancient mycorrhizal symbiosis. Plant Signal Behav. 2013; 8. https://doi.org/10.4161/psb.23656 PMID: 23333973

80. Buendia L, Maillet F, O'Connor D, van de-Kerkhove Q, Danoun S, Gough C, et al. Lipo-chitooligosaccharides promote lateral root formation and modify auxin homeostasis in Brachypodium distachyon. New Phytol. 2019; 221: 2190–2202. https://doi.org/10.1111/nph.15551 PMID: 30347445

81. Zsögön A, Lambais MR, Benedito VA, Figueira AVDO, Peres LEP. Reduced arbuscular mycorrhizal colonization in tomato ethylene mutants. Sci Agric. 2008; 65: 259–267. https://doi.org/10.1590/S0103-90162008000300006

82. Fracetto GGM, Peres LEP, Mehdy MC, Lambais MR. Tomato ethylene mutants exhibit differences in arbuscular mycorrhiza development and levels of plant defense-related transcripts. Symbiosis. 2013; 60: 155–167. https://doi.org/10.1007/s13199-013-0251-1

83. Hérivaux A, Dugé de Bernonville T, Roux C, Clastre M, Courdavault V, Gastebois A, et al. The Identification of Phytohormone Receptor Homologs in Early Diverging Fungi Suggests a Role for Plant Sensing in Land Colonization by Fungi. Taylor JW, editor. MBio. 2017; 8: e01739–16. https://doi.org/10.1128/mBio.01739-16 PMID: 28143977

84. Liu X, Feng Z, Zhu H, Yao Q. Exogenous abscisic acid and root volatiles increase sporulation of Rhizophagus irregularis DAOM 197198 in asymbiotic and pre-symbiotic status. Mycorrhiza. 2019; 29: 581–589. https://doi.org/10.1007/s00572-019-00916-z PMID: 31617006

85. Nagata M, Yamamoto N, Miyamoto T, Shimomura A, Arima S, Hirsch AM, et al. Enhanced hyphal growth of arbuscular mycorrhizae by root exudates derived from high R/FR treated Lotus japonicus. Plant Signal Behav. 2016; 11: e1187356. https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1187356 PMID: 27191935

86. van Dam NM, Bouwmeester HJ. Metabolomics in the Rhizosphere: Tapping into Belowground Chemical Communication. Trends in Plant Science. 2016. pp. 256–265. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.008 PMID: 26832948

87. Kong CH, Zhang SZ, Li YH, Xia ZC, Yang XF, Meiners SJ, et al. Plant neighbor detection and allelochemical response are driven by root-secreted signaling chemicals. Nat Commun. 2018; 9: 3867. https://doi.org/10.1038/s41467-018-06429-1 PMID: 30250243

88. Kirwa HK, Murungi LK, Beck JJ, Torto B. Elicitation of Differential Responses in the Root-Knot Nematode Meloidogyne incognita to Tomato Root Exudate Cytokinin, Flavonoids, and Alkaloids. J Agric Food Chem. 2018; 66: 11291–11300. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05101 PMID: 30346752

89. Vives-Peris V, Gómez-Cadenas A, Pérez-Clemente RM. Citrus plants exude proline and phytohormones under abiotic stress conditions. Plant Cell Rep. 2017; 36: 1971–1984. https://doi.org/10.1007/s00299-017-2214-0 PMID: 29038909

90. Wang FF, Cheng ST, Wu Y, Ren BZ, Qian W. A Bacterial Receptor PcrK Senses the Plant Hormone Cytokinin to Promote Adaptation to Oxidative Stress. Cell Rep. 2017; 21: 2940–2951. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.017 PMID: 29212037

91. Galland L. The gut microbiome and the brain. Journal of Medicinal Food. Mary Ann Liebert Inc.; 2014. pp. 1261–1272. https://doi.org/10.1089/jmf.2014.7000 PMID: 25402818

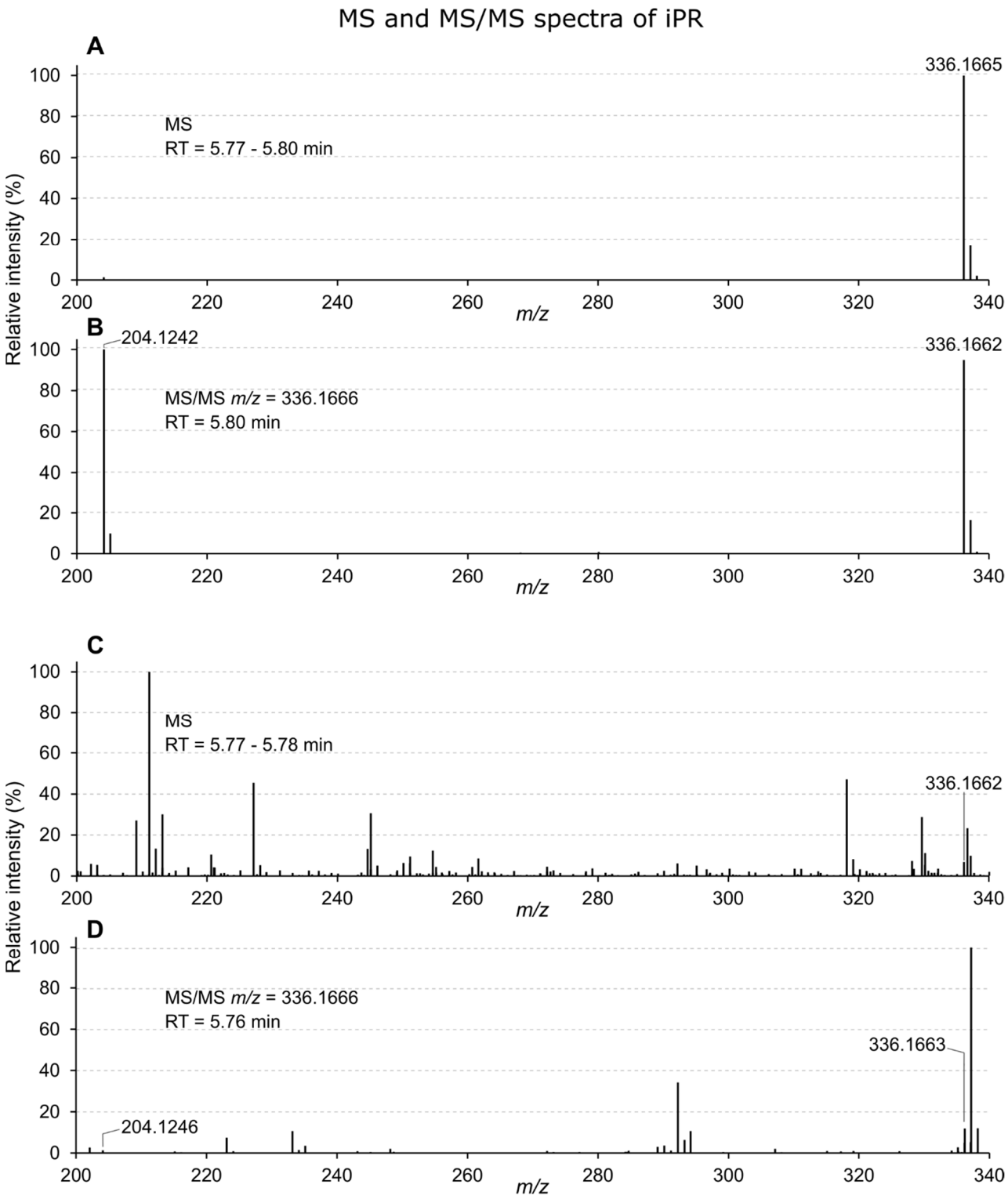
92. Karavolos MH, Winzer K, Williams P, Khan CMA. Pathogen espionage: Multiple bacterial adrenergic sensors eavesdrop on host communication systems. Molecular Microbiology. 2013. pp. 455–465. https://doi.org/10.1111/mmi.12110 PMID: 23231070

93. Urbanová T, Tarkowská D, Novák O, Hedden P, Strnad M. Analysis of gibberellins as free acids by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Talanta. 2013; 112: 85–94. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.068 PMID: 23708542

#	Family	Molecule name	Abbreviation	Atomic formula	Retention time (min)	Scan mode (ESI)	MRM precursor ion	MRM product ion 1	MRM product ion 2	Limit of detection (M)
1	Abscisic acids	Abscisic acid	ABA	C15H20O4	5.8	-	263	153	219	7E-10
2		Abscisic acid glucose ester	ABA-GE	C21H30O9	5	-	425	153	263	2E-08
3	Auxins	Indole-3-acetic acid	IAA	C10H9NO2	5.3	+	176	130	77	3E-09
4		Indole-3-propionic acid	IPA	C11H11NO2	5.8	+	189	130	77	7E-10
5		Indole-3-butyric acid	IBA	C12H13NO2	6.1	+	204	186	130	7E-10
6		IAA-alanine	IAA-Ala	C13H14N2O3	5.1	+	247	130	77	1E-10
7		IAA-aspartate	IAA-Asp	C14H14N2O5	4.6	+	291	130	77	1E-10
8		Naphtalenic acetic acid	NAA	C12H10O2	6.3	+	187	141	115	1E+08
9	Gibberellins	Gibberellin A_1	GA_1	C19H24O6	5.5	-	347	185	145	5E-08
10		Gibberellin A_3	GA_3	C19H22O6	4.9	-	345	143	239	7E-10
11		Gibberellin A_4	GA_4	C19H24O5	6.5	-	331	213	257	1E-11
12		Gibberellin A_7	GA_7	C19H22O5	x	-	329	211	223	x
13	Salicylates	Methyl-salicylate	MeSA	C8H8O3	x	+	153	97	107	x
14	Jasmonates	Jasmonic acid	JA	C12H18O3	6.2	-	209	59	165	7E-10
15		Methyl-jasmonate	MeJA	C13H20O3	x	+	225	81	91	x
16		JA-isoleucine	JA-Ile	C18H29NO4	x	+	323	209	59	x
17	Cytokinins	Benzyladenine	BAP	C12H11N5	4.6	-	224	133	132	7E-10
18		Benzyladenosine	BAPR	C17H19N5O4	x	+	358	226	91	x
19		Benzyladenine glucoside	BAPG	C18H21N5O5	x	+	388	226	91	x
20		*cis*-zeatin	*c*Z	C10H13N5O	2.8	+	220	136	119	1E-09
21		*trans*-zeatin	*t*Z	C10H13N5O	2.2	+	220	136	119	1E-09
22		*cis*-zeatin riboside	*c*ZR	C15H21N5O5	4.2	+	352	220	136	1E-10
23		*trans*-zeatin riboside	*t*ZR	C15H21N5O5	3.9	+	352	220	136	1E-10
24		Zeatin glucoside	ZG	C16H23N5O6	x	+	382	136	220	x
25		Dihydrozeatin	DHZ	C10H15N5O	2.1	+	222	136	148	7E-10
26		Dihydrozeatin riboside	DHZR	C15H23N5O5	x	+	354	222	136	x
27		Dihydrozeatin glucoside	DHZG	C16H25N5O6	x	+	384	222	136	x
28		Isopentenyladenine	iP	C10H13N5	4.4	+	204	136	119	1E-10
29		Isopentenyladenosine	iPR	C15H21N5O4	4.9	+	336	204	136	1E-10
30		Isopentenyladenine-9-glucoside	iP9G	C16H23N5O5	4.4	+	366	136	204	1E-11
31		Kinetin	K	C10H9N5O	3.8	-	214	133	134	6E-09
32		Kinetin riboside	KR	C15H17N5O5	x	+	348	216	81	x
33		Kinetin glucoside	KG	C16H19N5O6	x	+	378	216	81	x
34		*meta*-Topoline	*m*T	C12H11N5O	3.9	+	242	107	77	1E-10
35		Topoline riboside	TR	C17H19N5O5	x	+	374	242	107	x
36		Topoline glucoside	TG	C18H21N5O7	x	+	404	242	107	x
37	Strigolactones	Strigol	Strigol	C19H22O6	6.8	+	347	329	97	6E-09
38	Brassinosteroids	Brassinolide	BL	C28H48O6	7.1	+	481	81	91	5E-08
39	Other	α-keto-γ-methylthio butyric acid	KMBA	C5H7O3S	3.7	-	147	47	99	x

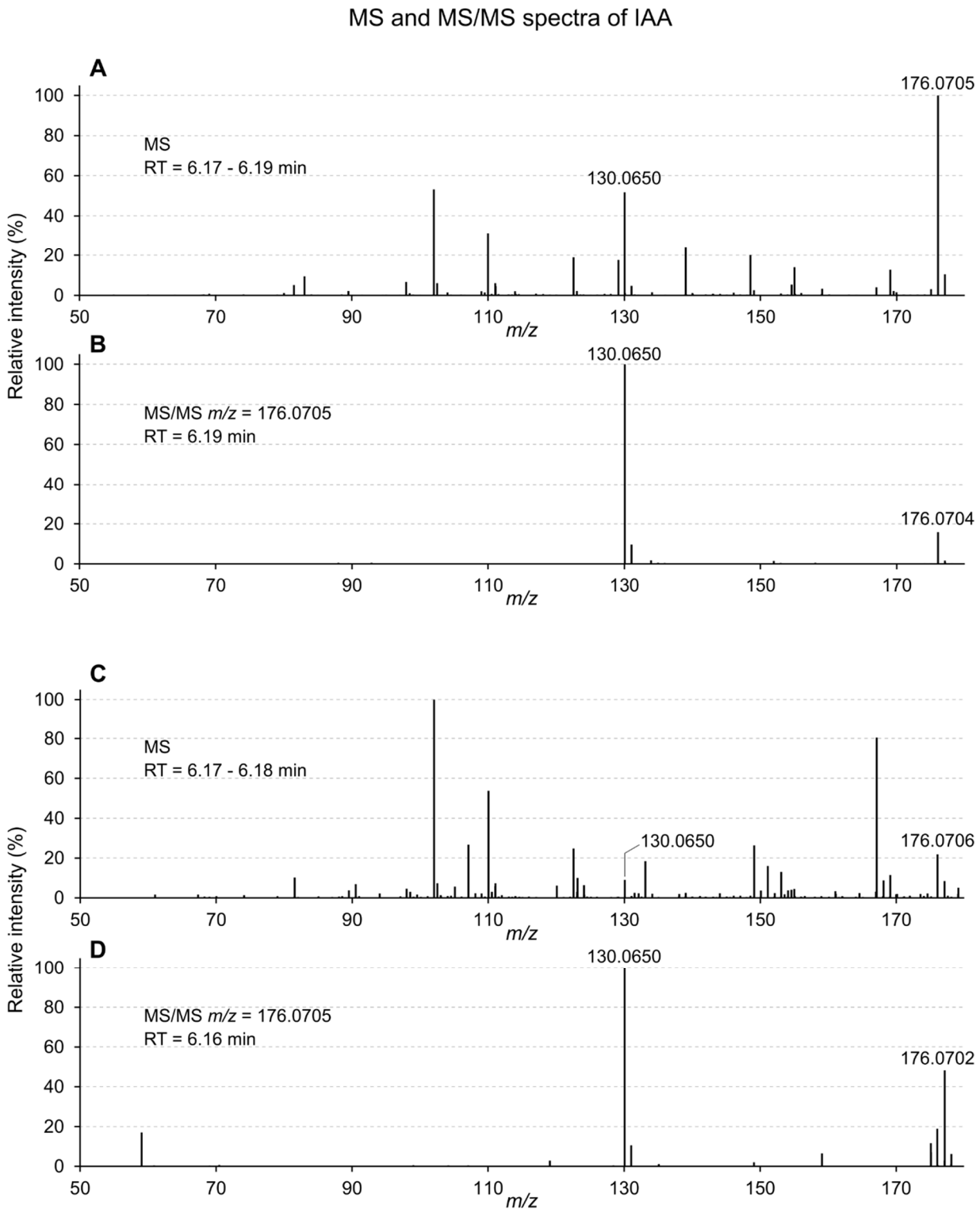
Article S1 Table. List of molecules analyzed by LC-MS in highly sensitive MRM mode

The hormone family, molecule name, abbreviation, formula, retention time, preferential detection mode, precursor and product ions for MRM analysis and limit of detection are indicated. Grey lines correspond to theoretical fragmentation values when standards were not available (Urbanová *et al.*, 2013; Šimura *et al.*, 2018).



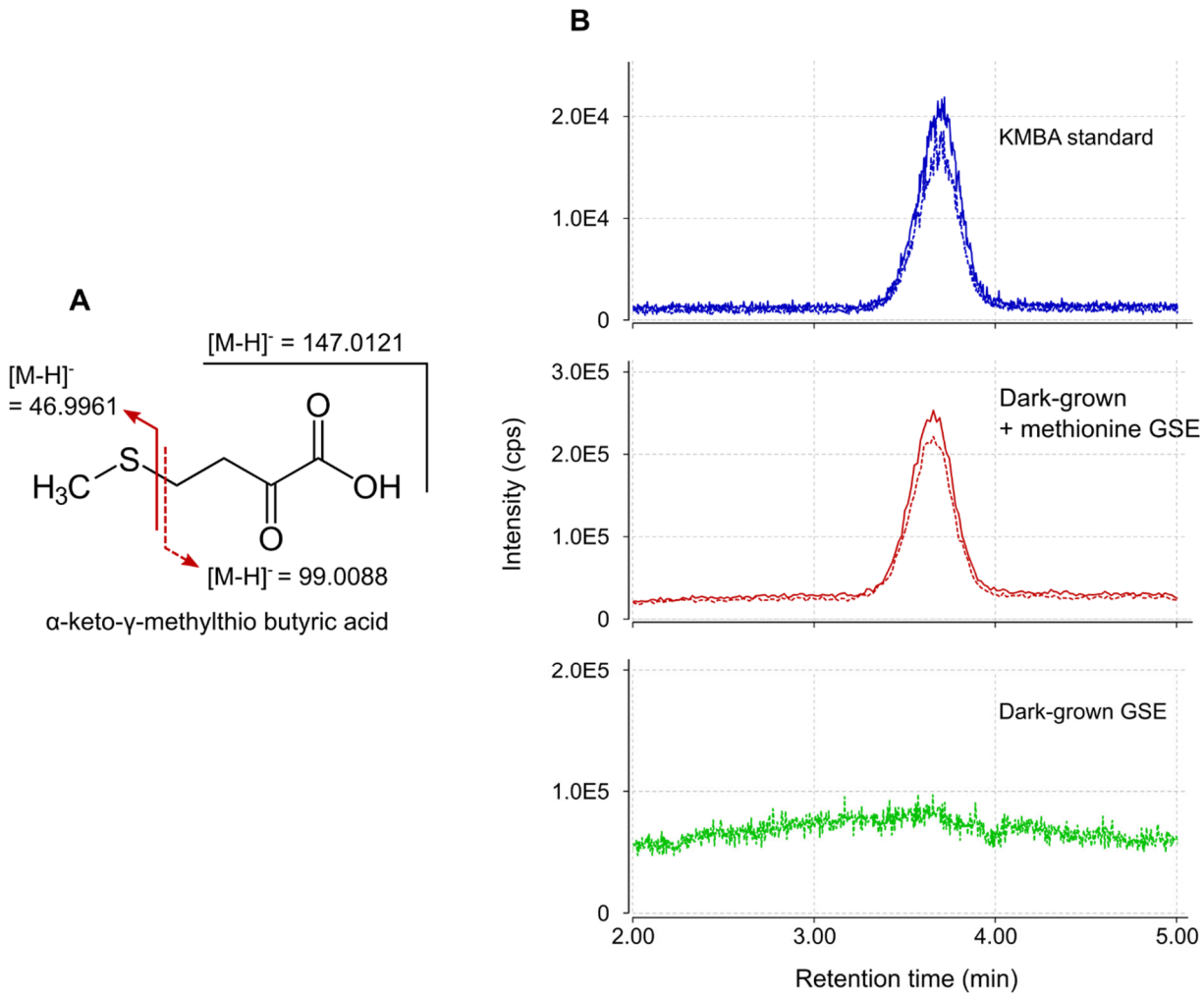
Article S1 Fig. High resolution mass spectra (HRMS) of iPR in positive mode

(A) and **(B)** HRMS spectra of iPR standard (300 nM), at 5.78 min. **(C)** and **(D)** HRMS spectra of 250,000 *R. irregularis* GSE at 5.78 min. **(A)** and **(C)**, MS spectra. **(B)** and **(D)** MS/MS (m/z 336.1666 +/- 0.5 Da) spectra.



Article S2 Fig. High resolution mass spectra (HRMS) of IAA in positive mode

(A) and **(B)** HRMS spectra of IAA standard (300 nM) at 6.19 min. **(C)** and **(D)** HRMS spectra of 250,000 *R. irregularis* GSE, at 6.19 min. **(A)** and **(C)** MS spectra. **(B)** and **(D)** MS/MS (m/z 176.0705 +/- 0.5Da) spectra.



S3 Fig. KMBA detection in multiple reaction monitoring (MRM) mode

(A) Structure and fragmentation pattern of KBMA. **(B)** UPLC-MRM-MS chromatogram of KMBA in negative mode. Top (blue lines): External standard (500 nM) of KMBA. Middle (red lines): GSE produced by 20,000 spores treated with 10 mM methionine. Bottom (green lines): GSE produced by 20,000 untreated spores. Plain lines are for m/z transition 147 > 47. Dashed lines are for m/z transition 147 > 99. Signal intensity is displayed in counts per second (cps).

Discussion et perspectives

1 - Stratégie de purification

Les phytohormones sont, par définition, des molécules agissant en faible concentration dans les plantes. Nous nous attendons donc également à les retrouver à de faibles concentrations chez *Rhizophagus irregularis*. Chez certains champignons ectomycorhiziens, la production totale de CKs est comprise entre 50 et 150 pmol.g^{-1} de poids frais, dont 5 à 10 pmol.g^{-1} d'iPR (Morrison *et al.*, 2015*b*). *T. brochii* et *melanosporum* produisent respectivement 130 et 50 nM d'IAA en 10 jours de culture sur milieu solide (Splivallo *et al.*, 2009). *Magnaporthe grisea* peut produire entre 16 et 195 pmol.g^{-1} de poids frais d'ABA en fonction de la souche et de la structure fongique considérée (Jiang *et al.*, 2010). Il est donc important de purifier et d'enrichir les échantillons en hormones afin de dépasser la limite de détection par spectrométrie de masse de ces métabolites, tout en diminuant idéalement la concentration de toutes les autres molécules, souvent responsables de la réduction de la sensibilité de l'analyse, par compétition lors de l'ionisation. Nos deux matrices, les spores de CMA broyées et leurs exsudats, sont très différentes l'une de l'autre et ont été traitées différemment pour analyser leur profil hormonal.

1.1 - Les Exsudats de spores germées

Les GSE, contiennent un ensemble de molécules, sécrétées et non dégradées par les spores de *R. irregularis* pendant leur période de germination. Le ratio spores/volume le plus favorable a été déterminé dans des analyses précédentes dans l'équipe (Thèse de Coline Balzergue, 2012). Le volume est relativement important et nécessitera une étape de forte concentration, par lyophilisation, pour multiplier la concentration en hormones par 250. Les exsudats de spores peuvent être obtenus dans de l'eau, ou, pour favoriser la germination, dans du milieu M. Toutefois, les micro et macro éléments, présents dans le milieu M (Bécard and Fortin, 1988), en proportion relativement élevée après concentration des échantillons, induisent une compétition d'ionisation en spectrométrie de masse, réduisant drastiquement l'intensité du signal. Il serait alors indispensable de procéder à des étapes de dialyses pour éliminer les sels avant l'analyse. Les spores de *R.*

irregularis étant capables de germer dans de l'eau, c'est cette condition qui a été retenue. De plus, nous posons l'hypothèse que la quantité de métabolites exsudée durant les 7 jours de germination est assez faible, du coup nous avons décidé de ne pas réaliser d'étape de purification après la lyophilisation. Les GSE peuvent être analysés de manière ciblée, par exemple pour identifier les hormones présentes, ou pour identifier des petits peptides, de séquences connues, sécrétés par *R. irregularis* (Le Marquer *et al*, in prep), mais aussi de manière globale, afin d'identifier toutes les molécules présentes dans ces GSE.

1.2 - Les spores germées

Les spores germées constituent une matrice bien plus complexe que les GSE. La paroi extérieure des spores, très rigide, est principalement constituée de chitine (Frey *et al.*, 1994; Bowman and Free, 2006), les rendant extrêmement résistantes aux extractions de métabolite directement par des solvants organiques. De plus, les spores sont un organe de réserve important pour ces champignons, qui y accumulent des lipides en grande quantité (Beilby and Kidby, 1980; Olsson and Johansen, 2000). Il est donc nécessaire de réaliser un broyage efficace, suivi d'une extraction, ainsi qu'une purification des phytohormones, pour en permettre l'analyse.

Afin de permettre l'analyse simultanée du plus grand nombre, plusieurs protocoles d'extraction globale ont été développés ces dernières années. Le protocole d'extraction en phase solide (SPE), utilisé par la plateforme MétaToul AgromiX et adapté de (Kojima *et al.*, 2009), permet une extraction simultanée des auxines (IAAs), cytokinines (CKs), acide abscissique (ABA), gibbérellines (GAs), salicylates (SAs) et jasmonates (JAs) (Figure 10). Il se base sur une double extraction par SPE pour éliminer dans un premier temps les contaminants majeurs retrouvés dans les matrices végétale et fongique, puis permet la séparation de l'échantillon en trois fractions en fonction de la charge et de la polarité des molécules. Ce protocole présente toutefois des limitations. En plus d'être relativement coûteux, l'utilisation successive des deux étapes de SPE implique deux étapes de séchages et reprises successives, allongeant considérablement le temps nécessaire pour réaliser l'extraction, augmentant ainsi le risque de dégradation des hormones. De plus, l'échantillon est fractionné en trois élutions finales, impliquant trois injections successives en spectrométrie de masse pour être analysé dans son entièreté. Des protocoles plus

récents (Šimura *et al.*, 2018) proposent par exemple d'éliminer la deuxième étape de SPE, divisant ainsi par deux le coût, le temps consacré à la purification, et par trois le temps d'analyse, sans pour autant a priori sacrifier la sensibilité d'analyse. Il serait intéressant de tester cette simplification de protocole de purification pour les futures analyses.

Pour finir, les brassinostéroïdes et les strigolactones ne sont pas extraits ou purifiés efficacement par ce protocole global. Afin de réaliser une analyse complétement exhaustive des hormones, différents protocoles d'extraction/purifications spécifiques pourraient être utilisés en parallèle du protocole d'extraction global. Faute de temps, ils n'ont pas été réalisés durant ma thèse.

1.2.1 - Extraction et analyses des brassinostéroïdes

Les Brassinostéroïdes sont des polyhydroxystéroïdes et présentent une hydrophobicité supérieure aux autres hormones végétales. Les protocoles d'extraction globale des hormones ne sont du coup pas bien adaptés pour elles. Dans celui proposé par (Šimura *et al.*, 2018), sur la base d'une extraction puis d'une seule étape de purification SPE, la quantification des standards de brassinostéroïdes permet d'obtenir un rendement de l'ordre de 50%. Cela confirme que ces protocoles ne sont pas idéaux pour analyser les BRs présents en faible concentration dans des échantillons biologiques complexes, dont la quantité initiale est limitée.

A l'issue de l'analyse que nous avons faite, au même temps de rétention chromatographique obtenu avec le standard, un ion, de m/z correspondant au brassinolide (<5 ppm) a été observé dans des GSE produits par 250 000 spores, sans avoir été confirmé par une deuxième expérience indépendante (Figure 14). Ces résultats préliminaires peuvent laisser penser que *R. irregularis* est également capable de produire ou relâcher cette phytohormone dans le milieu de germination. Pour vérifier si le champignon produit d'autres BRs, l'acquisition de standards de BRs supplémentaires, leurs analyses par spectrométrie de masse en haute résolution, mais aussi dans le mode MRM permettraient de mener une analyse plus exhaustive de cette classe d'hormone chez les CMA.

Afin d'analyser efficacement cette famille d'hormone, il conviendrait d'appliquer un protocole d'extraction puis de purification spécifiques. Par exemple, l'utilisation de solvants d'extraction faiblement apolaires, tels que le méthanol (Bhardwaj *et al.*, 2007),

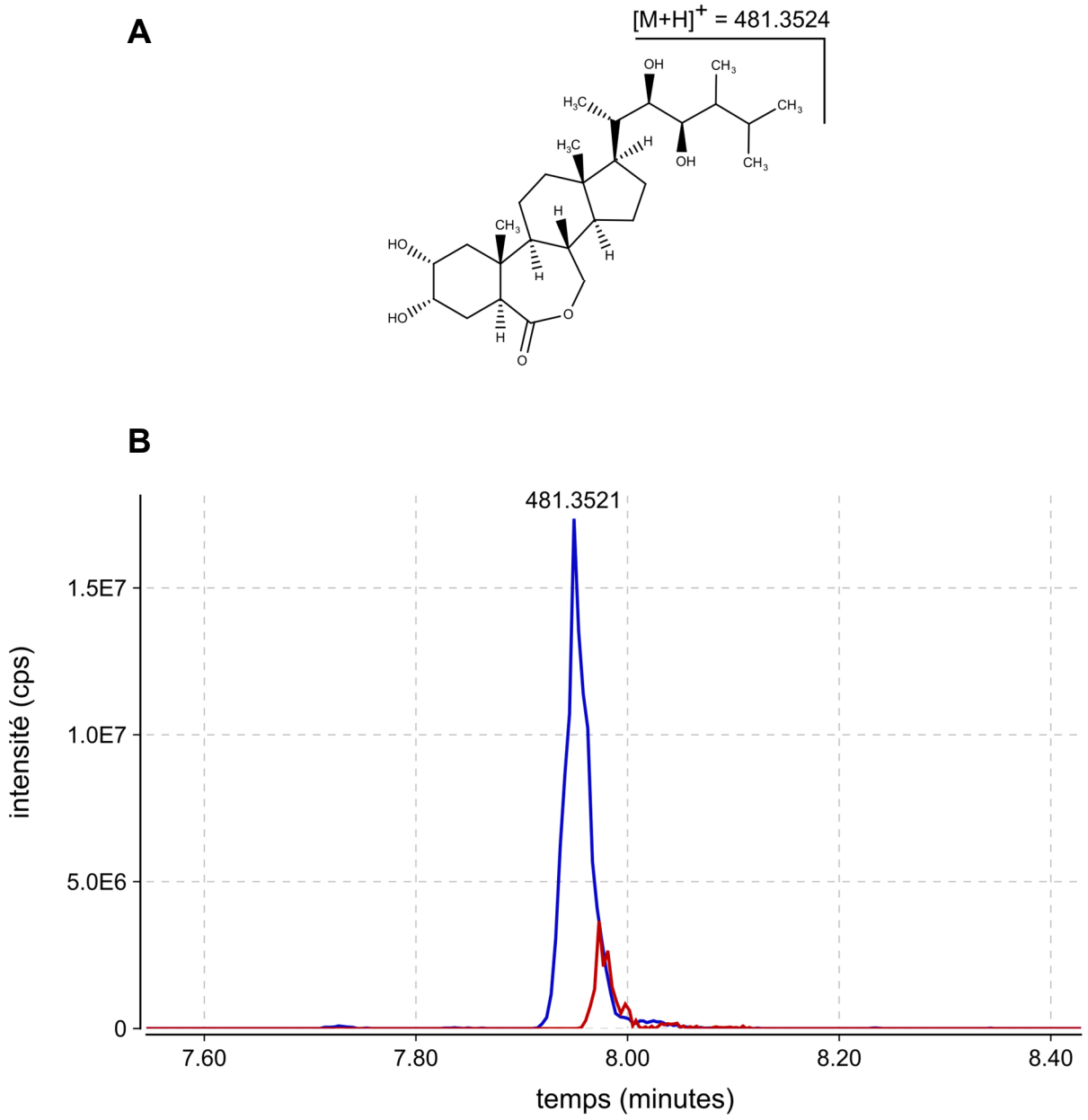


Figure 14 : Chromatogramme d'ion extrait (XIC) de l'ion parent du brassinolide obtenu par spectrométrie de masse haute résolution

(A) Structure du brassinolide. **(B)** Chromatogramme d'ion extrait de *m/z* 481,3524, correspondant au brassinolide, obtenu à partir d'un standard pur ($3x10^{-7}$ M) (en bleu), ou à partir des GSE de 250 000 spores de *R. irregularis* (rouge) obtenu en mode positif.

ou un mélange Méthanol/chloroforme (Bajguz and Piotrowska, 2009) serait à privilégier. L'acétonitrile est aussi un solvant de choix, présentant le double intérêt de posséder une apolarité adaptée aux BRs mais limitant l'extraction indésirable de pigments (Ding *et al.*, 2013). Une séparation par SPE à double couches GCB/PSE (*Graphite Carbon Black / Primary Secondary Amine silica sorbent*) permet d'éliminer une grande partie de contaminants issus de la matrice biologique (Ding *et al.*, 2013) : la phase GCB permet de retenir les molécules contenant des cycles aromatiques, tandis que la phase PSA réalise des interactions hydrophiles fortes avec les composés les plus polaires. Une élution MeOH/ACN est suffisante pour récupérer jusqu'à 85% des BRs résiduels absorbés sur la phase GCB. Une étape d'extraction liquide-liquide peut être ajoutée pour éliminer des contaminants résiduels présents dans la phase organique, et améliorer le signal obtenu par l'analyse LC-MS qui suivra.

1.2.2 - Strigolactones

Les Strigolactones sont particulièrement sensibles à l'hydrolyse en milieu aqueux (Halouzka *et al.*, 2018), ainsi qu'aux pH alcalins. Afin d'éviter leur dégradation, l'extraction des SLs du milieu aqueux est généralement réalisée à l'acétate d'éthyle (Foo and Davies, 2011; Braun *et al.*, 2012; Yoneyama *et al.*, 2012), suivie d'une purification sur SPE SEP-Pack C18, avant leurs analyses par spectrométrie de masse.

Durant ces travaux, faute de temps, nous n'avons pas cherché à extraire spécifiquement les SLs, ni à en identifier dans les échantillons fongiques. Les strigolactones pourraient être présentes majoritairement dans les spores de CMA sous des formes inactives dérivées (Rasmussen *et al.*, 2013) comme il en existe pour les autres hormones (Sakakibara, 2006). Toutefois aucune SLs de ce type n'a encore été identifiée chez les plantes. La synthèse sur mesure de standards de SLs conjugués peut être envisagée, mais la variabilité des structures et le coût de synthèse représentent une contrainte majeure. Il est donc préférable d'avoir recours à une analyse exhaustive « semi-ciblée » en adaptant l'extraction à ces formes probablement plus polaires, afin d'essayer d'identifier ces éventuelles formes de stockage.

Chez les plantes, la reconnaissance des SLs par leurs récepteurs induit l'hydrolyse de la liaison enol ether entre les cycles C et D, induisant ainsi la transduction du signal (Waters *et al.*, 2017). Bien que le récepteur fongique des strigolactones n'ait pas encore été

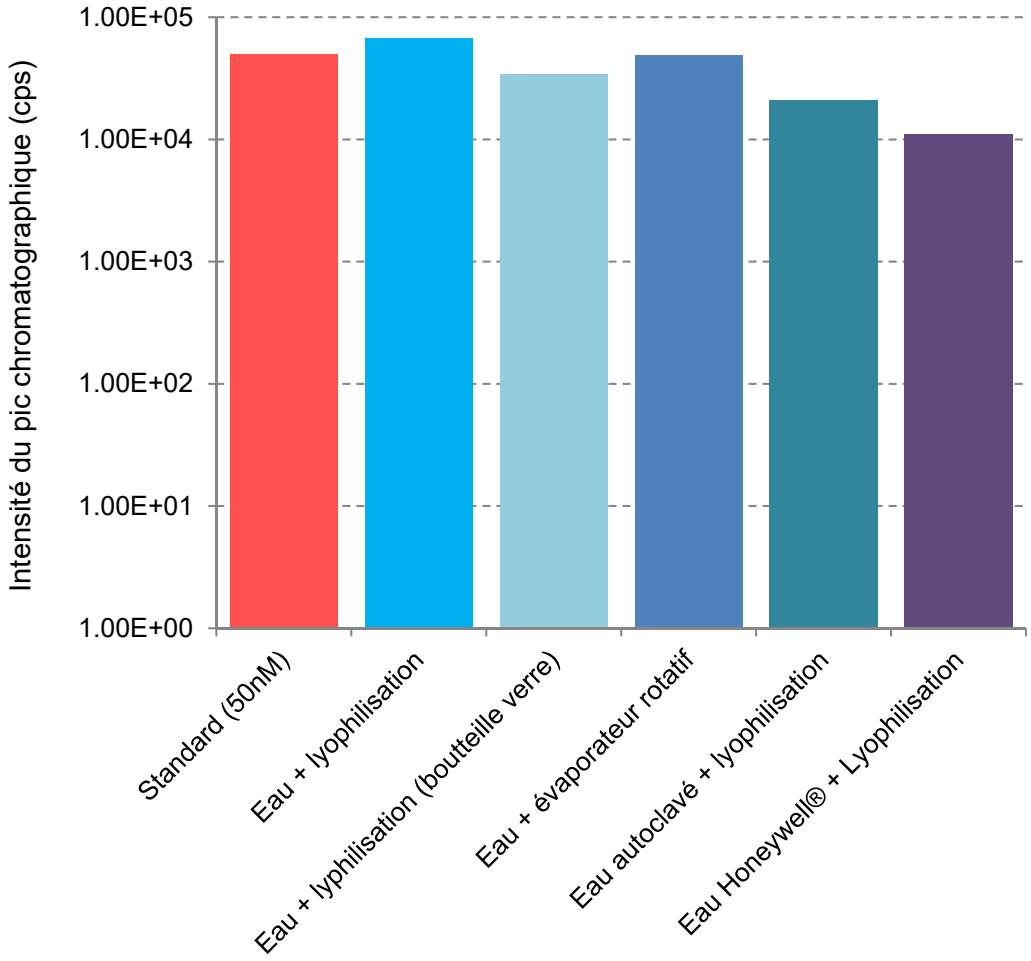


Figure 15 : Quantification relative de l'acide salicylique dans différents échantillons contrôles négatifs

25 mL d'eau Milli-Q (18.2 MΩ) non autoclavée (lorsque non précisé) ont été séchés par lyophilisation dans des tubes Falcon (lorsque que non précisé), puis repris dans 100 µL d'acide formique 1M. Chaque échantillon a été analysé en MRM en mode négatif. Les pics correspondant à l'acide salicylique (RT = 6,67 min, transition m/z 137> 93 et 137>65) ont étés enregistrés et la hauteur du pic de la transition MRM m/z 137 > 93 a été mesurée, et est représentée (échelle logarithmique).

identifié, il est raisonnable de penser qu'un mécanisme de perception similaire, incluant l'hydrolyse des SLs, ait lieu chez les CMA.

2 - Stratégies d'analyses par spectrométrie de masse : analyses ciblées et analyses globales

2.1 - Des analyses ciblées pour une analyse sensible et spécifique

Une fois purifiés, les échantillons sont analysés par spectrométrie de masse pour identifier les hormones végétales. Nous avons mené ces analyses en mode MRM (Q-trap) et HRMS (Q-exactive+) grâce à deux appareils différents, afin de bénéficier des avantages de ces deux approches. Le mode MRM permet d'atteindre une sensibilité élevée en éliminant l'ensemble des ions non spécifiques, tout en permettant également une double sélectivité qui permet une identification des molécules avec un fort degré de certitude. L'absence de détecteur haute résolution est alors compensée par la deuxième analyse complémentaire en HRMS, moins sensible mais capable de déterminer le m/z des ions avec une précision de l'ordre du ppm. Il est donc possible de déterminer la formule brute des ions parents et fils, et ainsi confirmer la structure de la molécule identifiée. La combinaison des analyses MRM et HRMS nous permet d'atteindre un niveau de confiance très élevé dans nos analyses.

2.1.1 - Cas particulier de l'acide salicylique

Malgré la disponibilité du standard et sa recherche dans nos échantillons, les résultats obtenus sur la détection de l'acide salicylique n'ont pas été rapportés dans l'article présenté ci-dessus, car son identification est problématique. En effet, nous avons identifié sa présence dans tous nos échantillons, spores broyées ou GSE, mais également dans les contrôles négatifs ne contenant pas de spores. En effet, en concentrant de l'eau Milli-Q stérile de la même manière que les GSE (250 fois), nous avons retrouvé les transitions spécifiques du SA en MRM, et sa masse exacte en HRMS, au même temps de rétention que son standard. Des résultats similaires ont été obtenus lorsque le protocole d'extraction globale de phytohormones a été appliqué sur de l'eau. Ni le solvant de reprise des échantillons, ni les différentes chaines HPLC utilisées ne présentaient de

traces de contamination au SA. Cette contamination semble donc liée à l'eau utilisée pour la mise en culture des spores, une fois concentrée ou être induite par le mode de concentration.

Nous avons testé une multitude de sources de contamination possible, comprenant l'origine de l'eau utilisée, l'influence de sa stérilisation par autoclave, le mode de concentration, le contenant utilisé pour la concentration, la qualité de l'acide formique utilisé pour la re-suspension de l'échantillon, ou encore la marque de cône utilisé pour prélever les échantillons ou les solvants. Toutes ces combinaisons testées ont donné des résultats similaires, c'est-à-dire une présence généralisée du SA dans les échantillons, et ne nous ont pas permis de déterminer l'origine de cette contamination (Figure 15).

La volatilisation du SA n'est pas attendue à des conditions de pression et de température ambiantes (Daubert, T. E. ; Danner, 1990), et son dérivé volatile, le méthyl-salicylate, ne peut être reconverti en acide salicylique que par voie enzymatique, ou par hydrolyse en milieu basique (Perona and David Brucer, 1985; Dempsey *et al.*, 2011). Dès lors, les conditions de réalisation de ces deux procédés sont improbables. Pour établir la cause de cet artéfact, il serait intéressant de réaliser cette extraction dans un laboratoire non dédié à l'étude des végétaux et ainsi éliminer la piste de la contamination par voie aérienne. Nous avons donc finalement choisi de focaliser nos efforts sur l'analyse des phytohormones pour lesquelles les contrôles négatifs ne présentaient pas de signaux artefactuels et avons laissé de côté l'analyse du SA.

2.2 - Aller vers des analyses « semi-ciblées » pour une identification exhaustive des phytohormones

Bien que le protocole d'extraction des phytohormones soit qualifié de global, les analyses en spectrométrie de masse sont réalisées de manière ciblée, et nous -nous sommes limités à la recherche de 38 d'entre elles, celles pour lesquelles nous avions des standards. Or, il existe un nombre et une variété bien plus importante de phytohormones. Par exemple, on compte plus de 136 gibbérellines différentes, sans compter les différentes décorations possibles telles que les glycosylations, méthylations ou 2β-hydroxylations (Piotrowska and Bajguz, 2011; Hedden and Thomas, 2012). Il est donc compliqué de réaliser une analyse exhaustive de toutes les hormones possibles de manière ciblée,

« seulement » 101 hormones sont simultanément analysées dans une étude récente (Šimura *et al.*, 2018).

Les approches d'analyses non ciblées ont recours à une acquisition « data-dépendant » top *n* des spectres MS/MS (DDA). Cela permet de sélectionner les *n* ions les plus abondants détectés en full-scan, pour être fragmentés et obtenir leur spectre MS/MS. Ces ions sont ensuite exclus de la sélection quelques secondes, pour permettre la sélection et fragmentation des *n* ions les plus abondants suivants. Ainsi, on peut obtenir une grande couverture de spectre MS/MS pour l'analyse et l'identification de nouvelles molécules, sans a priori. Cependant, cette couverture ne s'applique qu'aux ions les plus abondants, et les phytohormones sont généralement présentes en trop faible concentrations pour être identifiées par ce type d'approche.

La recherche de composés similaires à une même famille d'hormones peut également être effectuée par la recherche d'ions fils présentant les mêmes *m/z* caractéristiques afin d'identifier l'ion parent duquel ils sont issus (mode scan d'ion précurseur). Par exemple, dans le cas des auxines, le noyau indole fait souvent partie des ions fils retrouvés après fragmentation. De la même manière, une recherche par perte d'un fragment commun (mode scan des pertes neutres) peut servir à identifier toutes les hormones conjuguées avec un même composé (ose, acide aminé, etc.) (Domon and Aebersold, 2006).

Pour rechercher de nouvelles phytohormones sans a priori, nous pouvons utiliser des processus d'analyses semi-ciblées assistées par logiciel, comme utilisé par exemple pour la caractérisation de nouveaux flavonoïdes (Cerrato *et al.*, 2020). Cette approche est basée sur des analyses d'acquisition « data-indépendant » (DIA), se basant sur la sélection d'ions d'intérêt pour l'acquisition de spectres MS/MS, quelles que soient leurs intensités. Une base de données de *m/z* d'intérêt est donc nécessaire au préalable. Au cours de nos analyses HRMS, ce type d'analyse a été utilisé afin de sélectionner 39 hormones dont les standards étaient à notre disposition. Cette base de données pourrait alors être élargie pour inclure d'autant plus d'hormones putatives et potentiellement présentes dans nos échantillons.

Pour ce faire, nous pouvons considérer les hormones végétales déjà bien connues et identifiées comme des blocs, auquel nous pouvons greffer des groupements spécifiques.

Par exemple pour les cytokinines, en tenant compte des différentes formes existantes (isopentényl-adénine, zéatine, topoline, benzylaminopurine, kinétine), nous pouvons leur greffer une liste de décorations potentielles (hexose, pentose, acide aminé, méthylation etc…) en accord avec la littérature (Sakakibara, 2006) et les règles élémentaires de chimie. Ainsi, nous pouvons déterminer la masse et le m/z de toutes ces nouvelles molécules générées en fonction des différents adduits possibles, et prédire des patrons de fragmentation caractéristiques pour chacune.

Après acquisition des spectres MS/MS, l'utilisation de logiciels d'identification tel que « compound discoverer » (Cerrato *et al.*, 2020) devient alors indispensable pour retraiter les spectres MS/MS acquis, en fonction de la base de données précédemment établie. Ainsi, nous pouvons espérer identifier de façon ciblée, mais sans a priori, de nouvelles phytohormones présentes mais jusque-là ignorées, dans les GSE ou les échantillons de spores broyées. Cette identification correspond à un niveau 2 ou 2b (structure probable d'une molécule, confirmée ou non par des bases de données ou la littérature (Schymanski *et al.*, 2014)). Pour avoir une confirmation formelle de la présence de ces potentielles hormones nouvellement identifiées, une analyse comparative avec leur standard, ou une autre analyse structurale complémentaire basée sur un principe d'identification différent -tel que la RMN, la spectroscopie infrarouge, la cristallographie- deviendra alors nécessaire.

3 - Influence de la production d'hormones par les CMA sur la plante hôte ?

Même si l'identification directe d'hormones végétales à partir de CMA purs est une avancée significative pour la communauté scientifique travaillant sur la symbiose endomycorhizienne, le choix du modèle ainsi que les conditions d'études laissent encore des questions en suspens.

3.1 - Des spores en (pré)-germination ?

L'utilisation de spores axéniques de CMA en pré-germination était nécessaire afin d'identifier des hormones végétales sans ambiguïté quant à une potentielle contamination provenant de la plante hôte ou de micro-organismes environnants. Cependant, les spores en pré-germination ont encore un métabolisme « dormant » avant d'être activées par les

exsudats racinaires, contenant notamment les strigolactones. Il serait judicieux d'analyser le profil hormonal des spores ou des GSE, non pas après ajout d'exsudats racinaires, qui pourraient contenir des hormones, mais après un traitement avec une strigolactone non naturelle, par exemple du GR24.

Le stade pré-symbiotique ne représente qu'un cours instant dans leur cycle de vie car les CMA sont avant tout des champignons qui se développent en interaction constante avec leur plante hôte. L'étude du profil hormonal des CMA en interaction avec un hôte serait donc une source d'information complémentaire et importante, mais est autrement plus contraignante car il est difficile de déterminer l'origine biologique (fongique ou végétale) d'une hormone exsudée par des racines mycorhizées. Un système de co-culture à double compartiment a pu être employé pour pouvoir séparer, d'une part les racines mycorhizées, et de l'autre les hyphes extra-racinaires. Des premiers résultats préliminaires, détaillés dans le chapitre 2, nous permettent de constater un profil hormonal des exsudats fongiques, différent des spores en germination (Figure 17). En plus de l'identification précédemment décrite de l'IAA et de l'iPR, nous avons pu identifier la présence de deux autres cytokinines : les zéatine-ribose *cis* et *trans.* De l'ABA a également pu être identifié dans ces nouveaux exsudats, mais non reconfirmé dans une autre expérience indépendante.

3.2 - De un attomole à dix femtomoles d'hormones exsudées par spores ?

Dans l'article présenté plus tôt dans ce chapitre, nous rapportons qu'en moyenne, une spore produit de l'ordre d'1 attomole d'iPR, 30 attomoles d'IAA, et jusqu'à 10 femtomoles d'éthylène dans les conditions les plus favorables. Ces quantités peuvent sembler dérisoires, et la contribution hormonale des CMA à la rhizosphère peut sembler peu significative. Il est toutefois important de noter que les spores sont rarement isolées dans les sols. Dans le cadre d'une thèse, réalisée au LRSV sur des populations mycorhiziennes des sols entropisés, Maes *et al.* (en préparation) retrouvent entre 500 et 20 000 spores de *R. irregularis* par litre de substrat, après deux mois de culture en pots, en conditions de laboratoire. Ils quantifient entre une et neuf spores de champignon endomycorhizien par g de substrat dans 30 parcelles de champs. De plus il est estimé que l'on retrouve jusqu'à 100 m de mycélium par cm^3 de sol (Bardgett and Van Der Putten,

2014). L'exsudation de phytohormones par les spores de CMA pourrait alors atteindre, dans les conditions les plus favorables, $2x10^{-14}$ mol.L^{-1} d'iPR, $6x10^{-13}$ mol.L^{-1} d'IAA et $2x10^{-10}$ mol.L^{-1} d'éthylène. De plus, les hormones agissent à faible concentration. Par exemple $1x10^{-9}$ mol.L^{-1} d'IAA peut induire une réponse protéique chez *A. thaliana*, $1x10^{-8}$ mol.L^{-1} de CKs inhibe la formation de racines latérales chez *O. sativa* (Debi *et al.*, 2005), ou encore $3,6x10^{-9}$ mol.L^{-1} d'éthylène suffisent à initier la triple réponse chez *S. lycopersicum* (Yokotani *et al.*, 2009). Sachant que la répartition des spores dans le sol n'est pas homogène, celles-ci étant retrouvées en plus grande quantité à proximité des racines, nous pouvons imaginer que la concentration d'hormones exsudées localement, est suffisamment élevée pour induire une perception et éventuellement une réponse chez l'hôte.

3.3 - Des hormones exsudées par les arbuscules ?

La symbiose endomycorhizienne se caractérise par la formation de structures fongiques à l'intérieur des cellules corticales de la plante hôte, appelées arbuscules. Sachant que ces arbuscules sont les lieux d'échange privilégiés de nutriments, entre la plante et le CMA, et que ces derniers sont capables d'exsuder des hormones végétales, nous pouvons imaginer que les CMA peuvent alors également sécréter des hormones à l'intérieur même des cellules arbusculaires. Dans ces cellules, (Etemadi *et al.*, 2014) ont identifié une expression supérieure du gène rapporteur de l'auxine DR5-GUS. Dès lors, on pourrait supposer que l'auxine exsudée par le CMA puisse contribuer à l'activation du promoteur DR5. Cependant, pour confirmer ces hypothèses, il faudra concevoir et réaliser des expériences de nano imagerie couplée à de la spectrométrie de masse, à condition que les résolutions de ce type d'approche s'améliorent et afin d'analyser le contenu spécifique des cellules arbusculaires, voire même celui de l'espace péri-arbusculaire, même si l'origine de ces hormones, végétales ou fongiques, restera difficile à démontrer.

- Chapitre 2 -
Origine de biosynthèse des phytohormones identifiées

Préambule

La détection d'hormones végétales dans des échantillons de *R. irregularis* ne signifie pas pour autant que les CMAs sont capables de les biosynthétiser au sens strict, bien que cela fasse partie de nos hypothèses. En effet, pour produire des spores, le champignon est toujours relié à sa plante hôte. Les hormones exsudées par les spores, identifiées durant le chapitre précédent, peuvent être végétales, issues d'un import fongique et avoir été stockées dans les spores. Le but de ce chapitre est donc de déterminer l'origine de ces hormones, végétales ou fongiques.

Pour ce faire, nous avons essayé de comparer le profil hormonal de *R. irregularis*, à différents temps durant la germination, ou à différents stades de son cycle de vie. Toutefois, ces approches sont indirectes, et ne constituent pas une preuve formelle de biosynthèse fongique. Nous avons donc initié des approches de marquage isotopique, à l'aide de précurseurs marqués ajoutés aux spores en germination, dans le but d'observer l'incorporation du marquage dans les hormones détectées, preuve d'une synthèse fongique.

Résultats et discussion

1 - Biosynthèse ou stockage ? Analyse des hormones produites par le champignon à différents stades de développement

Afin de déterminer si les spores de *R. irregularis* produisent les phytohormones qui ont été détectées, ou les exsudent à partir d'un stock de phytohormones importées durant la phase symbiotique, nous avons étudié le profil hormonal de spores pendant

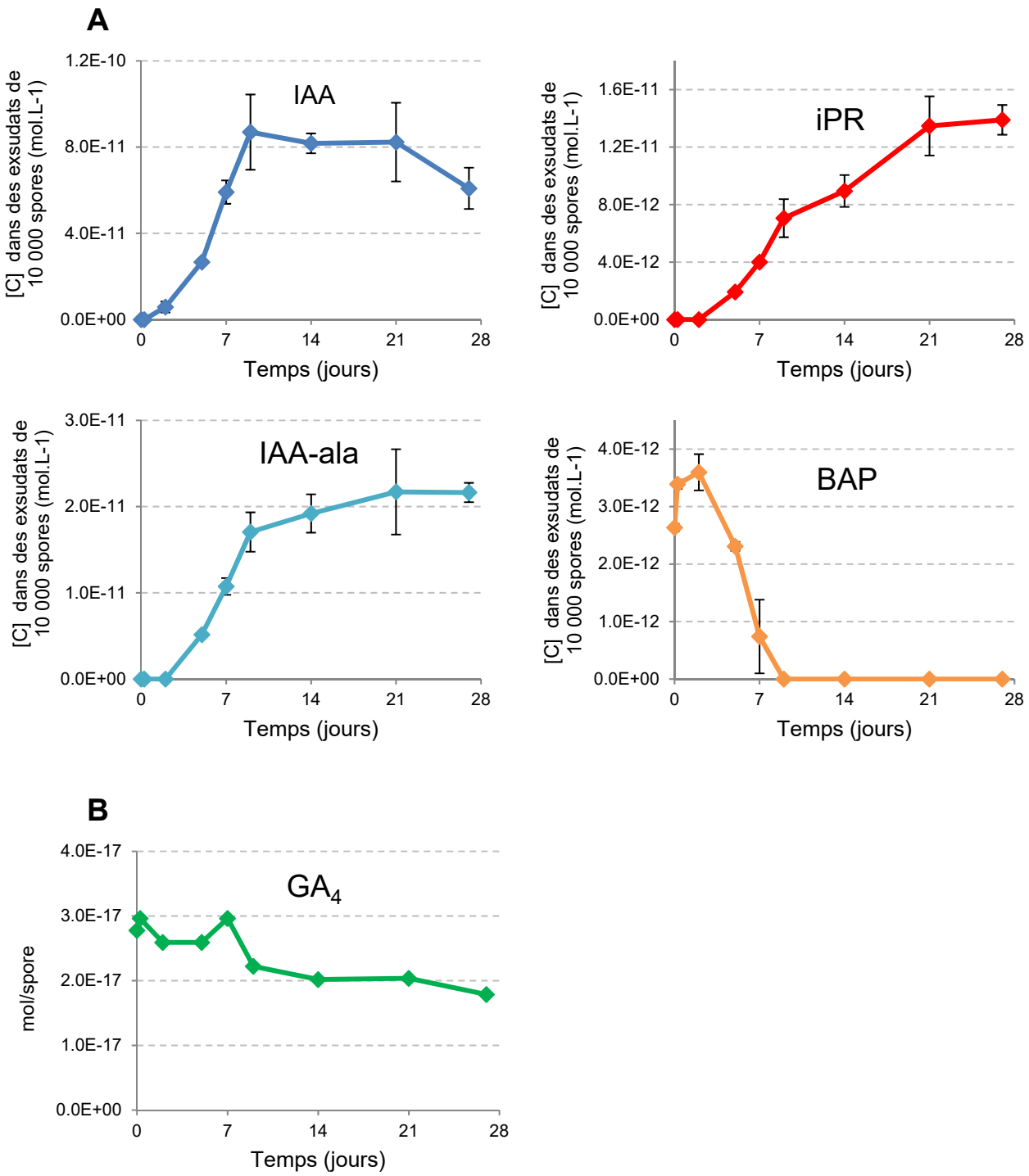


Figure 16 : Détection des phytohormones dans les GSE ou les spores de *R. irregularis* au cours du temps

Hormones détectées au cours du temps à partir de **(A)** GSE de spores en germination obtenues avec 10 000 spores (n=3, barre d'erreur = écart type), ou **(B)** dans un extrait de 30 000 spores de *R. irregularis* broyées (n=1). Les échantillons ont été analysés par MRM, et la concentration est estimée grâce aux courbes de calibrations externes (barre d'erreur = écart type).

une cinétique de germination (exsudats fongiques et spores broyées) mais également celui présent dans des hyphes extra-racinaires, comparativement au compartiment contenant les racines mycorhizées, dans des cultures en DC.

1.1 - Cinétique d'exsudation des hormones

Notre première approche a consisté à analyser le profil hormonal des GSE et des spores au cours du temps, dans les mêmes conditions que décrites dans le chapitre 1. Nous avons émis l'hypothèse que, si la concentration d'une hormone décroit au cours du temps, alors nous pouvons penser qu'elle a été stockée durant la formation des spores, et est exsudée durant leur germination. En revanche, si sa concentration reste stable ou augmente, cela suggère que le champignon produit cette hormone, ou du moins réalise une ou plusieurs étapes amenant à sa biosynthèse finale. Il serait également possible que le champignon ne synthétise pas cette hormone, mais secrète de manière stable ou plus activement au cours du temps, une hormone qu'il aurait internalisée précédemment. Dans ce cas, une grande quantité d'hormone devrait être retrouvée dans les spores non germées broyées (équivalent au total d'hormone retrouvée dans les GSE).

Des triplicats de GSE, produits en cinétique par 10 000 spores axéniques germées dans 25 ml d'eau Milli-Q stérile, ainsi que le contenu de ces spores, ont été analysés par spectrométrie de masse. Après le rinçage (permettant d'éliminer le tampon de stockage), ces spores sont collectées immédiatement (T0), ou mises à germer dans une étuve à CO_2 durant 6 heures, 2 jours, 5 jours, 7 jours, 9 jours, 14 jours, 21 jours et 27 jours. Les exsudats sont ensuite filtrés et lyophilisés, alors que les spores, ayant servies à produire les triplicats, sont rassemblées avant l'extraction et l'analyse par spectrométrie de masse, comme décrit précédemment (cf. Chapitre 1).

Nous avons pu constater que les concentrations d'iPR et IAA secrétées dans les GSE augmentent au cours du temps (Figure 16A). L'IAA est détectable à partir de 2 jours de germination, et sa concentration augmente jusqu'à atteindre un plateau, voire une décroissance, à $8x10^{-11}$ M au bout de 9 jours. Quant à l'iPR, elle est détectable plus tardivement, à partir de 5 jours de germination et sa concentration augmente de manière constante durant toute la durée de la cinétique, atteignant la concentration $1,4x10^{-11}$ M au bout de 27 jours. En analysant les hormones présentes dans les extraits de spores, à ces mêmes temps de cinétique, nous n'avons pas été capable de détecter de l'IAA ni de l'iPR.

Dans l'hypothèse où les spores stockeraient un pool d'IAA et d'iPR internalisé pendant la symbiose avec la plante et l'exsuderaient durant la germination, alors cette exsudation serait contrôlée et stimulée par le champignon, vu l'augmentation de molécules détectées au cours du temps. Le maximum d'exsudation d'IAA serait délivré à 9 jours, pendant plusieurs jours, tandis que celui d'iPR continue de croître après 27 jours. Or, si ces hormones étaient stockées et relâchées durant la germination, nous devrions détecter des concentrations inversement proportionnelles à celles mesurées dans les exsudats dans les spores, et leurs concentrations à T0 devraient être supérieures ou égales à la somme de celles mesurées dans les GSE après 27 jours de germination. Nous n'avons pas été capable de détecter ces hormones dans les spores broyées, donc ces résultats suggèrent que l'IAA et l'iPR seraient bel est bien produites par les spores de *R. irregularis*, dans des cinétiques différentes.

Concernant le GA_4, nous l'avons détecté dans cet essai, comme dans les précédents, dans l'extrait de spores broyées mais pas dans les GSE. Sa concentration semble décroitre légèrement au cours du temps (Figure 16B), mais ces résultats n'ont été obtenus qu'à partir d'un simplicat pour chaque point de cinétique. En effet, les spores nécessaires à l'obtention d'un triplicat de GSE sont rassemblées avant de procéder au broyage, à l'extraction et aux purifications, afin d'avoir suffisamment de matériel biologique, et extraire suffisamment d'hormones, pour passer la limite de détection. Il est donc indispensable de reproduire cette expérience afin de confirmer la tendance observée. Dans ce cas, soit le GA_4 est d'origine végétale, et il est très stable dans la spore au cours de la germination, d'où sa présence encore mesurable après 27 jours de germination, soit il est synthétisé et dégradé de manière à conserver une concentration constante dans les spores. Il pourrait aussi être exsudé, et présent dans les GSE, mais en dessous de la limite de détection.

En complément des hormones décrites dans le chapitre 1, nous avons identifié dans les GSE de cette cinétique, au même temps de rétention que leur standard respectif, de l'IAA-Ala, dont la concentration semble être corrélée avec celle de l'IAA non conjuguée et de la BAP à l'état de traces, dont sa concentration diminue rapidement au cours du temps jusqu'à ne plus être détectable à partir de 7 jours (Figure 16A). Il sera complémentaire de valider la présence de ces deux hormones en mesurant leur masse

exacte par spectrométrie de masse en haute résolution, si leur quantité est suffisante pour les détecter.

1.2 - Cultures en double compartiment : des ratios d'isomères d'hormones différents

Notre objectif initial était de comparer le profil hormonal d'exsudats fongiques produit par les spores en germination à celui produit par des hyphes extra-racinaires cultivés en double compartiment avec une plante hôte. Nous avons également comparé le profil hormonal de chaque compartiment, contenant respectivement le mycélium seul, à celui contenant les racines mycorhizées (Figure 5A).

Après trois mois de co-culture, les géloses des deux compartiments, contenant d'une part les exsudats exclusivement fongiques et d'autre part les exsudats fongiques et racinaires, ont été collectés. Les phytohormones ont été extraites de la gélose par macération dans le solvant Bieleski. L'extrait a ensuite subi le protocole de purification d'hormones par SPE et a été analysé par spectrométrie de masse en haute résolution.

Après analyse, nous avons détecté dans le compartiment contenant les racines mycorhizées de l'iP, de l'iPR, les zéatines *cis* et *trans, les c*ZR et *t*ZR, l'ABA et l'ABA-GE, et l'IAA (Figure 17A). Dans le compartiment fongique, nous avons retrouvé l'IAA et l'iPR, déjà identifiées dans les GSE (voir Chapitre 1). De plus, nous avons détecté de l'ABA et deux cytokinines : la *c*ZR et la *t*ZR. Ces hormones, comme indiqué précédemment, sont également détectées dans le compartiment accueillant les racines hôtes mycorhizées. Comme le champignon est présent dans chacun des compartiments, nous ne sommes pas en mesure de différencier l'apport hormonal du champignon par rapport à celui de la plante. En revanche, pour les hormones telles que l'iP, les *c*Z et *t*Z, et l'ABA-GE, qui ne sont retrouvées que dans le compartiment racinaire, nous pouvons proposer qu'elles soient exclusivement produites par la plante et non transportées vers le champignon.

D'un point de vue quantitatif, n'ayant pas pu normaliser par rapport aux biomasses racinaires et/ou fongiques, à cause de la présence de gélose, il est difficile de conclure. Toutefois, les extraits concentrés et analysés contiennent des concentrations d'hormones plus faibles ou égales dans le compartiment fongique à celles dans le compartiment racinaire, nous empêchant de proposer des hypothèses sur leurs origines.

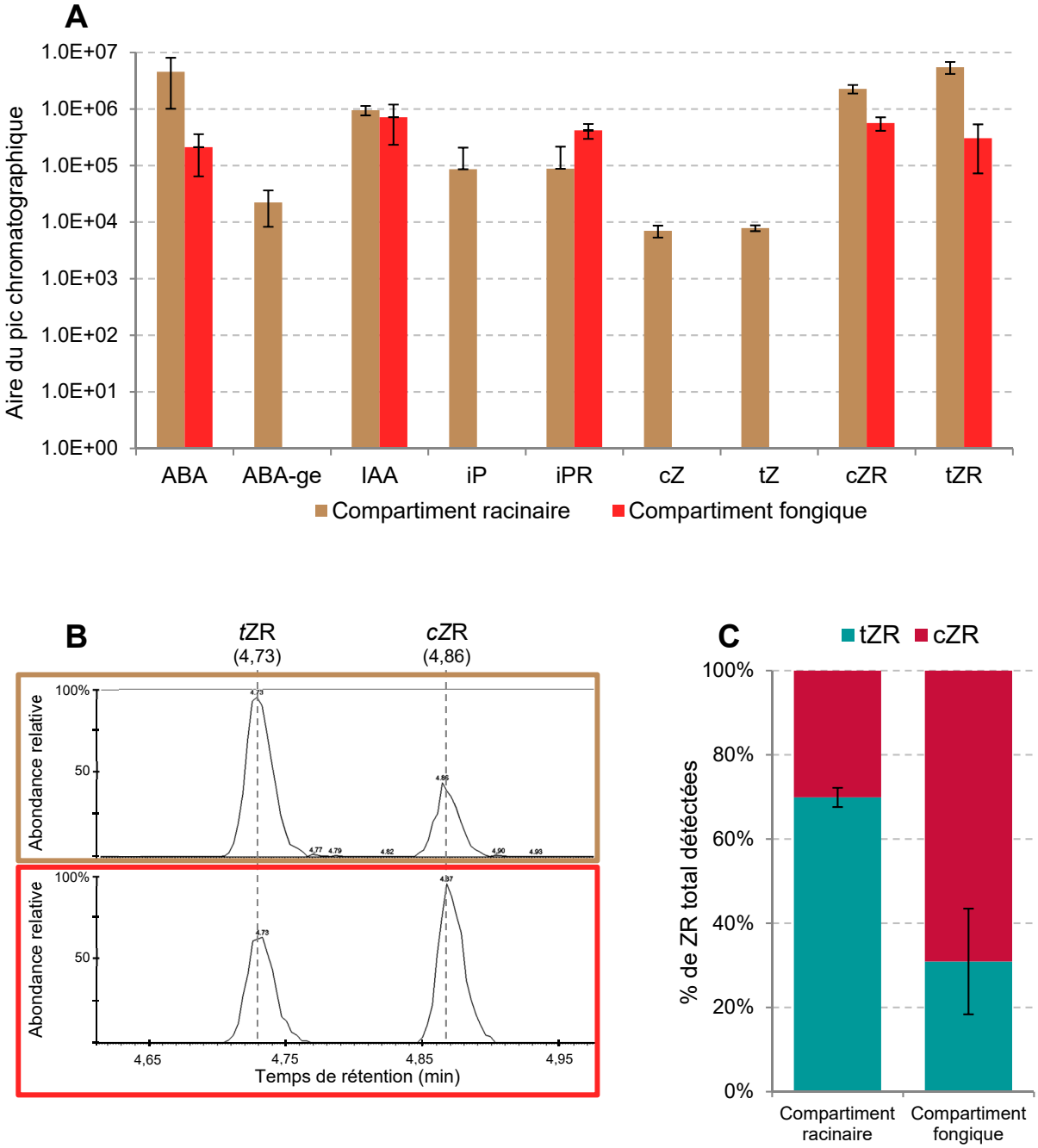


Figure 17 : Profil hormonal détecté dans les boîtes double compartiment (DC)

(A) Hormones détectées dans le compartiment racinaire (« hairy roots » de carottes mycorhizées, en marron) ou dans le compartiment fongique (*R. irregularis* seul, rouge) des boîtes double compartiment après trois mois de culture (n=3, barre d'erreur = écart type) **(B)** XIC de la ZR (m/z = 351,1543) enregistré à partir du compartiment racinaire (marron) et du compartiment fongique (rouge). **(C)** Proportion d'isomères *cis* (rouge) et *trans* (cyan) de ZR par rapport au total de ZR détectées dans chaque compartiment (n=3, barre d'erreur = écart type).

Seule l'iPR semble être présente en concentration supérieure dans le compartiment fongique, pouvant laisser penser à un transfert hormonal de la plante vers le champignon, additionné à l'iPR d'origine fongique. Cependant, dans le cas des zéatines-ribose, nous avons remarqué que l'abondance relative des deux isomères de ZR varie d'un compartiment à l'autre (Figure 17B). L'isomère *trans* est majoritaire dans le compartiment racinaire et représente 70% (+/- 2%) du total des ZR mesurées, tandis que dans le compartiment fongique l'isomère *cis* représente 68% (+/- 12%) des ZR totales (Figure 17C). Or ces deux isomères proviennent de deux voies de biosynthèses différentes : l'isomère *trans* est formé depuis les CKs de type iP, métabolisées à partir de DMAPP et adénine mono, di ou tri-phosphates, par l'enzyme isopentenyl transférase, alors que l'isomère *trans* provient de l'isoprenylation d'ARN de transfert par la tRNA-IPT (Sakakibara, 2006). Il est supposé que l'inter-conversion d'un isomère à l'autre pourrait être due à l'action d'une enzyme, la zéatine cis/trans isomérase, identifiée et partiellement purifiée dans des graines de *Phaseolus vulgaris* (Bassil *et al.*, 1993), mais depuis, cette enzyme n'a pas été de nouveau identifiée dans d'autres plantes ou micro-organismes. Nous pouvons donc proposer l'hypothèse que *R. irregularis* est capable de métaboliser préférentiellement les isomères *cis* de zéatine-ribose, soit par une biosynthèse active, ou alors par le biais d'une isomérase encore non caractérisée. Ces résultats restent à être reproduits plusieurs fois et de manière indépendante pour être validés.

1.3 - Différentes plantes hôtes = différents profils hormonaux ?

Nous avons à notre disposition des « hairy roots » issues de différentes espèces, telles que le pois, la tomate ou encore le maïs, et celles-ci peuvent présenter des profils de phytohormones variables (comme observé chez d'autres plantes (Leibar-Porcel *et al.*, 2020). De plus, l'invasion des racines par le champignon peut induire une accumulation de cette hormone grâce à un remodelage métabolique, comme cela a pu déjà être observé chez le maïs (Danneberg *et al.*, 1993).

Pour venir compléter notre collection de plantes hôtes présentant des profils de phytohormones différents, nous pouvons également adapter notre système de culture en double compartiment pour accueillir des plantes entières non transformées, telles que *Marchantia paleacea*, qui produit auxines et cytokinines (majoritairement de la famille des iP et *c*Z) (Drábková *et al.*, 2015) mais ne produit pas de jasmonate (Yamamoto *et al.*,

2015). Ainsi, en exploitant le système de culture en double compartiment, nous pouvons envisager de mettre en évidence la biosynthèse ou le transfert d'hormones par *R. irregularis* en le co-cultivant avec ces différentes plantes hôtes et en étudiant comparativement le profil hormonal des deux compartiments de plantes mycorhizées et celui en simple compartiment de plantes hôtes non mycorhizées.

Si le profil hormonal du compartiment fongique est invariable, quel que soit l'hôte, cela suggérera que *R. irregularis* produit lui-même les hormones détectées. En revanche, si l'analyse des compartiments fongiques révèlent des profils similaires à ceux des plantes hôtes respectives, mais différents d'une culture d'une plante hôte à une autre, alors nous pourrons faire l'hypothèse que les hormones retrouvées dans le compartiment fongique sont d'origine végétale, et transférées et accumulées dans les hyphes extra-racinaires de *R. irregularis*.

Durant le temps imparti par cette thèse, nous n'avons pas pu mettre en place ces approches. Bien que ces systèmes de culture soient parfaitement maitrisés au laboratoire, leur mise en place reste lourde. Ils nécessitent une attention régulière, et imposent des précautions pour éviter une éventuelle contamination hormonale du compartiment fongique par les racines hôtes, qui passeraient par-dessus la barrière physique ou encore qui passeraient dans le second compartiment par condensation, nécessitant l'ajout de contrôles négatifs sans CMA. Le temps de culture est relativement long avant d'obtenir un bon développement du champignon, et un grand nombre de boîtes est nécessaire pour obtenir suffisamment d'échantillons exploitables à la fin du temps de culture (sans contamination, avec un développement racinaire et fongique homogène et satisfaisant). Il serait intéressant à l'avenir, de réaliser ces expériences, afin d'obtenir des données supplémentaires pouvant nous aider à conclure quant à l'origine végétale ou fongique de ces hormones.

2 - Origine de biosynthèse fongique ? Utilisation de marquages isotopiques

Afin de déterminer l'origine de biosynthèse des hormones détectées, avec des approches directes, nous avons réalisé plusieurs expériences de marquages isotopiques. Nous avons fourni au champignon *R. irregularis* une ou plusieurs sources de carbones,

enrichies en isotope stable (^{13}C) et avons recherché dans ses exsudats la présence de l'IAA et iP-R enrichis en atomes de carbone lourds. Un enrichissement démontrerait qu'une voie de biosynthèse, utilisant un précurseur marqué, existe chez le champignon. Il est important de préciser qu'ici, nous ne cherchions pas à identifier ou décrire les voies de biosynthèses impliquées, nous souhaitions seulement démontrer la capacité du champignon à produire les hormones détectées. C'est pourquoi, nous avons mené des premières expériences simples, à partir de substrats marqués connus pour être incorporés par le champignon en germination, et avons réalisé une analyse ciblée sur l'IAA, l'iP-R et le GA_4.

2.1 - Incorporation de glucose et d'acétate marqués et suivi du profil hormonal lors de la germination des spores de *R. irregularis*

Nous avons précédemment constaté que les GSE de 10 000 spores, produits durant sept jours, contenaient de l'IAA et de l'iPR à des concentrations suffisantes pour être détectables par nos spectromètres de masse. Nous avons donc choisi d'utiliser le même nombre de spores, et les conditions de germination les plus favorables, pour favoriser l'incorporation du marquage et l'éventuelle biosynthèse des phytohormones : les spores axéniques de *R. irregularis* ont été mises à germer dans du milieu M liquide (Bécard and Fortin, 1988), pendant 7 jours. Le milieu de germination a été complémenté avec différentes sources de molécules carbonées connues pour être incorporées pendant la germination, et a différentes concentrations (acétate, 200 µM, 1 mM, 10 mM et /ou glucose, 1 mM (Bücking *et al.*, 2008)) marqués au ^{13}C (en C_1 ou uniformément $U^{13}C$). De plus, certaines conditions ont également reçu un traitement au GR24.

Après germination des spores, collecte et concentration des GSE, et extraction des hormones contenues dans les spores, puis analyse HRMS, nous avons cherché manuellement, aux temps de rétention spécifiques de l'IAA et l'iPR, les ions de *m/z* théorique précis (+/- 5 ppm), correspondants à l'isotopologue non marqué (m0) ainsi que ceux de tous les autres isotopologues envisageables, allant de l'incorporation d'un seul atome de ^{13}C (m+1), jusqu'aux molécules entièrement marquées au ^{13}C (m+n, n=nombre de carbone total dans chaque hormone).

Nous avons constaté que la concentration d'acétate de 10 mM inhibe la germination des spores, tandis que les concentrations inférieures n'ont pas d'effets

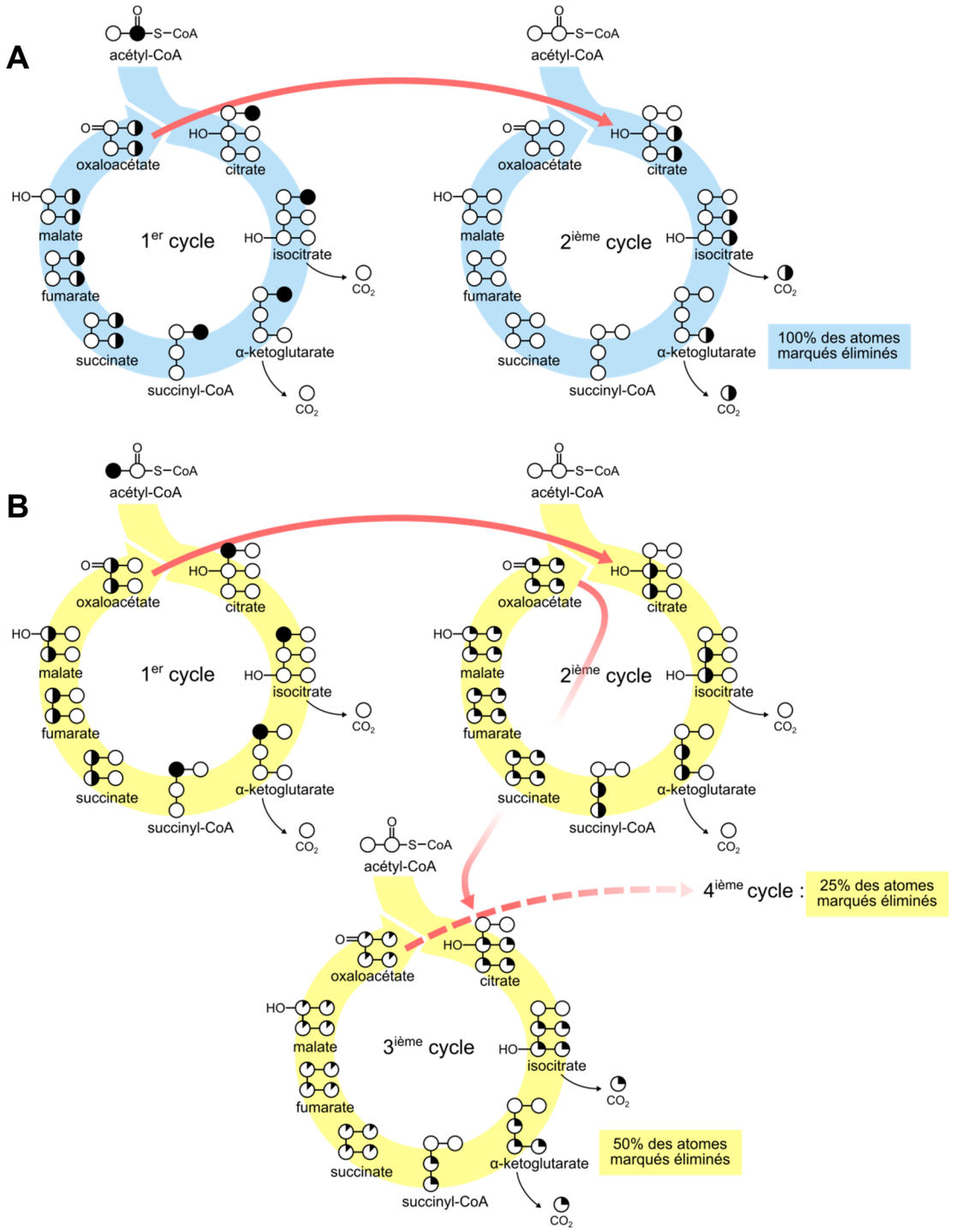


Figure 18 : Devenir des carbones 13 issus de l'acétate marqué dans le cycle de Krebs

Représentation de la diffusion du marquage isotopique dans le cycle de Krebs, en fonction de la position du carbone marqué (rond plein) dans l'acétate. **(A)** Acétate marqué en position 1 : après un premier cycle, l'ensemble du marquage est éliminé par les deux étapes successives de décarboxylation du citrate et de l'α-ketoglutarate. **(B)** Acétate marqué en position 2 : l'atome marqué isotopiquement est intégré en position non carboxylable. Après deux cycles, il a une chance sur deux d'être éliminé par décarboxylation, puis une chance sur quatre au cycle suivant et ainsi de suite.

Crédit : Jonas Parrish

visibles sur la germination des spores. L'acétate marqué $^{13}C_1$, utilisé dans une première expérience, n'a pas permis d'observer de marquage au niveau des hormones. Cependant, après internalisation de l'acétate dans le cycle de Krebs, le carbone 1, marqué au ^{13}C est éliminé sous forme de CO_2, immédiatement après avoir effectué un cycle complet (Wolfe and Jahoor, 1990) (Figure 18). Nous avons donc utilisé par la suite des sources de carbone marquées uniformément au ^{13}C. Nous avons ajouté de l'acétate $U^{13}C$ seul à différentes concentrations, ou associé avec du glucose $U^{13}C$, ou du GR24 (voir Figure 19). Toutefois, nous n'avons pas été capables d'identifier d'isotopologues de l'IAA ou de l'iPR, au-delà de l'isotopologue m+1 d'intensité corrélée avec l'abondance naturelle du ^{13}C.

Nous avons donc voulu nous assurer que les sources de carbones avaient bien été assimilées par les spores, conduisant à l'incorporation du marquage. Nous avons cherché les premiers métabolites, en aval de ces précurseurs décrits dans les voies métaboliques, et étudié leurs isotopologues (Figure 19). Nous avons détecté, dans les exsudats provenant de différentes expériences indépendantes, la présence de citrate/isocitrate et malate ainsi que celle de certains de leurs isotopologues dans des proportions plus importantes que dans les conditions contrôles. Par exemple, dans le cas de l'acide malique, la distribution théorique due à l'abondance naturelle du ^{13}C est de 95.85% d'isotopologue m0, 4% de m+1, 0.0079% de m+2 et 0.00057% m+3. Après traitement au GR24 et à l'acétate $U^{13}C$, nous avons identifié 79.6% d'isotopologue m0, et jusqu'à 20% de m+1, 9% de m+2 et 1% de m+3. Ceci correspond à une assimilation du marquage de l'ordre de 2,5%. Pour le citrate/isocitrate, en supplémentant nos spores en acétate $U^{13}C$, nous retrouvons 66% de m0, 24.8% de m+1, 7.7% de m+2 et 1% de m+3 alors que dans les conditions contrôles nous mesurons 92% de m0, 7% de m+1 et 1% de m+2, en accord avec la répartition naturelle théorique. Ceci correspond à une assimilation de l'ordre de 7%. Les autres intermédiaires du cycle de Krebs et du cycle du glyoxylate n'ont été identifiés que dans leurs formes non marquées.

En complément, nous avons également cherché à identifier l'incorporation de marquage dans les métabolites les plus abondants détectés dans nos échantillons. Le bruit de fond des spectres de masses précédemment obtenus a été retiré à l'aide du logiciel MSdial, afin d'éliminer les ions correspondants aux différents adduits formés en source,

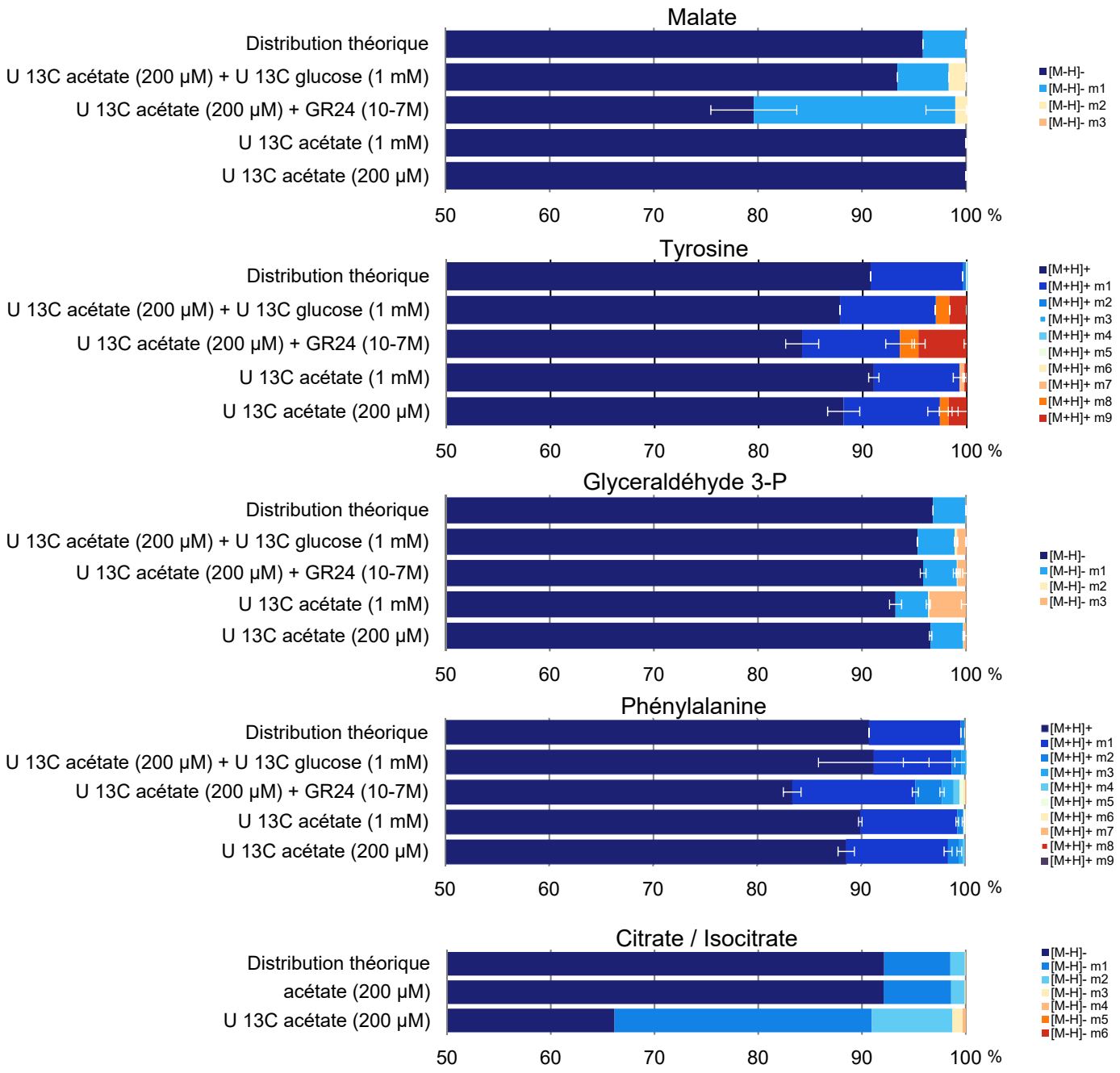


Figure 19 : Distribution isotopique du marquage dans les métabolites les plus abondants ou les intermédiaires du cycle de Krebs

Distribution des isotopologues des métabolites les plus abondants retrouvés dans les GSE ou les intermédiaires du cycle de Krebs, après 7 jours de germination en présence de sources de carbone marquées uniformément au carbone 13, en comparaison avec la distribution théorique. L'intensité d'incorporation du marquage est représentée par un gradient allant du bleu foncé (m0 = absence de marquage) au rouge ($m+n_{max}$ = molécule intégralement marquée au ^{13}C) (n=3, barre d'erreur = écart type).

puis ils ont été comparés à des bases de données *in silico* avec le logiciel MSfinder, pour annoter les métabolites correspondants majoritairement présents. Les métabolites ont été triés en fonction de l'intensité du pic correspondant à l'ion monoisotopique et nous avons ensuite cherché manuellement les isotopologues des métabolites les plus abondants identifiés. Ainsi nous avons pu observer que la phénylalanine, la tyrosine, et le glycéraldéhyde-3-P étaient les métabolites majoritairement présents dans nos GSE et qu'ils étaient marqués au ^{13}C. L'incorporation est encore une fois très faible, pourtant, grâce à la forte concentration de ces métabolites, nous pouvons détecter des isotopologues présents, même en faible pourcentage. Par exemple, nous pouvons observer presque tous les isotopologues de la phénylalanine sauf la forme entièrement marquée m+9. L'isotopologue m+8, le plus faiblement observable, représente 0.0058% du signal total. Afin d'observer le même type de massif isotopique pour l'IAA ou l'iPR, il faudrait obtenir une intensité de marquage plus forte pour permettre la détection de leurs isotopologues par l'orbitrap, ou une quantité d'ions -et donc une concentration de phytohormones- bien supérieure dans nos échantillons.

Dans nos expériences, les conditions traitées au GR24 permettent d'observer une augmentation de l'incorporation de marquage dans les métabolites étudiés. Ce résultat est en accord avec les conclusions de (Bücking *et al.*, 2008) qui ont démontré que des traitements avec des exsudats racinaires améliorent l'incorporation de ces sources exogènes de carbones. Cependant, la stimulation du métabolisme fongique par le GR24 a également pour effet de mobiliser les stocks de triacylglycérols endogènes grâce à une augmentation de la β-oxydation, et stimule la germination des spores (Besserer *et al.*, 2006, 2008). Ce nouveau pool de carbone risque de supplanter celui constitué par l'acétate et le glucose exogènes et diluer le marquage dans les voies de biosynthèse des métabolites secondaires. Il est donc important de mener systématiquement ces expériences avec et sans traitement au GR24, pour espérer gagner en intensité de marquage, sans pour autant passer à côté de la détection d'IAA et CKs marquées.

En conclusion, nous avons pu constater que les spores ont assimilé les sources de carbone marquées fournies, mais très faiblement, et pas suffisamment pour attester leur incorporation dans des métabolites secondaires minoritaires telles que les phytohormones. Ces premiers résultats, bien que préliminaires, nous encouragent à

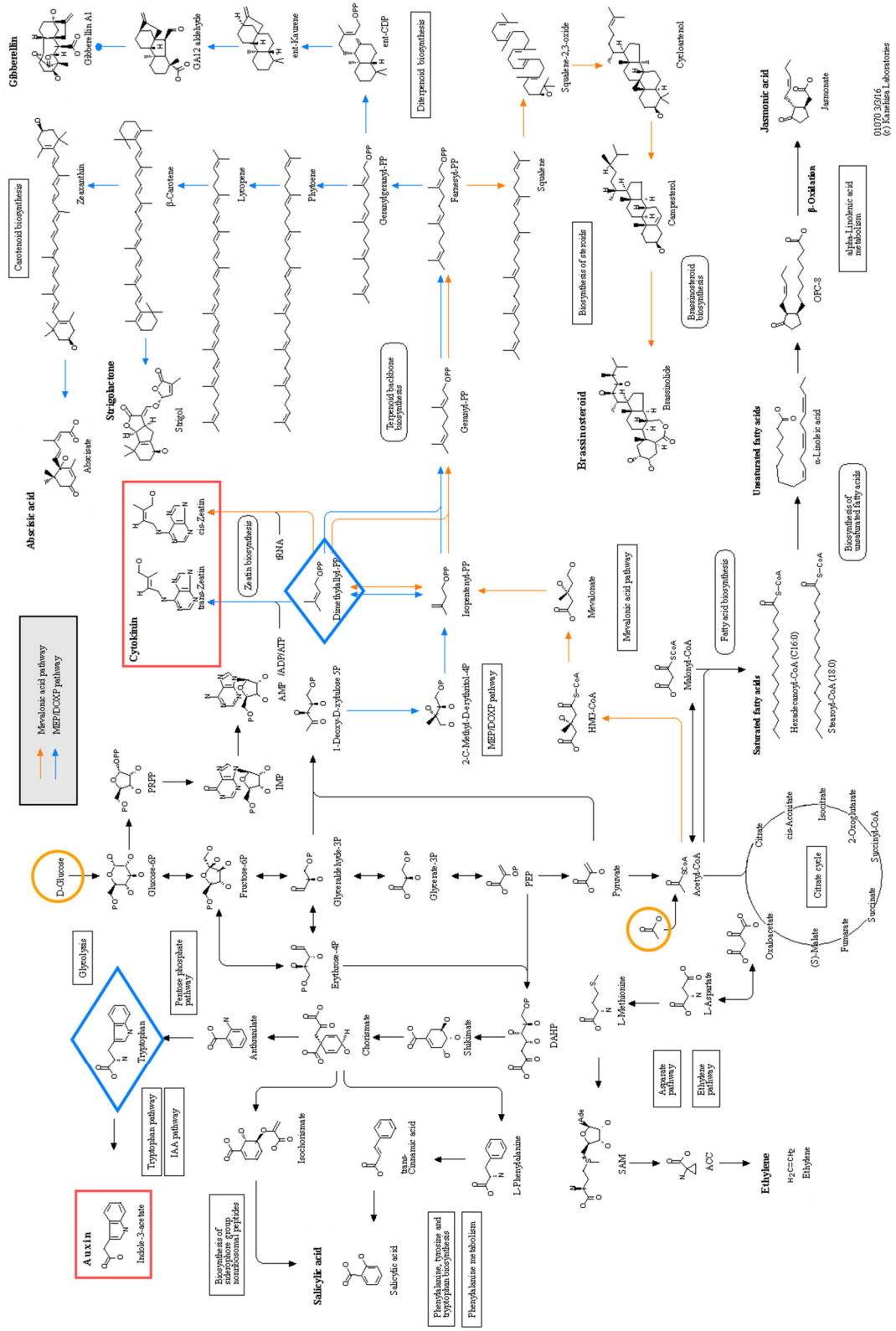


Figure 20 : Voies des biosynthèses végétales des phytohormones pour le marquage isotopique

Carte KEGG de la biosynthèse des phytohormones par les plantes, où sont représentées les hormones d'intérêt (carrés rouges), les sources de carbones marquées utilisées (ronds jaunes) et les sources de carbones suggérées, plus proches précurseurs métaboliques des cibles (losanges bleus).

Issu de genome.jp/kegg/ - Kanehisa Laboratories

continuer nos efforts avec cette stratégie expérimentale. Plusieurs améliorations et expériences complémentaires restent à réaliser. Nous pourrions envisager d'autres concentrations de substrats, d'autres temps de germination, l'utilisation de plus grandes quantités de spores, etc, afin de pouvoir conclure quant à la capacité de *R. irregularis* de produire ou non des hormones végétales.

2.2 - Perspectives des expériences de marquage

2.2.1 - Choix des sources de marquage

La réussite de ces expériences dépend principalement de la source de marquage utilisée. Nous avons choisi d'utiliser exclusivement un marquage au carbone 13 afin de simplifier la quantité d'isotopologues potentiellement synthétisés, mais nous aurions pu également ajouter un précurseur marqué à l'azote 15 pour observer une cytokinine ou une auxine marquées. Le KNO_3 est un des éléments minéraux composant le milieu M, et sert de source d'azote pour le champignon. Son assimilation par les spores sera surement plus importante que celle de l'acétate ou du glucose. De plus, le marquage ^{15}N ne sera pas dilué par la mobilisation des réserves lipidiques stimulée par le GR24. Enfin, le KNO_3 ^{15}N est disponible à des prix raisonnables, rendant son utilisation expérimentale accessible.

En plus du glucose et de l'acétate déjà utilisés, le CO_2 marqué au ^{13}C constitue également une source de carbone envisageable afin de mettre en évidence la biosynthèse des phytohormones par *R. irregularis*. En effet, le CO_2 est assimilable par les spores de *R. irregularis* (Bago *et al.*, 1999) à travers le processus de « dark-fixation ». Cette assimilation ne représente pas un gain net de carbone pour le champignon, mais est exploitable pour optimiser l'incorporation d'isotopes dans nos expériences de marquage. De plus, la germination des spores est déjà réalisée dans une atmosphère enrichie en CO_2 pour favoriser le développement du champignon (Bécard and Piché, 1989*a*). Bien que l'utilisation de gaz s'avère techniquement plus compliquée que celle de substrat hydrosoluble, il serait intéressant d'utiliser du $^{13}CO_2$ comme troisième source complémentaire de marquage, en le diffusant dans l'étuve.

Nous avons choisi d'utiliser comme précurseurs métaboliques du glucose et de l'acétate $U^{13}C$. Ceux-ci sont commercialement disponibles, peu couteux et peu contraignants à manipuler et leur assimilation par des spores en germination a déjà été

démontrée (Bücking *et al.*, 2008). Cependant, le glucose et l'acétate vont être incorporés en tant que métabolites clés du métabolisme primaire, et le marquage risque d'être dilué par la multitude de réaction dans lesquelles ils sont impliqués, avant même d'atteindre l'IAA et l'iPR. Si les phytohormones détectées sont bel et bien synthétisées par le champignon, on peut s'attendre à ce que leurs voies de biosynthèse respectives ne soient pas sollicitées en priorité, par exemple face à la biosynthèse de chitine lors de la germination des spores. Afin de palier à ce défaut, il est envisageable d'utiliser des précurseurs métaboliquement plus proches de nos hormones d'intérêt. Par exemple, le tryptophane ou l'acide shikimique marqués ^{13}C seraient les candidats idéaux pour mettre en évidence la biosynthèse de l'IAA par *R. irregularis*, et le diméthylallyl-pyrophosphate ^{13}C pour la biosynthèse de cytokinines (Figure 20). Toutefois, il convient de vérifier au préalable que ces molécules, non marquées, sont assimilables par les spores en germination et n'ont pas d'effets inhibiteurs sur la germination. En effet, le prix élevé de ces substrats marqués est un obstacle qui justifie leur utilisation en dernier recours, si les futures expériences de marquage à l'aide d'acétate, de glucose et éventuellement de CO_2, restent infructueuses.

2.2.2 - *Validation de l'internalisation du marquage*

Bien que nous ayons pu confirmer une faible internalisation du marquage par les spores, il serait intéressant de réaliser des cinétiques d'assimilation des substrats, avec des précurseurs non marqués, avant de poursuivre les futurs essais de marquage.

Nous avons réalisé nos premières expériences en utilisant les concentrations maximales d'acétate et de glucose pour, d'une part favoriser leur assimilation, et d'autre part nous assurer que ces sources de carbone soient toujours disponibles tout au long de la germination des spores, sans pour autant présenter une toxicité pour le champignon. En revanche, une grande quantité de substrat est surement gaspillée, et si nous envisageons de réaliser ces expériences à plus grande échelle (en utilisant par exemple 250 000 spores germées), il sera indispensable d'ajuster au mieux la concentration en précurseurs métaboliques marqués. Nous pouvons imaginer réaliser un suivi par RMN de la concentration des précurseurs dans le milieu au cours du temps. Ainsi, nous pourrons déterminer la dose minimale à ajouter pour s'assurer d'une disponibilité constante en substrat marqué, tout en réalisant des économies substantielles. Enfin, ce

genre de suivi s'avèrera indispensable lorsque nous changerons de source de marquage pour utiliser des précurseurs métaboliquement plus proches de nos phytohormones d'intérêt. Nous pourrons ainsi nous assurer de leur assimilation mais aussi des concentrations minimales requises avant d'utiliser leurs équivalents marqués, autrement plus chers que l'acétate et glucose $U^{13}C$.

2.2.3 - Vers l'établissement d'une carte de réseaux métaboliques ?

Lors de nos expériences, nous n'avons pas été capables d'identifier de phytohormones marquées. Le choix des précurseurs, leur faible assimilation, la dilution du marquage et sa redistribution dans le métabolisme primaire, la grande « distance métabolique », la durée de traitement ou encore la quantité de matériel biologique utilisée ont probablement impacté sur l'absence de détection d'iPR ou IAA marquées.

Pour dé-complexifier le problème auquel nous faisons face, nous pourrions revisiter les expériences déjà réalisées, non pas en cherchant des hormones marquées directement, mais en suivant l'incorporation du marquage au sein du métabolisme. Par exemple dans le cas du glucose, nous pourrions suivre son internalisation et son assimilation dans la glycolyse et la voie des pentoses phosphates, en cherchant les isotopologues des intermédiaires réactionnels. Il en va de même pour le suivi de l'acétate au sein du cycle de Krebs. Nous pourrions alors identifier les étapes limitantes, et affiner la préparation des échantillons. Ainsi, en suivant progressivement la dissémination du marquage, si nous arrivions à mettre en évidence la biosynthèse de précurseurs clés marqués, tels que le tryptophane, le DMAPP, l'adénine ou le ribose, sans pour autant identifier d'hormones marquées, nous serions alors en mesure de conclure que *R. irregularis* ne produit probablement pas d'hormones végétales, à condition bien entendu que *R. irregularis* utilise les voies de biosynthèses habituelles et non des voies encore inconnues. Cette approche reviendra à établir une carte métabolique partielle aboutissant ou non à la biosynthèse des cytokinines et/ou de l'auxine par les spores de *R. irregularis*. Toutefois, ceci requiert un investissement de temps bien supérieur à celui envisagé initialement, ainsi que des compétences et appareillages non disponibles au laboratoire, mais accessibles sur la plateforme MetaToul, et plus particulièrement grâce à son plateau « réseaux métaboliques ».

- Chapitre 3 -
Recherche des effets des cytokinines et de l'éthylène sur la biologie du champignon

Préambule

Les effets des hormones végétales sur des champignons peuvent être mesurés de diverses manières. Elles peuvent induire ou inhiber la germination des spores ou la croissance des hyphes et leur ramification. La perception d'une hormone et son impact peuvent être évalués au niveau transcriptomique, protéomique, métabolomique. L'identification de gènes différentiellement exprimés permet de déterminer quelles fonctions moléculaires sont alors régulées. Enfin, chez les CMAs, la capacité des spores à coloniser plus ou moins rapidement une racine hôte constitue également un marqueur pouvant indiquer l'effet d'une hormone sur la biologie du champignon.

Nous avons choisi d'étudier en priorité l'impact de l'éthylène et des cytokinines. Comme présenté durant le chapitre 1, nous avons détecté ces deux hormones dans des échantillons fongiques, ainsi qu'une gibbérelline et une auxine. Parmi ces quatre hormones, seuls l'éthylène et les CKs ont un récepteur putatif identifié chez *R. irregularis*, elles ont donc plus de chance d'être perçues, et d'induire un effet biologique observable.

Cependant, le rôle des hormones dans la symbiose mycorhizienne est déjà relativement bien documenté (en fonction des familles hormonales). De plus, l'ajout exogène de ces hormones sur la plante hôte pendant l'interaction déclenchera des effets sur le développement du champignon, qui seront difficiles à extrapoler. En effet, en présence des deux organismes, il sera impossible de déterminer si l'effet de l'hormone sur le champignon n'est pas dû à une perception par la plante, qui aura altéré son interaction avec le champignon, modifiant ainsi son métabolisme et son développement. Nous nous sommes donc assurés de ne traiter que le champignon durant nos expériences, afin de pouvoir observer un effet direct sur sa biologie.

Résultats et discussion

1 - Effet des hormones perçues par *R. irregularis* sur la mycorhization

Afin d'observer l'effet des hormones sur le champignon, et non l'effet combiné sur les deux partenaires, nous sommes contraints de traiter les spores avant d'inoculer la plante, puis de mesurer l'impact du traitement sur la mycorhization. Ces expériences de prétraitement de spores apportent des limitations lors de la mise en place de la symbiose. Pour une expérience de mycorhize habituelle, une graine germée est plantée dans un pot contenant des spores mélangées au substrat. Dans ce type de protocole, plusieurs jours sont nécessaires aux spores pour germer et à la racine pour explorer le contenu du pot. Si nous utilisions ce système, nous prenions alors le risque que l'effet du prétraitement des spores ne s'estompe dans les premiers jours de la mise en culture. Nous avons donc testé différents systèmes expérimentaux nous permettant de traiter les spores indépendamment de la plante et réduire le temps nécessaire à l'établissement de la symbiose. L'objectif était de tester ces approches avec les différentes hormones identifiées, nous avons choisi de commencer par observer l'effet de l'éthylène.

1.1 - Expériences réalisées

1.1.1 - Prétraitement des spores

Nous avons utilisé des quantités variables de spores durant nos différentes expériences, de 150 à 1000 spores par système racinaire. Les spores de *R. irregularis* ont été prétraitées avec de l'éthylène ou un inhibiteur de la perception de l'éthylène, le MCP. Pour cela, elles ont été incubées dans du milieu M liquide, dans un contenant refermé hermétiquement afin de garder une concentration stable de gaz. Nous avons ensuite injecté de l'éthylène ou du MCP afin d'atteindre une concentration de 10 ppm dans l'espace de tête. Les spores ont ensuite été mises à germer à l'abri de la lumière, à 30 °C pendant quatre jours. Les tubes ont été ventilés pour éliminer toute trace d'éthylène ou MCP, puis les spores traitées ont été mises en contact avec une plante hôte, *Medicago truncatula*.

1.1.2 - Préparation de la plante hôte et systèmes de co-inoculation

Pour étudier la capacité mycorhizienne du champignon, tant que les effets du prétraitement sont encore actifs, nous avions pour objectif de forcer la rencontre entre les hyphes germinatifs et les racines. Ainsi nous pouvions espérer observer une éventuelle différence de mycorhization en quelques jours seulement de co-inoculation. Nous avons imaginé et testé quatre systèmes différents nous permettant d'aboutir à une inoculation simple de la plante, et une colonisation rapide des racines.

Notre premier système a consisté à faire pousser la plante hôte dans une membrane perméable à l'eau et aux minéraux, elle-même enfouie dans le substrat (Figure 21A). Ceci permettait un bon développement des racines, et nous pouvions ainsi facilement déterrer la jeune plante après sept jours de développement, venir déposer les spores directement au contact des racines, et replanter l'ensemble dans le substrat sans pour autant endommager le système racinaire. Toutefois, les spores ont eu tendance à sédimenter au fond de la membrane, créant une zone hautement mycorhizée, alors que le reste du système racinaire se retrouvait vide de toute trace de colonisation. Une variante a consisté à coucher le pot à l'horizontale, une fois l'inoculation réalisée. Bien que la mycorhization ait été plus homogène, nous avons essayé de nouvelles méthodes nécessitant moins de substrat et de travail de préparation des membranes.

Les deuxième et troisième systèmes ont consisté à faire pousser les plantes mycorhizées dans des tubes type « Falcon ». Les tubes sont coupés à mi-hauteur, bouchés et retournés pour accueillir le substrat (Figure 21B). Ce système permet d'obtenir une bonne proximité entre les spores et les racines pour favoriser l'établissement de la symbiose, mais les plantes sont difficilement déterrables sans abimer les racines pour y déposer les spores à leur contact. Les spores doivent alors être ajoutées directement au substrat avant de planter les graines de *M. truncatula* fraichement germées. Les racines ont alors besoin de temps pour se développer convenablement avant d'accueillir le champignon, allongeant le temps d'incubation. Alternativement, les spores peuvent être déposées dans le bouchon après avoir laissé une semaine aux plantules pour se développer, mais ceci concentre une nouvelle fois les points d'infection dans une seule et unique zone racinaire. Enfin, dans ces deux systèmes, il est difficile de contrôler un arrosage optimum, introduisant une variabilité supplémentaire. Une variante a alors été utilisée : les tubes « Falcon » ont été percés et insérés dans un pot servant de réserve pour

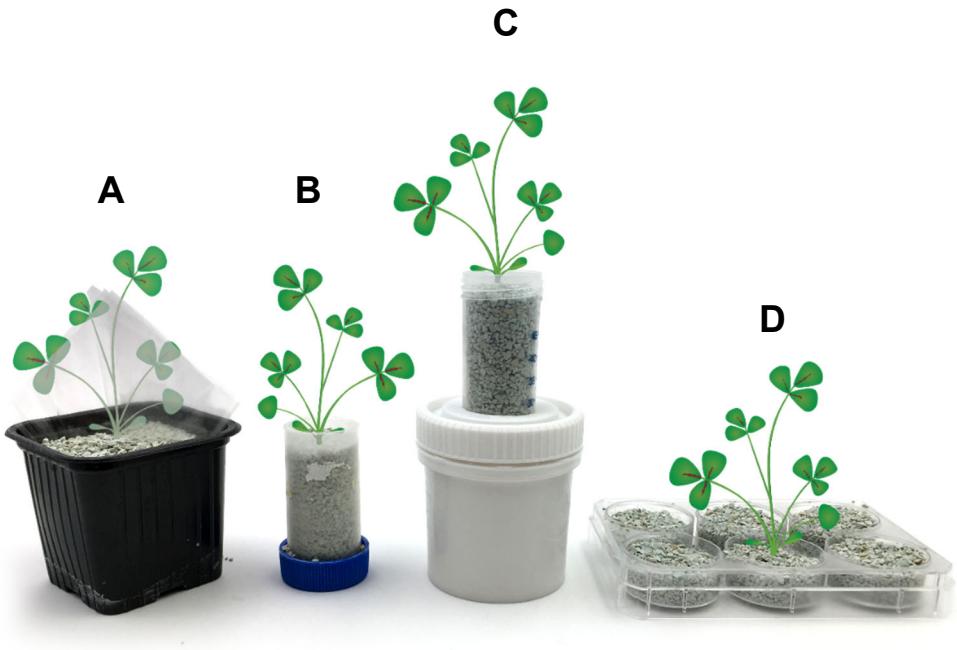


Figure 21 : Différents systèmes de mycorhization de plantes *in vitro*

(A) Système de mycorhization entre deux membranes perméables. Les racines de la plantule de *M. truncatula* et les spores sont contenues dans une membrane d'hydrate de cellulose pour favoriser leur rencontre. **(B)** Système de mycorhization en tube Falcon coupé et retourné, les spores sont déposées dans le bouchon, tandis que la plantule est plantée dans le substrat par le dessus. **(C)** Système de mycorhization en tube Falcon avec réserve de solution nutritive. Les spores sont mélangées au substrat avant de planter les graines germées. **(D)** Système de mycorhization en plaque 6 puits. Les spores sont déposées au fond des puits, avant d'y déposer le substrat et une jeune plantule de *M. truncatula*.

la solution d'arrosage (Figure 21C). Ceci permet une humidification constante et homogène du substrat, mais l'inoculation des spores reste délicate.

Le quatrième et dernier système testé a consisté à planter les graines de *M. truncatula* dans des boites six puits (Figure 21D). Les plantules de *M. truncatula* ont été mises en culture sept jours avant l'inoculation, dans de la zéolite, dans ces boites. L'arrosage a été réalisé avec une solution nutritive pauvre en phosphate. Ce système permet d'avoir un système racinaire déjà établi lorsque les spores traitées sont inoculées. De plus, le faible volume des puits permet d'optimiser le contact entre les racines et les spores germées prétraitées. Une fois la période de pré-germination achevée, les spores ont été déposées au fond de nouvelles boites 6 puits, et les plantules ont été rempotées par-dessus, avec leur substrat. Nous avons inoculé chaque plante avec 150 spores et laissé la symbiose s'établir durant deux semaines puis les taux de mycorhization ont été réalisés.

1.1.3 - Détermination du taux de mycorhization

Suite à ces différents essais, les systèmes racinaires ont été récoltés et les structures fongiques révélées par coloration à l'encre de Schaeffer (Vierheilig *et al.*, 1998). Les évènements de mycorhization ont été dénombrés à la loupe binoculaire, en observant l'entièreté de chaque système racinaire. Afin d'apporter un degré de précision supplémentaire à nos observations, nous avons classé ces évènements de mycorhization en quatre niveaux, en fonction de l'état d'avancement de l'établissement des structures fongiques (Figure 22A). Le premier niveau correspond à l'observation d'un point d'infection et d'hyphes intra-racinaires mais sans développement d'arbuscule. Le niveau 2 correspond à l'observation d'un point d'infection accompagné d'un seul arbuscule. Le niveau 3 correspond à l'observation de 2, jusqu'à 10 arbuscules issus d'un même point d'infection. Enfin, le niveau 4 correspond à une zone mycorhizée contenant 10 arbuscules ou plus, issus d'un même évènement de colonisation.

1.2 - Résultats obtenus

Nous n'avons pas observé de différence de mycorhization entre les plantes inoculées avec des spores traitées au MCP, à l'éthylène ou les spores non traitées quels que soient les systèmes de co cultures utilisés. Par exemple, le 4ème système testé (boites 6 puits), dans chacune de ces trois conditions, nous avons observé au total entre 15 et 20

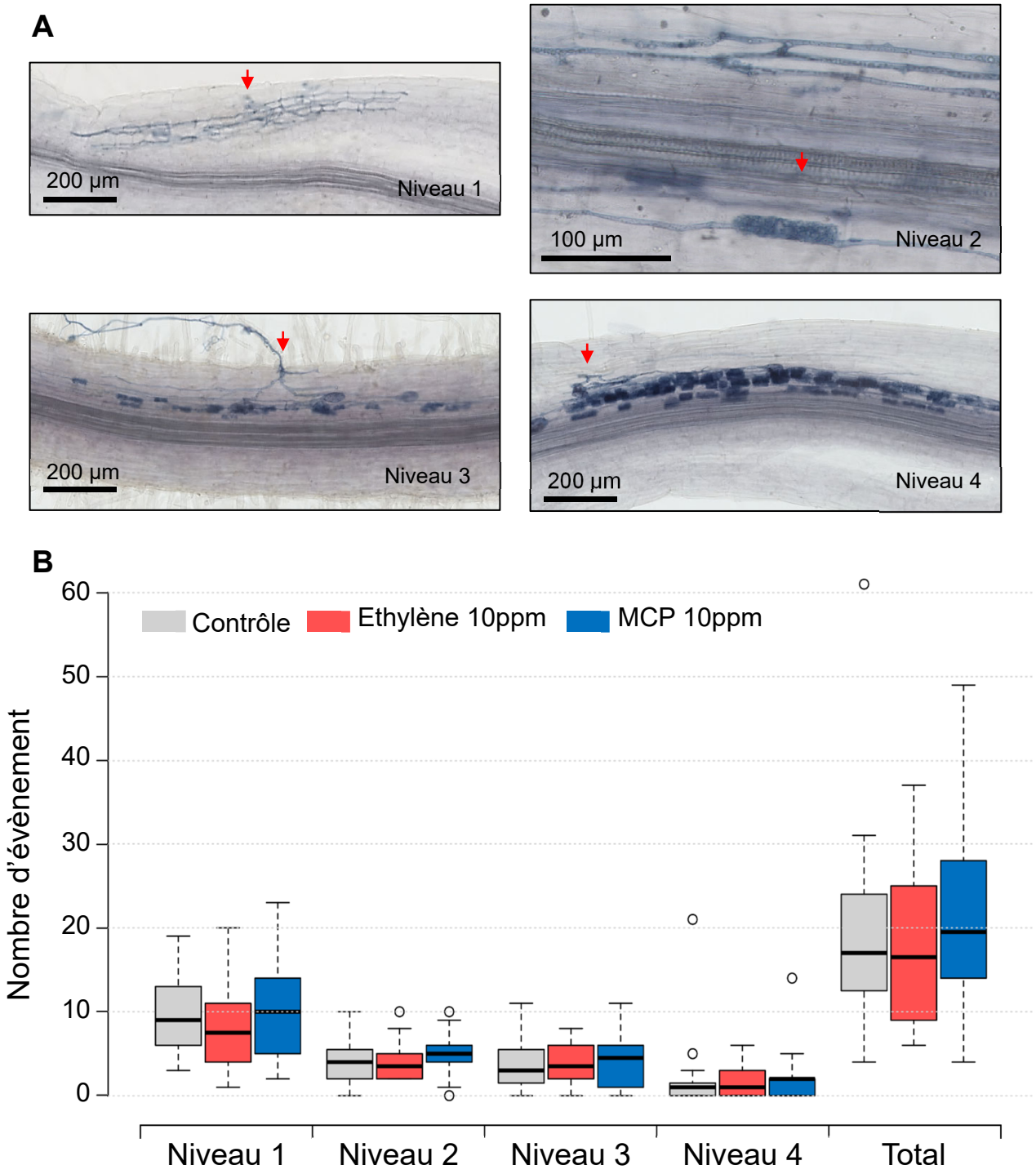


Figure 22 : Effet du prétraitement à l'éthylène ou au MCP des spores de *R. irregularis* sur la colonisation des racines de *M. truncatula*

(A) Différents stades de colonisation des racines observés et dénombrés à la loupe binoculaire après coloration des structures fongiques à l'encre de Shaeffer. **(B)** Effet de l'éthylène ou du 1-méthylcyclopropène (MCP) sur la mycorhization. Les plantules sont inoculées 15 jours avec 150 spores de *R. irregularis* traitées 4 jours, ou non, avec 10 ppm d'éthylène ou de MCP. L'ensemble des événements a été comptabilisé dans chaque système racinaire (n=20).

évènements de mycorhization. La majeure partie de ces évènements correspondent à des stades précoces de colonisation (niveau 1), mais quelques évènements plus tardifs (niveau 2 et plus) ont tout de même été observés. Cependant, aucun retard ou avance de mycorhization n'a été observé entre les différents traitements (Figure 22B). Nous avons donc conclu que, aux concentrations et temps de traitement étudiés, l'éthylène n'a eu aucun effet sur la capacité du champignon à établir les structures symbiotiques avec la plante hôte.

1.3 - Discussion

Nous avons utilisé des quantités variables de spores pré traitées durant nos différentes expériences. Initialement, nous avions choisi d'inoculer chaque plante avec 1000 spores pour nous assurer d'observer un taux de mycorhization satisfaisant avec un temps d'incubation très court. Cependant, une quantité trop élevée de spores écrase éventuellement les effets observables dus aux traitements. Nous avons donc finalement choisi d'utiliser 150 spores par système racinaire. En réduisant encore plus la quantité de spores, nous risquons de ne plus observer assez d'évènements de mycorhization pour pouvoir ensuite comparer les différents traitements.

Les concentrations utilisées lors des traitements éthylène et MCP sont volontairement élevées. Ces molécules sont faiblement hydrosolubles, et nous voulions nous assurer que les récepteurs putatifs du champignon étaient saturés avant l'inoculation, pour espérer observer une éventuelle latence ou avance de colonisation par rapport au contrôle. Etant donné que ni l'éthylène, ni le MCP n'ont permis d'observer un effet sur la quantité ou la vitesse de mycorhization, nous pouvons nous demander si les traitements ont atteint les spores. Nous pourrions envisager d'agiter les tubes lors du pré traitement. Cette agitation doit être suffisante pour que les traitements gazeux atteignent les spores mais relativement faible pour ne pas perturber la germination, c'est-à-dire casser les hyphes en formation, qui sont très fragiles.

Le prétraitement implique également que ces effets soient suffisamment intenses et stables pour perdurer pendant toute la durée de mycorhization. En effet, après l'inoculation avec la plante hôte, les spores ne sont plus exposées à ces gaz, et si les effets induits s'estompent trop rapidement, ils risquent de ne plus être visibles au bout du temps nécessaire à l'établissement de la symbiose.

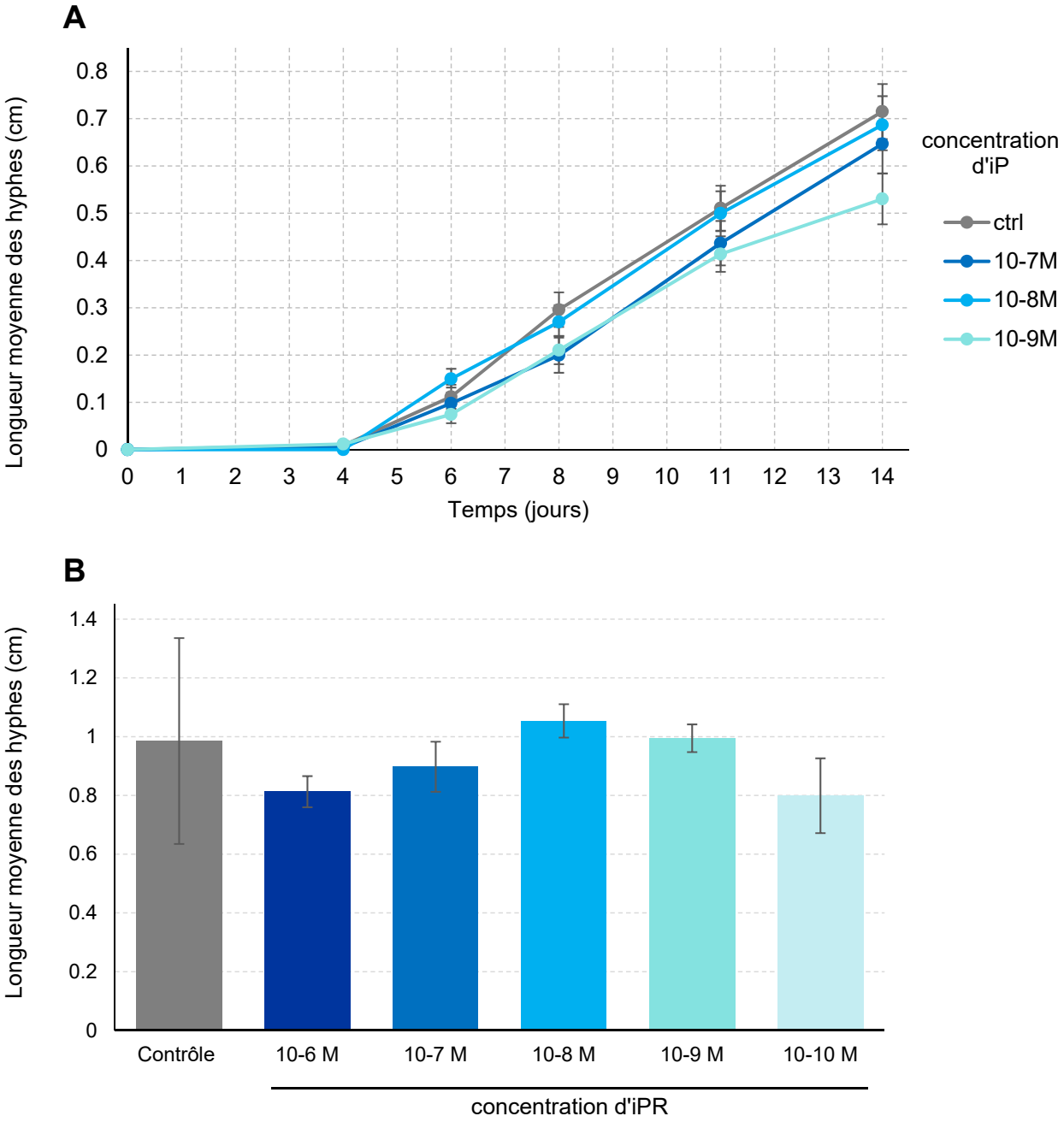


Figure 23 : Effets de l'iP et de l'iPR sur l'élongation des hyphes lors de la germination des spores de *R. irregularis*

(A) Cinétique de croissance des hyphes de *R. irregularis* après germination des spores, traitées ou non avec différentes concentrations d'iP (n= 40, barre d'erreur = écart type). **(B)** Longueur moyenne des hyphes de *R. irregularis* après 14 jours de germination et de traitement ou non avec différentes concentrations d'iPR (n= 40, barre d'erreur = écart type).

Enfin, ce système de mycorhization pourra être bien évidement appliqué pour tester les effets d'autres hormones, telles que les cytokinines ou l'auxine.

2 - Effet des hormones sur la germination de *R. irregularis*

Nous avons souhaité étudier si les hormones exsudées par le champignon pouvaient jouer un rôle régulateur sur la germination de ses spores ou encore moduler la croissance ou la ramification de ses hyphes. Nous avons commencé à évaluer l'effet de cytokinines, mais également de l'éthylène, sur ces critères développementaux. Ces approches, toujours en développement au sein de l'équipe, ne permettant pas un criblage haut débit de grandes quantités de composés.

2.1 - Expériences et résultats obtenus avec des traitements des champignons aux cytokinines

2.1.1 - Manipulations et résultats

Les spores de *R. irregularis* ont été mises à germer sur du milieu M gélifié, traité ou non avec trois concentrations différentes en iP (10^{-9} M, 10^{-8} M et 10^{-7} M), ou cinq concentrations différentes d'iPR (10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M et 10^{-6} M). Entre 2 et 8 spores ont été déposées dans des puits initialement moulés dans la gélose, et laissées à germer jusqu'à 14 jours. Tous les deux à trois jours, la longueur des hyphes a été mesurée sous la loupe binoculaire et ainsi, une cinétique de germination a été réalisée. Il est important de noter qu'ici, la longueur des hyphes est mesurée manuellement. La croissance de l'hyphe germinatif à chaque point de cinétique est marquée au dos de la boîte de Petri au marqueur, puis, à la fin de la période de germination, la boîte est scannée, et la longueur de chaque segment est mesurée à l'aide du logiciel Image J.

Après 14 jours de germination, la longueur totale des hyphes est similaire entre les conditions contrôle et traitées avec l'iP, ils grandissent au même rythme au cours de l'expérience (Figure 23A). De plus, nous n'avons pas observé de différence particulière indépendante de la longueur des hyphes, telle qu'une augmentation ou diminution de la ramification, ou autre altération morphologique. Nous avons donc conclu que, à ces concentrations, l'iP n'avait pas d'effet significatif sur la germination des spores et le

développement des hyphes. De la même manière, la croissance totale des hyphes produits par les spores à 14 jours a été mesurée pour les traitements iPR, et aucune différence significative n'a été observée entre les différentes concentrations (Figure 23B).

2.1.2 - Discussion

Dans cette première expérience, nous avons choisi d'utiliser de l'iP pour traiter nos spores. Nous avons précédemment démontré que *R. irregularis* est capable d'exsuder de l'iPR, mais chez les plantes, l'affinité des récepteurs est plus forte pour les cytokinines sous leur forme libre (Yamada *et al.*, 2001), tandis que les formes ribosylées sont généralement associées à des formes de transports (Takei *et al.*, 2001). Afin d'observer un effet de ces hormones, nous avons donc choisi d'utiliser deux cytokinines différentes : l'iP, forme « active » libre de la CK exsudée par *R. irregularis*, mais également l'iPR, forme exsudée par les spores durant la germination.

Afin d'évaluer l'effet des cytokinines sur la croissance des hyphes germinatifs, il serait plus approprié de privilégier des traitements combinant des mélanges de cytokinines, plutôt que maintenir des approches molécule par molécule. Ainsi, en traitant les spores avec des mélanges de cytokinines, nous pourrons envisager de tester une plus large gamme de concentrations. Dans un second temps, nous pourrons réduire le nombre de cytokinines par mélange, et identifier les formes les plus actives.

2.2 - Manipulations et résultats obtenus avec des traitements des champignons à l'éthylène ou au MCP

2.2.1 - Manipulation et résultats

Pour les approches concernant l'éthylène, nous avons choisi de traiter les spores avec de l'éthylène ou du MCP. Ces deux molécules sont de nature gazeuse, et nos conditions expérimentales ont rendu difficile l'obtention de traitements homogènes et reproductibles avec ces composés.

Afin de traiter chaque boîte individuellement avec des concentrations variables en éthylène ou en MCP (0.1, 1 ou 10 ppm), nous avons percé les couvercles des boîtes de Petri à l'emporte-pièce, pour y loger un septum en caoutchouc. Les boîtes ont ensuite été scellées avec du film alimentaire, imperméable aux gaz, puis avec une couche supplémentaire de parafilm. Ainsi, nous pouvions injecter une concentration précise d'un

de nos deux gaz d'intérêt. Toutefois, l'étanchéité des boîtes n'a pas pu être totalement maitrisée et nous avons pu observer des fuites au cours du temps. Deux jours après l'injection, nous avons observé des pertes de 50 jusqu'à 100% de la concentration initiale en éthylène. A l'issue des 21 jours de mesure, nous n'avons pas observé de différences entre les traitements. L'ensemble de ces contraintes nous a forcé à renoncer à caractériser l'effet de l'éthylène sur les spores.

2.2.2 - Discussion

Afin de s'assurer que le traitement était homogène, nous aurions dû ventiler chaque jour toutes les boîtes, avant de réinjecter les concentrations d'éthylène ou de MCP souhaitées. Alternativement, nous aurions pu utiliser plusieurs étuves ou enceintes confinées afin de maintenir une concentration stable pour l'ensemble des boîtes d'une même condition. Ceci nécessite toutefois de se procurer autant d'enceinte que de molécules et de concentrations à tester, et impose de réinjecter une grande quantité de gaz après chaque observation des boîtes durant la germination, car il était nécessaire de les sortir des enceintes pour les observer sous la loupe binoculaire.

Pour finir, les méthodes de mesures de croissance des hyphes n'étaient à l'époque pas encore développées. Le suivi a été effectué par prise d'image de chaque dépôt de spores au cours du temps, à la loupe binoculaire. Or, la résolution des appareils disponibles n'était pas satisfaisante pour mesurer efficacement la longueur des hyphes. Aujourd'hui, les méthodes et appareillages à notre disposition (décrit ci-après) sont plus performants, nous pouvons envisager de reproduire ces expériences, si nous parvenons à trouver un moyen efficace de confiner les spores en germination pendant les traitements à l'éthylène et au MCP.

2.3 - Optimisations des mesures des phénotypes de germination des champignons

Au cours de ma thèse, j'ai contribué à faire évoluer les approches, utilisées par plusieurs membres de l'équipe, pour observer et mesurer les effets d'une molécule sur la germination de *R. irregularis*.

Nombre de spores à déposer

Nous avons pu observer qu'une quantité croissante de spores déposées dans une même zone d'observation pouvait induire un effet synergique de germination. De plus, au-delà d'un certain nombre de spores il est difficile de mesurer de façon exhaustive la croissance de tous les hyphes germinatifs. Si certains expérimentateurs choisissent de déposer jusqu'à 30 spores par zones d'observation pour observer une moyenne de l'effet du traitement, nous avons choisi de déposer un nombre plus restreint (<10 spores) pour suivre individuellement la germination de chaque spore.

Goute vs puits vs inclusion dans la gélose

Pour observer la germination, les spores peuvent être déposées dans des puits formés dans la gélose. Ceux-ci sont moulés à l'aide d'emporte-pièces, en coulant le milieu en surfusion dans les boîtes de Petri. Les hyphes germinatifs nouvellement formés se développent dans la gélose et se distinguent facilement des hyphes porteurs. Cette méthode demande peu de préparation initiale, mais lors de la prise d'image au microscope, les puits induisent des artéfacts lumineux qui viennent perturber par la suite la mesure des longueurs d'hyphes. Pour obtenir des images moins bruitées, il est préférable de former les puits d'un diamètre plus faible, en aspirant la gélose solidifiée à la pipette pasteur.

Afin d'améliorer la prise d'image au microscope, les spores peuvent soit être déposées à la surface de la gélose, soit être ajoutées dans le milieu encore en surfusion, avant qu'il soit coulé dans les boîtes de Petri. Ces stratégies permettent de continuer de mesurer la croissance de façon manuelle et indirecte, ou alors de manière automatisée en utilisant un nouveau microscope à notre disposition.

Mesure manuelle vs mesure automatique

Le plus gros challenge de l'analyse des phénotypes de germination des spores de *R. irregularis* repose sur la finesse et la rapidité de mesure de la croissance des hyphes et les méthodes de mesure sont continuellement en développement dans l'équipe.

Le tracé au marqueur des hyphes sous la loupe binoculaire puis la mesure de chaque segment à l'aide d'un logiciel de retraitement d'image est non exhaustive, et ne permet d'obtenir qu'une estimation de la longueur moyenne totale au cours du temps.

Grace à l'acquisition récente d'un nouveau modèle de microscope par la plateforme d'imagerie rattachée à la fédération de recherche -dont le laboratoire est membre- le microscope Keyence VHX-7000, nous avons à notre disposition un outil permettant la prise d'image des spores en germination, de qualité suffisamment élevée pour nous permettre de quantifier par la suite la croissance des hyphes et d'observer des phénotypes plus subtils qu'avec une loupe binoculaire traditionnelle. Cependant, l'acquisition des données et le traitement des images enregistrées nécessitent de nouveaux ajustements dans les préparations des essais. Une fois la prise d'image et le traitement des données automatisés, le microscope Keyence pourrait permettre une meilleure précision et rapidité de mesure pour caractériser l'effet d'hormones, ou d'autres molécules, sur la germination des champignons mycorhiziens.

3 - Effet sur la transcription des gènes

Pour finir, nous avons essayé d'observer les effets de traitements à l'éthylène ou aux cytokinines sur les champignons à une échelle moléculaire. Nous avons réalisé des analyses RNAseq pour voir quels gènes étaient différentiellement exprimés en réponse à ces hormones. Deux expériences indépendantes ont été menées.

3.1 - Résultats

Afin d'observer la réponse transcriptomique des spores en germination, après un traitement éthylène, nous avons fait pré-germer 40 000 spores pendant 4 jours dans du milieu M liquide. Les tubes contenant les spores ont été scellés hermétiquement et nous avons injecté de l'éthylène dans chaque tube pour obtenir une concentration finale dans l'espace de tête de 10 ou 0,1 ppm. Une condition contrôle, sans ajout d'éthylène, a également été réalisée. Après une exposition de 2 h à ces traitements, afin d'identifier des évènements de régulation transcriptionnels précoces, les spores ont été collectées et immédiatement congelées. Les ARN ont été extraits, puis séquencés par l'entreprise

RIR gene id	NCBI protein id	Annotation	Ethylène 10ppm Moyenne du nombre de "read"	Mock Moyenne du nombre de "read"	log2 FoldChange	pValue ajustée
RIR_0474800	GBC16668.1	hypothetical protein	2.041	41.614	-5.003	0.000
RIR_1443600	GBC28557.1	Protein kinase subdomain-containing protein pkl/ ccin9	0.751	11.531	-4.440	0.042
RIR_1714300	GBC31900.1	protein-nucleus import-related protein: PROVISIONAL	1.570	18.470	-4.301	0.012
RIR_3514300	GBC54063.1	F-type H+-transporting ATPase subunit a	24.747	304.252	-3.739	0.000
RIR_3512800	GBC54044.1	plasmid related DNA polymerase	8.894	97.038	-3.729	0.002
RIR_3514700	GBC54067.1	putative cytochrome c oxidase subunit III	8.554	99.503	-3.710	0.003
RIR_3514000	GBC54060.1	maturase-like protein	15.894	191.027	-3.638	-3.638
RIR_3513800	GBC54058.1	cytochrome c oxidase subunit I	8.953	96.616	-3.625	0.000
RIR_3513710	GBC54057.1	Tis13_60028	6.569	63.413	-3.562	0.000
RIR_3513000	GBC54048.1	giy-yig orf	12.117	123.378	-3.498	0.000
RIR_0810900	GBC20780.1	hypothetical protein	1.672	17.254	-3.486	0.015
RIR_3514600	GBC54066.1	NADH dehydrogenase subunit 6	11.454	112.001	-3.426	0.000
RIR_3512700	GBC54043.1	Cytochrome c oxidase subunit 2	33.779	350.287	-3.389	0.000
RIR_3513300	GBC54051.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	43.893	390.591	-3.380	0.000
RIR_2958900	GBC47345.1	prolipoprotein diacylglyceryl transferase	2.183	23.757	-3.368	0.021
RIR_1762200	GBC32514.1	Serine/threonine protein kinase	1.938	18.729	-3.355	0.024
RIR_3513100	GBC54049.1	giy-yig orf	9.796	95.391	-3.334	0.000
RIR_3514500	GBC54065.1	intron-encoded DNA endonuclease ai5 alpha	4.840	51.032	-3.318	0.000
RIR_3514400	GBC54064.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2	17.732	178.952	-3.317	0.000
RIR_3513200	GBC54050.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit 4	16.327	141.850	-3.250	0.000
RIR_3514200	GBC54062.1	hypothetical protein	8.631	78.193	-3.059	0.000
RIR_3512810	GBC54045.1	Tis13_334385	5.604	45.323	-2.871	0.000
RIR_3513600	GBC54054.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	33.619	290.221	-2.862	0.000
RIR_3513400	GBC54052.1	truncated DNA polymerase	13.956	102.281	-2.861	0.000
RIR_1735100	GBC32180.1	hypothetical protein	4.485	28.878	-2.852	0.002
RIR_3513900	GBC54059.1	intron-encoded DNA endonuclease ai4	6.013	46.607	-2.815	0.001
RIR_3513500	GBC54053.1	Ubiquinol-cytochrome c reductase cytochrome b subunit	50.615	375.914	-2.700	0.007
RIR_3514100	GBC54061.1	cytochrome c oxidase subunit 1	48.361	278.654	-2.412	0.000
RIR_0806800	GBC20733.1	Cytochrome P450 monooxygenase	7.420	32.072	-2.219	0.003
RIR_3512700	#N/A	rRNA	123.195	539.276	-2.041	0.000
RIR_3514600	#N/A	rRNA	604.990	2635.602	-2.020	0.000
RIR_0810900	#N/A	rRNA	1068.154	3939.901	-1.880	0.000
RIR_3513000	#N/A	rRNA	1371.205	4606.459	-1.778	0.000
RIR_3513710	#N/A	rRNA	104.770	353.199	-1.634	0.000
RIR_3513800	#N/A	rRNA	153.995	486.511	-1.604	0.000
RIR_3514000	#N/A	rRNA	1185.141	3505.271	-1.569	0.000
RIR_3514700	#N/A	rRNA	105.489	288.362	-1.450	0.002
RIR_3512800	#N/A	rRNA	554.174	1491.126	-1.430	0.000
RIR_3514300	#N/A	rRNA	175.325	454.411	-1.303	0.001
RIR_1714300	#N/A	rRNA	434.536	1091.371	-1.296	0.000
RIR_1443600	#N/A	rRNA	349.927	707.065	-1.040	0.007
RIR_0474800	#N/A	rRNA	2492.064	4845.048	-1.037	0.012

Tableau 1 : Gènes de spores en germination de *R. irregularis* différentiellement exprimés après 2h de traitement à l'éthylène

Les gènes issus de l'ADN mitochondrial sont surlignés en rouge, ceux correspondant à des ARN ribosomiques sont surlignés en gris

Genewiz avec la technologie Ilumina HiSeq. Quatre réplicats de chaque condition ont été analysés.

Nous avons réalisé la même expérience avec les cytokinines, en utilisant une concentration de 10^{-7} M d'iP pour traiter les spores pré-germées. Comme l'iP est une molécule hydrosoluble, les spores ont été mises à germer dans des boîtes de Petri non scellées hermétiquement durant le traitement (comme pour la production de GSE, décrit chapitre 1). Quatre boîtes contenant 10 000 spores traitées ont été rassemblées afin d'obtenir 40 000 spores, constituant ainsi un réplicat biologique. De même que pour l'éthylène, le temps de traitement a duré 2 h, et un groupe contrôle, n'ayant reçu aucun traitement, a été réalisé. Quatre réplicats de chaque condition ont également été analysés.

L'analyse statistique, menée sur les 20 000 gènes exprimés, révèle que, en comparant le traitement de 2 h avec l'iP 10^{-7} M à la condition contrôle sans traitement, aucun gène n'est différentiellement exprimé de manière significative. De même, le traitement de 2 h avec 0.1 ppm d'éthylène n'a induit aucune différence transcriptomique significative. En revanche après 2 h d'exposition à 10 ppm d'éthylène, nous avons pu constater que 42 gènes sont réprimés de manière significative par rapport au contrôle, alors qu'aucun gène n'est induit avec ce traitement.

Parmi ces 42 gènes significativement réprimés (Tableau 1), nous avons identifié un cluster de 21 gènes provenant de l'ADN mitochondrial. Parmi ces gènes, huit codent pour des sous-unités impliquées dans les différents complexes de la phosphorylation oxydative. Cependant, les ARN mitochondriaux ne sont pas censés être poly-adénylés chez les champignons (Chang and Tong, 2012), et seuls les ARN poly-adénylés sont sélectionnés pour être séquencés. Nous avons donc voulu confirmer cette sous-expression, en réalisant des expériences de RTqPCR sur ces mêmes échantillons. En comparant l'expression de ces 8 gènes à celle d'un gène de ménage (GiTEF), nous n'avons pas observé de différences d'expressions significatives. Nous avons donc conclu que les ARN mitochondriaux présents dans nos résultats de RNAseq provenaient d'un artéfact expérimental et ne sont pas différentiellement exprimés par un traitement de 10 ppm d'éthylène. En supprimant ces 21 gènes mitochondriaux de notre liste de candidats sous-exprimés, ainsi que 13 correspondants à des ARN ribosomiques, seuls huit gènes restent alors significativement réprimés. Parmi les huit gènes restant identifiés comme

réprimés, trois codent pour des protéines de fonction inconnue, et cinq codent pour des protéines annotées. Parmi ces derniers, nous retrouvons une cytochrome P450 monooxygenase impliquée dans une grande diversité de voies métaboliques différentes (Schuler and Werck-Reichhart, 2003), une protéine kinase à sous-domaine pkl/ccin9, une protéine supposée d'import nucléaire, une prolipoprotéine diacylglyceryl transferase impliquée dans la formation de lipoprotéine (Sankaran and Wu, 1994), et une sérine-thréonine protéine kinase. Avec l'état de nos connaissances actuelles sur la physiologie des champignons mycorhiziens, nous ne sommes pas capables d'associer ces gènes à un quelconque processus de régulation induit par l'éthylène. Dès lors, nous n'avons pas cherché à confirmer leur répression par RTqPCR.

3.2 - Discussion

Ces différentes expériences de RNAseq n'ont pas permis d'identifier des changements d'expression transcriptomique chez *R. irregularis*, après un traitement de deux heures d'iP à 10^{-7} M ou d'éthylène à 0.1 ppm, et seul huit gènes sont réprimés après un traitement de deux heures d'éthylène à 10 ppm. Avant de conclure que *R. irregularis* ne perçoit pas l'éthylène et les cytokinines, nous pouvons naturellement penser que le choix des molécules utilisées, leur concentration, ou la durée des traitements sont à revoir.

Dans le cas des cytokinines, nous avons fait le choix d'utiliser l'iP, la forme active de la cytokinine chez les plantes, et non l'iPR exsudée par les spores. Comme discuté précédemment, il se peut que la perception des cytokinines chez les champignons endomycorhiziens ne soit pas induite par les formes libres non ribosylées. De plus, sept familles de CKs ont été décrites. Avant de reproduire ces couteuses expériences, il serait préférable d'identifier au préalable l'effet morphologique des cytokinines sur les champignons, afin de choisir la condition expérimentale optimale pour identifier des gènes différentiellement exprimés. La concentration de 10^{-7} M utilisée lors de cette première expérience est relativement élevée. Toutefois, il a été montré que les spores étaient capables de répondre à des concentrations de l'ordre de $3x10^{-8}$ M de GR24 (Besserer *et al.*, 2006), il ne serait donc pas aberrant que le récepteur des CKs ait une affinité similaire. Cependant nous ne pouvons pas exclure que ce dernier ait une affinité plus faible que celui des strigolactones, et nous pourrions également envisager de traiter les spores avec des concentrations plus élevées.

Dans le cas de l'éthylène, le choix des molécules à tester est réduit. Nous avions envisagé de traiter les spores avec du MCP, l'inhibiteur des récepteurs d'éthylène, mais nous n'avons pas pu réaliser ce traitement pas manque de moyens. En revanche, les concentrations utilisées pour traiter les spores étaient sûrement trop faibles. Nous avions utilisé des concentrations choisies habituellement pour ce genre d'expérience sur divers micro-organismes (Dimasi-Theriou *et al.*, 1993; Le Henry *et al.*, 2017), mais sans réel succès. La solubilité de l'éthylène dans l'eau est faible (environ 0.131 g/L) et il se peut que les spores aient été exposées à une concentration bien inférieure à celle de l'espace de tête. Si nous traitions nos spores avec 100 ppm d'éthylène, nous pourrions espérer augmenter la concentration d'éthylène dissoute dans l'eau et nous serions peut-être en mesure d'induire la répression d'un nombre plus important de gènes. Nous pourrions aussi envisager de refaire cette expérience en séquençant les ARN issus d'hyphes germés en surface d'un milieu solide et exposés aux gaz environnants, mais cette approche n'a pas été envisagée en premier lieu à cause des problèmes engendrés par la gélose lors des extractions du matériel fongique.

Dans les deux cas, la durée du traitement a pu s'avérer insuffisante. Nous avions choisi ce temps très court car nous avions pour but d'observer l'expression transcriptomique différentielle des premiers gènes alors induits par ces deux hormones, mais, si les molécules et les concentrations choisies sont pertinentes, alors les spores n'ont peut-être simplement pas été traitées assez longtemps. Si ces expériences venaient à être reproduites, il serait également intéressant d'introduire un paramètre cinétique.

- Conclusion –

A travers ce projet de thèse, nous nous sommes intéressés à la production de phytohormones et à leurs effets chez les champignons mycorhiziens à arbuscules, afin de mieux comprendre le rôle de ces molécules de signalisation chez ces champignons symbiotiques. Les objectifs étaient d'identifier des hormones végétales de façon non équivoque dans des échantillons fongiques en utilisant l'organisme modèle *Rhizophagus irregularis*, puis de déterminer leur origine, ainsi que leur rôle dans la biologie de ce champignon. Ce travail est précurseur, et les résultats obtenus permettent d'établir de nouvelles hypothèses sur le rôle de ces hormones, et la régulation de la symbiose endomycorhizienne.

Nous avons pu démontrer et valider, à l'aide de différentes techniques de biochimie analytique, la présence d'hormones végétales issues de différentes familles, dans les exsudats et dans les spores de *R. irregularis*. L'auxine, une cytokinine et l'éthylène ont été identifiés comme exsudés par les spores, tandis qu'un acide gibbérellique a été retrouvé dans les spores. De plus, d'autres hormones, telles qu'un brassinolide, de l'acide abscissique, une auxine conjuguée ou d'autres cytokinines ont été détectés, mais ces résultats méritent d'être reproduits pour être validés avec certitude. Même si les quantités d'hormones détectées dans les exsudats de spores de *R. irregularis* sont relativement faibles, elles pourraient avoir un rôle déterminant sur leur environnement naturel direct. D'ailleurs, il serait intéressant d'évaluer et quantifier le profil hormonal de ce champignon à différents stades de son cycle de vie, en lien avec leurs fonctions. Détecter la présence d'hormones chez d'autres espèces de champignons mycorhiziens à arbuscules permettrait de généraliser nos résultats. Enfin, une analyse plus exhaustive du sécrétome de *R. irregularis* pourrait également mettre en évidence de nouvelles molécules de communications fongiques, comme des hormones modifiées, des peptides ou d'éventuelles phéromones sexuelles.

Nous avons pu confirmer que *R. irregularis* était capable de produire de l'éthylène et nos approches ont permis de proposer une voie de biosynthèse couramment utilisée par d'autres champignons. Cependant, malgré nos efforts, nous n'avons pas été en

mesure de déterminer de manière formelle si l'auxine, la cytokinine et la gibbérelline sont biosynthétisées par le champignon lui-même, ou si elles sont d'origine végétale et importées par *R. irregularis.* Toutefois, plusieurs résultats obtenus, comme une augmentation de la présence de ces hormones au cours du temps de germination, peuvent nous laisser penser que ce champignon mycorhizien pourrait produire des cytokinines et de l'auxine.

Enfin, nous avons essayé de déterminer les effets que pourraient avoir l'éthylène et les cytokinines, deux hormones exsudées pour lesquelles *R. irregularis* possède des récepteurs putatifs. Aux concentrations testées, nous n'avons pas réussi à déterminer si ces molécules avaient un effet sur la germination des spores et l'élongation des hyphes, ou si elles pouvaient moduler la capacité du champignon à coloniser son hôte. Au niveau transcriptomique, les traitements des spores avec de l'éthylène ont permis de réprimer l'expression de huit gènes, alors que les cytokinines n'ont eu aucun effet notable. Dans ces deux cas, il semble donc que le champignon n'ait pas perçu ces signaux. Il serait nécessaire de modifier les conditions expérimentales pour espérer mesurer un effet, si *R. irregularis* perçoit bien ces hormones. Après cette étude, la question de la perception de ces hormones par ce champignon mycorhizien reste donc toujours en suspens. Par ailleurs, des analyses fonctionnelles de ces récepteurs sont indispensables.

La présence de phytohormones chez les champignons mycorhiziens à arbuscules, quelle que soit leur origine de biosynthèse, ouvre la porte à de nouvelles hypothèses quant à leurs rôles dans la symbiose mycorhizienne, qui seront testées par les travaux menés dans le cadre de l'ANR Mycormones. Nous pouvons tout d'abord supposer que les phytohormones ne jouent pas seulement un rôle au niveau de la plante, pendant la symbiose, mais qu'elles peuvent également jouer un rôle auprès du partenaire fongique. Si elles sont produites par le champignon lui-même, elles peuvent jouer un rôle, encore non identifié, dans la physiologie fongique, contribuer au dialogue moléculaire avec la plante, ou encore avoir un effet sur les communautés bactériennes de la rhizosphère interagissant avec les champignons endomycorhiziens. Si les hormones détectées chez le champignon sont d'origine végétale, il est également envisageable qu'elles jouent un rôle dans la communication inter-plantes, *via* le réseau mycélien commun. La plante pourrait également utiliser le champignon et son réseau d'hyphes extraracinaires pour relâcher des

phytohormones végétales afin de moduler les communautés microbiennes du sol (bactéries, champignons…). Il n'est bien sûr pas exclu que les deux phénomènes, biosynthèse fongique et transfert d'hormones, puissent se produire simultanément, peut être variant en fonction de la famille d'hormones considérée. Les expériences de marquages métaboliques devraient permettre, après optimisation, de conclure quant à la biosynthèse fongique.

Même si certaines questions restent encore sans réponse, les travaux menés dans le cadre de cette thèse ont permis de développer de nouvelles méthodologies et d'acquérir de nouveaux outils d'analyses, apportant une plus-value au plateau MetaToul AgromiX. Les expériences de marquage isotopique ont permis d'introduire cette approche au sein du plateau MetaToul AgromiX et de créer une collaboration avec le plateau Réseaux métaboliques. Si ces approches continuent d'être développées au sein du LRSV, elles devraient permettre, à terme, de proposer des stratégies d'analyses de métabolites exogènes produits par des micro-organismes symbiotiques ou pathogènes, en interaction avec une plante. La plateforme d'imagerie Genotoul – TRI s'est dotée d'un nouveau microscope, permettant de répondre à la demande et aux besoins croissants d'observation et de mesures fines de cinétiques de croissances d'hyphes. Ce nouvel équipement devrait permettre à mon équipe d'accueil de poursuivre les investigations initiées par ce projet et mettre en évidence l'effet d'hormones végétales, ou autres molécules, sur la croissance ou la morphologie des hyphes de champignons endomycorhiziens, ou l'architecture du réseau mycélien.

Pour conclure, ce travail ouvre des perspectives inédites au regard de la régulation des hormonale végétales chez les micro-organismes. Bien qu'identifiées chez de nombreux champignons et bactéries, les phytohormones sont encore considérées comme ciblant exclusivement les plantes. Leurs implications dans la physiologie des champignons endomycorhiziens et dans la communication inter-plantes, permettraient de considérer ces hormones comme des molécules de communication inter-règnes et permettraient d'élargir la vision des interactions entre les plantes et leur environnement.

- Matériels et méthodes –

1 - Produits chimiques et réactifs

1.1 - Standard de phytohormones

Les standards de phytohormones utilisés ont été commandés chez Olchemim (iP, iPR, iP9G, Ki, *m*T, *t*Z, *c*Z, *t*ZR, *c*ZR, DHZ, BAP, GA_1, IAA-Asp, JA-Ile, ABA-GE, BL), Fluka (IBA, NAA), Acros Organics (IAA, IPA, SA, ABA), Sigma-Aldrich (IAA-Ala, JA, MeJA, Strigol), Fisher chemical (GA_3), Duchefa (GA_4) et Chiralix (GR24). Les poudres ont été dissoutes dans le solvant recommandé par le fournisseur, et stockées à -20 °C. L'éthylène et le MCP nous ont été gracieusement fournis par le Pr. Christian Chervin (GBF, Auzeville Tolosane).

1.2 - Précurseurs métaboliques

La L-méthionine et l'α-keto-γ-methylthiobutyrate (KMBA) ont été achetés chez Sigma-Aldrich. L'acétate $^{13}C_1$, l'acétate $U^{13}C$, ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Le glucose $U^{13}C$ nous a été gracieusement fourni par Floriant Bellvert du plateau MetaToul Réseaux métaboliques.

1.3 - Solvants et autres produits chimiques

L'ensemble des constituants des milieux solides ou liquides a été acheté chez Sigma-Aldrich. L'acétonitrile et le méthanol HPLC-grade ont été achetés chez Fisher Chemical, l'acide formique chez Acros Organics, l'hydroxyde d'ammonium et l'acide sulfurique chez Sigma-Aldrich et l'hydroxyde de potassium chez Proloabo.

2 - Matériel biologique

2.1 - Spores de R. irregularis.

Les spores stériles de *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198 ont été achetées chez Agronutrition (Labège, France). Elles sont dénombrées par le fournisseur, à partir d'un aliquot, par comptage direct à la loupe binoculaire et stockées dans du tampon citrate (10 mM) à 4 °C. Avant chaque expérience, les spores sont rincées cinq fois sur une

membrane en nylon (40 µm VWR) avec de l'eau Milli-Q stérile à 4 °C. Les spores sont re-suspendues dans de l'eau Milli-Q et stockées à 4 °C avant leur utilisation.

2.2 - Production des exsudats de spores germées

10 000 spores *R. irregularis* sont mises à germer en condition stérile, dans 25 mL d'eau Milli-Q (400 spores/mL) dans une boîte de Petri (Ø = 9 cm, VWR). Elles sont laissées 7 jours dans un incubateur à CO_2 (30 °C, 2% CO_2) à l'abris de la lumière. Les GSE sont ensuite filtrés à l'aide d'un fritté en fibre de verre (Chromabond, Macherey-Nagel, France) puis immédiatement congelés dans l'azote liquide, et stockés à -80 °C. Les spores sont également collectées, congelées dans l'azote liquide, puis stockées à -80 °C.

2.3 - Cultures en boites double compartiment

Les cultures en boites double compartiment sont réalisées en déposant sous hotte à flux laminaire, 10 à 20 segments de 1 cm de racines de carottes « hairy root » (*Daucus carota* transformées avec *Agrobacterium rhizogenes*), mycorhizées par *R. irregularis* DAOM 197198, dans un des compartiments contenant 18 mL de milieu M (Bécard and Fortin, 1988) gélifié avec 4% de phytagel (Sigma-Aldrich). Les racines et mycélium extra-racinaire sont laissés en croissance 3 mois dans une chambre noire (24 °C, 50% d'humidité), jusqu'à ce que le mycélium soit entièrement développé dans le deuxième compartiment. Les boites sont observées chaque semaine. Pour empêcher les racines de se développer dans le compartiment fongique, celles qui atteignent la séparation entre les deux compartiments sont déviées avec une pince stérile.

2.4 - Graines de M. truncatula

Les graines de *Medicago truncatula* A17 (produites et vendues par Dr Jean-Marc Prosperi, INRA Montpellier) sont scarifiées 8 minutes à l'acide sulfurique, puis stérilisées 1 minute dans de l'eau de javel. Après 5 rinçages à l'eau Milli-Q stérile, les graines sont étalées sur un milieu eau + agar 1% et laissées à germer 5 jours à l'abri de la lumière, à 4 °C.

3 - Extractions et purifications des hormones végétales

3.1 - A partir de GSE

Les GSE sont lyophilisés, puis repris dans 100 µL d'acide formique 1 M, puis stockés à –20 °C avant l'analyse par spectrométrie de masse.

3.2 - A partir de spores germées

Les phytohormones sont extraites des spores et purifiées par SPE (adapté de (Kojima *et al.*, 2009)). Les spores sont broyées mécaniquement à froid, à l'azote liquide à l'aide d'un mortier-pilon, ou à l'aide de broyeur mécanique (dans des tubes contenant une matrice de lyse A et D (mpbio), à l'aide d'un broyeur Retsch (3x 20 secondes), puis Fast-prep (3x 20 secondes) en prenant soin de maintenir les échantillons froids. La poudre obtenue est re-suspendue dans du solvant Bieleski modifié (méthanol/eau/acide formique 75 :20 :5 (Hoyerova *et al.*, 2006)) et laissée à macérer 16 h à -20 °C. L'extrait brut est centrifugé 15 min à 10 000 x *g*, 4 °C. Le culot est re-extrait dans 200 µL de solvant Bieleski modifié (30 minutes à -20 °C), centrifugé comme précédemment et les surnageants sont rassemblés. L'extrait est pré-purifié par SPE, avec une cartouche Oasis HLB (1 mL/30 mg, Waters). La cartouche est conditionnée avec 1 mL de méthanol, puis équilibrée avec 1 mL d'acide formique 1 M. Les surnageants de l'extrait brut sont ensuite déposés sur la cartouche SPE et élués avec 1 mL de solvant Bieleski modifié. L'éluât est collecté et séché sous flux d'azote, puis repris dans 1 mL d'acide formique 1 M. La séparation des phytohormones est obtenue par SPE, avec une cartouche Oasis MCX (1 mL/30 mg, Waters). La cartouche est conditionnée avec 1 mL de méthanol, puis équilibrée avec 1 mL d'acide formique 1 M. L'échantillon est déposé sur la cartouche, et l'éluât est éliminé. Les phytohormones sont éluées successivement par 1 mL de méthanol (fraction 1, hormones neutres et acides), 1 mL d'hydroxyde d'ammonium 0.35 M (fraction 2), et 1 mL de méthanol/hydroxyde d'ammonium 0.35 M 60 :40 (fraction 3, contenant les cytokinines libres et conjuguées avec un ose). Chaque fraction est séchée sous flux d'azote, et est conservée sèche à 4 °C avant analyse. Les fractions sont ensuite reconstituées dans 100 µL d'acide formique 1 M.

3.3 - A partir de boites DC

Les géloses des compartiments fongiques et racinaires des cultures en boites double compartiment sont collectées séparément, après avoir éliminé les racines du compartiment racinaire. Les géloses sont coupées en cubes d'environ 5 mm et laissées à macérer une nuit dans suffisamment de solvant Bieleski (Hoyerova *et al.*, 2006) pour les recouvrir entièrement. Le solvant est récupéré par filtration, et les échantillons sont ensuite préparés de la même manière que les spores germées.

4 - Analyses par spectrométrie de masse

Les échantillons de phytohormones issues de GSE, spores broyées, ou géloses, sont analysés par UHPLC-MS, grâce à deux types d'appareil : un Q-trap 5500 (AB Sciex) en mode MRM, et un Q-Exactive Plus (Thermo Scientific) en MS et en MS/MS.

4.1 - Analyses MRM

Une chaine UHPLC (Dionex Ultimate 3000, Thermo Scientific) est équipée avec une colonne Kinetex C18 (100 × 2.1 mm, 2.6 µm, 100 Å, Phenomenex) chauffée à 45 °C. 5 µL d'échantillon sont injectés. La séparation des métabolites est obtenue à l'aide d'un débit constant de 0,3 $mL.min^{-1}$, d'un gradient de solvant A (eau + 0.1% d'acide formique) vers B (acétonitrile + 0,1% acide formique) : 1 min 5% B; 11 min 5% à 100% B; 2 min 100% B, et la colonne est re-équilibrée avec les conditions initiales en 4 min. Le spectromètre de masse Q-Trap 5500 est équipé d'une source d'ionisation electrospray. Le « gaz rideau » est paramétré à 30 psi, le « gaz nébuliseur » à 40 psi, et le « turbo gaz » à 60 psi. Le voltage du capillaire est paramétré à 5,5 kV (mode positif) ou -4,5 kV (mode négatif), et la source d'ionisation est chauffée à 400 °C. Les échantillons sont analysés en mode positif et négatif, en mode *scheduled* MRM (60 sec). Vingt-cinq standards d'hormones (libres ou conjuguées), dilués dans du méthanol, de 0,1 mM à 1 pM, ont été préparés. Ils ont été infusés dans la source (7 $\mu L.\ min^{-1}$) pour déterminer les meilleurs paramètres de *declustering potential*, d'énergie de collision, et de *collision cell exit potential*. Le mode d'ionisation, les transitions MRM, la limite de détection, et le temps de rétention, de chaque hormone ont été listés dans le Tableau supplémentaire 1 (article). Le traitement des données est réalisé avec le logiciel Analyst 1.6.2.

4.2 - Analyses HR-MS et MS/MS

Une chaine UHPLC (Ultimate 3000 RSLC, Thermo Scientific) est équipée avec une colonne Hypersil Gold aQ C18 (100 × 2.1 mm, 2.6 µm, 175 Å, Thermo Scientific #25302102130) chauffée à 35 °C. 5 µL d'échantillon sont injectés. La séparation des métabolites est obtenue à l'aide d'un débit constant de 0,3 $mL.min^{-1}$, d'un gradient de solvant A (eau + 0.05% d'acide formique) vers B (acétonitrile + 0,05% acide formique) : 1 min 5% B; 7 min 5% à 96% B; 1 min 96% B, et la colonne est re-équilibrée aux conditions initiales en 3 min. Le spectromètre de masse Q-Exactive Plus est équipé d'une source d'ionisation electrospray H-ESI II. Le *sheath gas* est paramétré à 48, le *sweep gas* a 2, et le *auxiliary gas* à 11. Le voltage du capillaire est paramétré à 3,5 kV (mode positif) ou -2,5 kV (mode négatif), la température du capillaire est de 256 °C et celle de la source d'ionisation est de 413 °C. Les échantillons sont analysés en mode positif et négatif, en MS, en mode balayage (centroïde), avec une résolution de 35,000. Le contrôle automatique du gain est paramétré à 3.10^{-6}, avec une gamme de m/z allant de 50 à 600. Une analyse MS/MS ciblée est déclenchée quand le spectromètre de masse détecte en mode balayage une hormone végétale (liste d'ions parents entrée dans le logiciel d'acquisition). Le contrôle automatique du gain est alors programmé à 2.10^{5}, et la résolution à 17,500. Le traitement des données est réalisé avec les logiciels Xcalibur 3.0 et Tracefinder 3.2.

5 - Analyses de l'éthylène et du KMBA

5.1 - Détection de l'éthylène par GC-FID

20 000 spores sont mises à germer dans 2 mL d'eau Milli-Q stérile, dans des tubes en verre stérilisés (Ø=1.35 cm, H= 6.10 cm, V=7.5 mL, volume de tête = 5.5 mL), et traitées ou non avec 10 mM de méthionine ou 1 µM de KMBA. Les tubes sont enroulés dans du papier aluminium pour empêcher toute exposition à la lumière, et sont scellés avec des bouchons poreux en silicone (Hirschmann Instruments). Après 3 jours de germination dans un incubateur à CO_2 (30 °C, 2% CO_2), le bouchon est remplacé par un bouchon imperméable aux gaz, et les spores sont confinées 1 jour, exposées ou non à la lumière (100 µmol photons m^{-2} s^{-1}, 21 °C).

L'éthylène présent dans l'espace de tête est mesuré par chromatographie gazeuse couplée à un détecteur par ionisation de flamme (GC-FID), comme décrit dans (Chen *et al.*, 2020). 1 mL de gaz issu de l'espace de tête est injecté manuellement dans une GC-FID (Agilent 7820a), équipée d'une colonne 80/100 alumina (1/8" x 2 mm x 1.5 m, Agilent), et programmée avec les paramètres suivants : température du four 70 °C, température de l'injecteur 110 °C, débit du gaz vecteur (N_2) 28 $mL.min^{-1}$, température du détecteur 250 °C. L'air du pic d'éthylène est mesuré et normalisé par rapport au pic d'O_2, formé à l'injection. Le temps de rétention est déterminé avec un standard externe d'éthylène à 4 ppm.

5.2 - Détection du KMBA par UHPLC-MS

Une chaine UHPLC (Dionex Ultimate 3000, Thermo Scientific) est équipée avec une colonne Acquity UPLC BEH-C18 (150 × 2.1 mm, 1.7 µm, Waters) chauffée à 45 °C. 10 µL d'échantillon (GSE) sont injectés. La séparation des métabolites est obtenue à l'aide d'un débit constant de 0,3 $mL.min^{-1}$, d'un gradient de solvant A (eau + 0.1% d'acide formique) vers B (acétonitrile + 0,1% acide formique) : 1 min 5% B; 8 min 5% à 100% B; 2 min 100% B, et la colonne est re-équilibrée aux conditions initiales en 2 min. Le spectromètre de masse Q-Trap 4500 (AB Sciex) est équipé d'une source d'ionisation electrospray. Le « gaz rideau » est paramétré à 30 psi, le « gaz nébuliseur » à 40 psi, et le « turbo gaz » à 60 psi. Le voltage du capillaire est paramétré à -3,5 kV (mode négatif), et la source d'ionisation est chauffée à 400 °C. Les échantillons sont analysés en mode négatif, en mode MRM. Les meilleurs paramètres de *declustering potential*, d'énergie de collision, et de *collision cell exit potential* ont été déterminés par infusion à 7 $\mu L.min^{-1}$ d'un standard de KMBA dilué à 10^{-5} M dans du méthanol. Le mode d'ionisation, les transitions MRM, la limite de détection et le temps de rétention, sont listés dans le Tableau supplémentaire 1 (article). Le traitement des données est réalisé avec le logiciel Analyst 1.6.2.

6 - Expériences de marquage isotopique

6.1 - Préparation de l'échantillon

10 000 spores sont mises à germer dans 25 ml de milieu M liquide (Bécard and Fortin, 1988), complémenté ou non avec 200 µM d'acétate $U^{13}C$, 1 mM d'acétate $U^{13}C$, ou encore 200 µM d'acétate $U^{13}C$ et 1 mM de glucose $U^{13}C$. En plus du traitement avec 200 µM d'acétate, une condition a également été réalisée avec 10^{-7} M de GR24. Les spores sont laissées à germer 7 jours dans un incubateur à CO_2 (30 °C, 2 % CO_2). Les GSE et les spores sont ensuite collectés et les hormones sont extraites comme décrit précédemment.

6.2 - Analyses des phytohormones par LC-MS

L'analyse des expériences de marquage a été réalisée en HRMS, comme décrit précédemment. Les résultats ont été analysés à l'aide de MZmine 2 (Pluskal *et al.*, 2010), en cherchant la masse monoisotopique de la molécule d'intérêt, ainsi que les isotopologues m+1 à m+n par incrément de masse de 1,003355, avec une tolérance de 5 ppm.

7 - Expériences de mycorhization

Une fois rincées, les spores sont mises à germer dans du milieu M (1000 spores/mL), dans des bouteilles fermées hermétiquement. Elles sont traitées avec 10 ppm d'éthylène ou 10 ppm de MCP. Après 4 jours de germination, les bouteilles sont ventilées et les spores servent à inoculer les plantules de *Medicago truncatula.*

Après stérilisation et germination, les plantules de *M. truncatula* sont plantées dans les différents systèmes de cultures. La culture des plantes est réalisée en chambre de culture (16 h : 8 h, 22 °C : 20 °C, jour : nuit, photopériode à 400 µmol photon $m^{-2}.s^{-1}$), avec un arrosage avec la solution de long Ashton modifié (Hewitt and Notton, 1966) (7,5 µM de phosphate).

7.1 - Système de mycorhization entre membranes

Des membranes d'hydrates de cellulose (Hutchinson) sont pliées selon le pli d'origami « base préliminaire ». La membrane est insérée à la verticale dans un pot rempli de zéolite (50% Ø 0.5 à 1 mm, 50% Ø 1 à 2.5 mm). Les jeunes plantules sont alors plantées dans la membrane, environ 5 mm sous la surface du substrat. Après 7 jours de croissance, les membranes sont délicatement retirées du pot avec le plant de *M truncatula*, elles sont ouvertes et 150 ou 1000 spores sont déposées au contact des racines. Les membranes sont repliées et replantées pendant 7 à 14 jours, avant récolte.

7.2 - Système de mycorhization en tube Falcon

7.2.1 - Tubes Falcon coupés

Des tubes Falcon de 50 mL sont coupés à mi-hauteur et la partie supérieure avec le bouchon est conservée. Les plantules sont alors plantées dans le tube retourné et rempli de zéolite (50% Ø 0.5 à 1 mm, 50% Ø 1 à 2.5 mm). Soit le substrat est initialement inoculé avec 150 spores, et la plante est mise en culture pendant 2 semaines, soit la plante est cultivée une semaine sans spores, puis celles-ci sont ajoutées dans le bouchon du tube, et les plantes sont de nouveau mises en culture 2 semaines avant récolte.

7.2.2 - Tubes Falcon avec réserve de solution nutritive

Des tubes Falcon entiers sont percés trois fois dans la partie conique, remplis de substrat contenant 150 spores, (zéolite, 50% Ø 0.5 à 1 mm, 50% Ø 1 à 2.5 mm) et chaque tube est inséré dans un pot opaque de 150 mL, contenant 85 mL de solution d'arrosage. Les plantules sont alors plantées dans le substrat et laissées à se développer pendant 2 semaines.

7.3 - Système de mycorhization en plaques 6 puits

Les plantules sont repiquées dans leur substrat, (zéolite, 50% Ø 0.5 à 1 mm, 50% Ø 1 à 2.5 mm), le tout dans des plaques 6 puits (Ø 3,5 cm). Après 7 jours, 150 spores sont déposées au fond de nouvelles plaques 6 puits, et les jeunes plantes sont transplantées avec leur substrat au-dessus, puis sont mises en culture 2 semaines.

7.4 - Coloration et observation des évènements de mycorhization

Après 2 semaines de co-inoculation, les racines sont collectées et séparées délicatement du substrat. Elles sont vidées de leur contenu cellulaire avec un traitement au KOH 10% à température ambiante pendant 3 jours, puis colorées à l'encre de Schaeffer (Vierheilig *et al.*, 1998) 10 minutes à 95 °C afin de visualiser les structures fongiques. L'ensemble du système racinaire est examiné à la loupe binoculaire, et le nombre total d'évènements de mycorhization (Kobae, 2019) est comptabilisé. Quatre stades d'infection ont été définis en fonction de l'avancement de la colonisation fongique, allant d'un hyphe intra-racinaire sans arbuscule (niveau 1), un hyphe intra-racinaire accompagné d'un arbuscule (niveau 2), accompagné de 2 à 10 arbuscules (niveau 3), ou 10 arbuscules et plus (niveau 4).

8 - Expériences de germination des spores

La germination des spores est évaluée en boîte de Petri, avec du milieu M gélifié (4% phytagel). Les hormones à tester, ou le solvant de stockage pour les conditions contrôles, sont ajoutés au milieu une fois refroidi mais encore en surfusion. Quinze mL de milieu sont versés dans des boîtes de Petri (Ø 9 cm) et un moule de fabrication maison (6 à 8 puits de Ø 3,2 mm) est déposé avant gélification. Entre 2 et 8 spores sont déposées dans chaque puit. Les boîtes sont laissées à germer 14 jours dans une étuve à CO_2 (30 °C, 2% CO_2), et sont observées à la loupe binoculaire régulièrement. La croissance des hyphes nouvellement formés (se développant dans la gélose) est tracée sur la boîte au marqueur (Ø 0.8 mm). Après 14 jours, les boîtes sont scannées, et la longueur de chaque segment est mesurée avec le logiciel ImageJ.

9 - Analyses RNAseq

9.1 - Préparation des échantillons

Les spores rincées sont laissées à germer 4 jours dans du milieu M liquide. 40 000 spores sont utilisées par réplicat, et 4 réplicats par traitement ont été réalisés. Pour le traitement éthylène, les spores sont déposées dans des bouteilles en verre (V=120 mL) à une concentration de 5000 spores/mL. Pour le traitement cytokinine, elles sont déposées dans des boîtes de Petri, à une concentration de 400 spores/mL. Après 4 jours de pré-

Gène cible	Amorce sens	Amorce anti-sens
RIR_3514700	CCTTCACCATGGCCTCTAGC	ACTCCTCCATGACCATATCCA
RIR_3514600	TTGGACCCTAACTGGCTCAC	GTGAGCAATGCCCAAAGTGG
RIR_3513200	TCCTGATCCACATCATCAGCG	GGCTGAGAGGAACCAACCAA
RIR_3514400	GTAGCTGCTGCTCCTTTCCA	AGAAGGCAAGAATGGCAACCT
RIR_3514000	CATTGGGGGTCTTTCGGGTA	GCCATCCATTAGTCCCACCC
RIR_3514300	AGGGAGTGTTAGGGTTGGGT	GGCTGTCCTTGAGGTCCAAT
RIR_3512700	AGGATTTCAAGACGGGGGAT	ACGGATTGTTGAGCCTAGCA
RIR_3513300	TTAATGGTGGCTTGCGGTCT	ACTGCACCTGCTGACAGAAA

Tableau 2 : Amorces utilisées pour les expériences de q-PCR

Listes des amorces utilisées pour la validation des gènes différentiellement exprimés par q-PCR.

germination, le traitement hormonal est appliqué. Pour l'éthylène, les bouteilles sont fermées hermétiquement et de l'éthylène est injecté pour atteindre la concentration de 0,1 ou 10 ppm dans l'espace de tête. Pour les cytokinines, 25 µL d'iP à 10^{-4} M dans du méthanol sont ajoutés dans chaque boîte, les boîtes contrôles reçoivent 25 µL de méthanol.

Après 2 h de traitement, les spores sont filtrées par pression négative sur des pointes à filtre de pipettes, puis sont immédiatement congelées dans de l'azote liquide. Elles sont ensuite broyées manuellement à l'aide d'un mortier et d'un pilon, dans l'azote liquide, et les ARN sont extraits à l'aide du kit RNeasy mini (Qiagen). Les contaminants ADN sont ensuite dégradés à la DNase RQ1 (Thermofischer Scientific). 3 µg d'ARN par réplicat ont été séquencés par Genewiz (illumina HiSeq, 2x 150 bp).

9.2 - Validation des gènes différentiellement exprimés par qPCR

Les ADNc ont été générés à partir de 1 µg d'ARN restant, en utilisant la reverse transcriptase M-MLV (Thermofischer Scientific). Les primers pour la qPCR (Tableau 2) sont choisis pour avoir un Tm de 60 °C, et amplifier une région de 75 à 125 bp. Les réactions sont réalisées dans des plaques 384 puits, à l'aide de la solution de réaction LightCycler 480 SYBR Green I master mix. Le détecteur LightCycler 480 (Roche Applied Science) est utilisé pour quantifier la fluorescence après chaque cycle d'élongation. La fluorescence est normalisée par rapport au gène de ménage Transcription Elongation Factor (GiTEF), et l'expression relative est comparée aux conditions contrôles.

10 - Analyses statistiques

10.1 - Ethylène

La version 4.0.0 de R, avec les packages Agricolae v. 1.3-1 et GGplot2 v 3.1.0 ont été utilisés pour mesurer les différences statistiques entre les groupes, à l'aide d'une analyse non-paramétrique Kruskal-Wallis, et une comparaison *pairwise* avec un FDR ajusté est utilisée pour les comparaisons multiples.

10.2 - RNAseq

Les fichiers htseq-counts ont étés analysés en utilisant R v 4.0.0, et le package DESeq2 v 1.22.2 (Love *et al.*, 2014), afin de normaliser la quantification brute en Expression logarithmique relative (RLE), et les expressions différentielles sont évaluées par distribution binomiale négative.

- Bibliographie et références –

Abdellatif L, Lokuruge P, Hamel C. 2019. Axenic growth of the arbuscular mycorrhizal fungus Rhizophagus irregularis and growth stimulation by coculture with plant growth-promoting rhizobacteria. Mycorrhiza.

Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME. 2012. *Ethylene in Plant Biology: Second Edition*. Elsevier Inc.

Acosta IF, Laparra H, Romero SP, Schmelz E, Hamberg M, Mottinger JP, Moreno MA, Dellaporta SL. 2009. tasselseed1 is a lipoxygenase affecting jasmonic acid signaling in sex determination of maize. Science **323**, 262–265.

Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. Nature **435**, 824–827.

Akiyoshi DE, Regier DA, Gordon MP. 1987. Cytokinin production by Agrobacterium and Pseudomonas spp. Journal of bacteriology **169**, 4242–4248.

Alder A, Jamil M, Marzorati M, Bruno M, Vermathen M, Bigler P, Ghisla S, Bouwmeester H, Beyer P, Al-Babili S. 2012. The path from β-carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. Science **335**, 1348–1351.

Augé RM. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Mycorrhiza **11**, 3–42.

Avanci NC, Luche DD, Goldman GH, Goldman MH. 2010. Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. Genetics and molecular research : GMR **9**, 484–505.

Awad H, Khamis MM, El-Aneed A. 2015. Mass spectrometry, review of the basics: Ionization. Applied Spectroscopy Reviews **50**, 158–175.

Azcon-Aguilar C, Rodriguez-Navarro DN, Barea JM. 1981. Effects of ethrel on the formation and responses to VA mycorrhiza in Medicago and Triticum. Plant and Soil **60**, 461–468.

Babikova Z, Gilbert L, Bruce TJA, Birkett M, Caulfield JC, Woodcock C, Pickett JA, Johnson D. 2013. Underground signals carried through common mycelial networks warn neighbouring plants of aphid attack (N van Dam, Ed.). Ecology Letters **16**, 835–843.

Bago B. 2000. *Putative sites for nutrient uptake in arbuscular mycorrhizal fungi*.

Bago B, Azcón-Aguilar C, Piché Y. 1998. Architecture and developmental dynamics of the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices grown under monoxenic conditions . Mycologia **90**, 52–62.

Bago B, Pfeffer PE, Abubaker J, Jun J, Allen JW, Brouillette J, Douds DD, Lammers PJ, Shachar-Hill Y. 2003. Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. Plant Physiology **131**, 1496–1507.

Bago B, Pfeffer PE, Douds DD, Brouillette J, Bécard G, Shachar-Hill Y. 1999. Carbon Metabolism in Spores of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus Glomus intraradices as Revealed by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Plant Physiology **121**, 263–272.

Bago B, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. 2000. *Update on Symbiosis Carbon Metabolism and Transport in Arbuscular Mycorrhizas*.

Bajguz A. 2007. Metabolism of brassinosteroids in plants. Plant Physiology and Biochemistry **45**, 95–107.

Bajguz A, Piotrowska A. 2009. Conjugates of auxin and cytokinin. Phytochemistry **70**, 957–969.

Balzergue C, Puech-Pags V, Bécard G, Rochange SF. 2011. The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events. Journal of Experimental Botany **62**, 1049–1060.

Bardgett RD, Van Der Putten WH. 2014. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. Nature **515**, 505–511.

Barea JM, Azcón-Aguilar C. 1982. Production of plant growth-regulating substances by the vesicular-

arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. Applied and environmental microbiology **43**, 810–3.

Barker SJ, Tagu D. 2000. The Roles of Auxins and Cytokinins in Mycorrhizal Symbioses. J Plant Growth Regul **19**, 144–154.

Barry CS, Giovannoni JJ. 2007. Ethylene and fruit ripening. Journal of Plant Growth Regulation **26**, 143–159.

Bassil N V, Mok D, Mok MC. 1993. Partial Purification of a cis-trans-Isomerase of Zeatin from Immature Seed of Phaseolus vulgaris L. Plant Physiology **102**, 867–872.

Bécard G, Doner LW, Rolin DB, Douds DD, Pfeffer PE. 1991. Identification and quantification of trehalose in vesicular-arbuscular mycorrhi zal fungi by in vivo13C NMR and HPLC analyses. New Phytologist **118**, 547–552.

Bécard G, Fortin JA. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. New Phytologist **108**, 211–218.

Bécard G, Kosuta S, Tamasloukht M, Séjalon-Delmas N, Roux C. 2004. Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. Canadian Journal of Botany.1186–1197.

Bécard G, Pfeffer PE. 1993. Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. Protoplasma **174**, 62–68.

Bécard G, Piché Y. 1989*a*. Fungal Growth Stimulation by CO2 and Root Exudates in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. Applied and Environmental Microbiology **55**.

Bécard G, Piché Y. 1989*b*. New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, Gigaspora margarita. New Phytologist **112**, 77–83.

Bedini A, Mercy L, Schneider C, Franken P, Lucic-Mercy E. 2018. Unraveling the initial plant hormone signaling, metabolic mechanisms and plant defense triggering the endomycorrhizal symbiosis behavior. Frontiers in Plant Science **871**.

Begum N, Qin C, Ahanger MA, Raza S, Khan MI, Ashraf M, Ahmed N, Zhang L. 2019. Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Growth Regulation: Implications in Abiotic Stress Tolerance. Frontiers in Plant Science **10**.

Beilby JP, Kidby DK. 1980. Sterol composition of ungerminated and germinated spores of the Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal fungus, Glomus caledonius. Lipids **15**, 375–378.

Benedetto A, Magurno F, Bonfante P, Lanfranco L. 2005. Expression profiles of a phosphate transporter gene (GmosPT) from the endomycorrhizal fungus Glomus mosseae. Mycorrhiza **15**, 620–627.

Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jü Rgens G, Friml J. 2003. *Local, Efflux-Dependent Auxin Gradients as a Common Module for Plant Organ Formation growing shoots or roots bearing a secondary meristem at the tip. Aerial organs such as leaves and secondary shoots, including flowers, originate from primordia on*.

Berbee ML, James TY, Strullu-Derrien C. 2017. Early Diverging Fungi: Diversity and Impact at the Dawn of Terrestrial Life. Annual Review of Microbiology **71**, 41–60.

Berruti A, Lumini E, Balestrini R, Bianciotto V. 2016. Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: Let's benefit from past successes. Frontiers in Microbiology **6**, 1559.

Besserer A, Bécard G, Jauneau A, Roux C, Séjalon-Delmas N. 2008. GR24, a Synthetic Analog of Strigolactones, Stimulates the Mitosis and Growth of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus Gigaspora rosea by Boosting Its Energy Metabolism. Plant Physiology **148**, 402–413.

Besserer A, Puech-Pagès V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, Roy S, Portais J-C, Roux C, Bécard G, Séjalon-Delmas N. 2006. Strigolactones Stimulate Arbuscular Mycorrhizal Fungi by Activating Mitochondria (J Chory, Ed.). PLoS Biology **4**, e226.

Bhardwaj R, Kaur S, Nagar PK, Arora HK. 2007. Isolation and characterization of brassinosteroids from immature seeds of Camellia sinensis (O) Kuntze. Plant Growth Regulation **53**, 1–5.

Bieleski RL. 1973. Phosphate Pools, Phosphate Transport, and Phosphate Availability. Annual Review of Plant Physiology **24**, 225–252.

Billington DC, Golding BT, Pr1mroset SB, Primrose SB. 1979. Biosynthesis of ethylene from methionine. Isolation of the putative intermediate 4-methylthio-2-oxobutanoate from culture fluids of

bacteria and fungi. Biochemical Journal **182**, 827–836.

Bitterlich M, Krügel U, Boldt-Burisch K, Franken P, Kühn C. 2014. The sucrose transporter SlSUT2 from tomato interacts with brassinosteroid functioning and affects arbuscular mycorrhiza formation. Plant Journal **78**, 877–889.

Blee KA, Anderson AJ. 1998. Regulation of arbuscule formation by carbon in the plant. Plant Journal **16**, 523–530.

Van Bockhaven J, Spíchal L, Novák O, Strnad M, Asano T, Kikuchi S, Höfte M, De Vleesschauwer D. 2015. Silicon induces resistance to the brown spot fungus Cochliobolus miyabeanus by preventing the pathogen from hijacking the rice ethylene pathway. New Phytologist **206**, 761–773.

Den Boer BGW, Murray JAH. 2000. *Triggering the cell cycle in plants*.

Bompadre MJ, Fernández Bidondo L, Silvani VA, Colombo RP, Pérgola M, Pardo AG, Godeas AM. 2015. Combined effects of arbuscular mycorrhizal fungi and exogenous cytokinins on pomegranate (Punica granatum) under two contrasting water availability conditions. Symbiosis **65**, 55–63.

Booker MA, DeLong A. 2015. Producing the ethylene signal: Regulation and diversification of ethylene biosynthetic enzymes. Plant Physiology **169**, 42–50.

Böttcher C, Burbidge CA, di Rienzo V, Boss PK, Davies C. 2015. Jasmonic acid-isoleucine formation in grapevine (Vitis vinifera L.) by two enzymes with distinct transcription profiles. Journal of Integrative Plant Biology **57**, 618–627.

Bowman SM, Free SJ. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. BioEssays **28**, 799–808.

Braun N, Germain A de Saint, Pillot JP, *et al.* 2012. The pea TCP transcription factor PsBRC1 acts downstream of strigolactones to control shoot branching. Plant Physiology **158**, 225–238.

Bravo A, York T, Pumplin N, Mueller LA, Harrison MJ. 2016. Genes conserved for arbuscular mycorrhizal symbiosis identified through phylogenomics. Nature Plants **2**.

Breuillin-Sessoms F, Floss DS, Karen Gomez S, *et al.* 2015. Suppression of arbuscule degeneration in Medicago truncatula phosphate transporter4 mutants is dependent on the ammonium transporter 2 family protein AMT2;3. Plant Cell **27**, 1352–1366.

Breuillin F, Schramm J, Hajirezaei M, *et al.* 2010. Phosphate systemically inhibits development of arbuscular mycorrhiza in Petunia hybrida and represses genes involved in mycorrhizal functioning. Plant Journal **64**, 1002–1017.

Brooks DW, Bevinakatti HS, Powell DR. 1985. The Absolute Structure of (+)-Strigol. Journal of Organic Chemistry **50**, 3779–3781.

Brundrett MC. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. New Phytologist **154**, 275–304.

Brundrett MC, Tedersoo L. 2018. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. New Phytologist **220**, 1108–1115.

Bücking H, Abubaker J, Govindarajulu M, Tala M, Pfeffer PE, Nagahashi G, Lammers P, Shachar-Hill Y. 2008. Root exudates stimulate the uptake and metabolism of organic carbon in germinating spores of Glomus intraradices. New Phytologist **180**, 684–695.

Buée M, Rossignol M, Jauneau A, Ranjeva R, Bécard G. 2000. The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. Molecular Plant-Microbe Interactions **13**, 693–698.

Buendia L, Maillet F, O'Connor D, van de-Kerkhove Q, Danoun S, Gough C, Lefebvre B, Bensmihen S. 2019. Lipo-chitooligosaccharides promote lateral root formation and modify auxin homeostasis in Brachypodium distachyon. New Phytologist **221**, 2190–2202.

Bulíčková J, Sokolová R, Giannarelli S, Muscatello B. 2013. Determination of Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid in Aqueous Solution. Electroanalysis **25**, 303–307.

Bürger M, Chory J. 2019. Stressed Out About Hormones: How Plants Orchestrate Immunity. Cell Host and Microbe **26**, 163–172.

Bürger M, Chory J, Bürger M. 2020. The Many Models of Strigolactone Signaling The Growing Family of SL Molecules. Trends in Plant Science **25**.

Camps C, Jardinaud MF, Rengel D, Carrère S, Hervé C, Debellé F, Gamas P, Bensmihen S, Gough C. 2015. Combined genetic and transcriptomic analysis reveals three major signalling pathways activated by Myc-LCOs in Medicago truncatula. New Phytologist **208**, 224–240.

Cerrato A, Cannazza G, Capriotti AL, Citti C, La Barbera G, Laganà A, Montone CM, Piovesana S, Cavaliere C. 2020. A new software-assisted analytical workflow based on high-resolution mass spectrometry for the systematic study of phenolic compounds in complex matrices. Talanta **209**, 120573.

Chabaud M, Genre A, Sieberer BJ, Faccio A, Fournier J, Novero M, Barker DG, Bonfante P. 2011. Arbuscular mycorrhizal hyphopodia and germinated spore exudates trigger Ca2+ spiking in the legume and nonlegume root epidermis. New Phytologist **189**, 347–355.

Chabot S, Becard G, Piche Y. 1992. Life Cycle of Glomus intraradix in Root Organ Culture. Mycologia **84**, 315.

Chagué V, Elad Y, Barakat R, Tudzynski P, Sharon A. 2002. Ethylene biosynthesis in Botrytis cinerea. FEMS Microbiology Ecology **40**, 143–149.

Chanclud E, Kisiala A, Emery NRJ, Chalvon V, Ducasse A, Romiti-Michel C, Gravot A, Kroj T, Morel J-B. 2016. Cytokinin Production by the Rice Blast Fungus Is a Pivotal Requirement for Full Virulence (J-R Xu, Ed.). PLOS Pathogens **12**, e1005457.

Chanclud E, Morel J-B. 2016. Plant hormones: a fungal point of view. Molecular Plant Pathology **17**, 1289–1297.

Chang C, Kwok SF, Bleecker AB, Meyerowitz EM. 1993. Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: Similarity of product to two-component regulators. Science **262**, 539–544.

Chang JH, Tong L. 2012. Mitochondrial poly(A) polymerase and polyadenylation. Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms **1819**, 992–997.

Chen Y, Althiab Almasaud R, Carrie E, Desbrosses G, Binder BM, Chervin C. 2020. Ethanol, at physiological concentrations, affects ethylene sensing in tomato germinating seeds and seedlings. Plant Science **291**, 110368.

Chen H, Guo XF, Zhang HS, Wang H. 2011*a*. Simultaneous determination of phytohormones containing carboxyl in crude extracts of fruit samples based on chemical derivatization by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **879**, 1802–1808.

Chen ML, Huang YQ, Liu JQ, Yuan BF, Feng YQ. 2011*b*. Highly sensitive profiling assay of acidic plant hormones using a novel mass probe by capillary electrophoresis-time of flight-mass spectrometry. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **879**, 938–944.

Chilton MD, Tepfer DA, Petit A, David C, Casse Delbart F, Tempé J. 1982. Agrobacterium rhizogenes inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. Nature **295**, 432–434.

Chu J, Fang S, Xin P, Guo Z, Chen Y. 2017. Quantitative analysis of plant hormones based on LC-MS/MS. Hormone Metabolism and Signaling in Plants. Elsevier, 471–537.

Clause SD, Sasse JM. 1998. Brassinosteroids: Essential Regulators of Plant Growth and Development. Annual Review of Plant Biology **49**, 427–451.

Clouse SD. 2011. Brassinosteroids. The Arabidopsis Book **9**, e0151.

Cohen BA, Amsellem Z, Maor R, Sharon A, Gressel J. 2002. Transgenically enhanced expression of indole-3-acetic acid confers hypervirulence to plant pathogens. Phytopathology **92**, 590–596.

Compant S, Van Der Heijden MGA, Sessitsch A. 2010. Climate change effects on beneficial plant-microorganism interactions. FEMS Microbiology Ecology **73**, 197–214.

Cook CE, Whichard LP, Wall ME, Egley GH, Coggon P, Luhan PA, Mcphail AT. 1972. Germination Stimulants. II. The Structure of Strigol–A Potent Seed Germination Stimulant for Witchweed (Striga lutea Lour.). Journal of the American Chemical Society **94**, 6198–6199.

Cosgrove DJ, Sovonick-Dunford SA. 1989. Mechanism of gibberellin-dependent stem elongation in peas. Plant Physiology **89**, 184–191.

Cosme M, Wurst S. 2013. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi, rhizobacteria, soil phosphorus and plant cytokinin deficiency change the root morphology, yield and quality of tobacco. Soil

Biology and Biochemistry **57**, 436–443.

Costacurta A, Vanderleyden J. 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. Critical Reviews in Microbiology **21**, 1–18.

Cresci GA, Bawden E. 2015. Gut microbiome: What we do and don't know. Nutrition in Clinical Practice **30**, 734–746.

Crocoll C, Kettner J, Dörffling K. 1991. Abscisic acid in saprophytic and parasitic species of fungi. Phytochemistry **30**, 1059–1060.

Csukasi F, Osorio S, Gutierrez JR, *et al.* 2011. Gibberellin biosynthesis and signalling during development of the strawberry receptacle. New Phytologist **191**, 376–390.

Cui K, Lin Y, Zhou X, Li S, Liu H, Zeng F, Zhu F, Ouyang G, Zeng Z. 2015. Comparison of sample pretreatment methods for the determination of multiple phytohormones in plant samples by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. Microchemical Journal **121**, 25–31.

Dąbrowska P, Boland W . 2007. iso-OPDA: An Early Precursor ofcis-Jasmone in Plants? ChemBioChem **8**, 2281–2285.

Dai A. 2011. Drought under global warming: a review. Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change **2**, 45–65.

van Dam NM, Bouwmeester HJ. 2016. Metabolomics in the Rhizosphere: Tapping into Belowground Chemical Communication. Trends in Plant Science **21**, 256–265.

Danneberg G, Latus C, Zimmer W, Hundeshagen B, Schneider-Poetsch H, Bothe H. 1993. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on phytohormone balances in maize (Zea mays L.). Journal of Plant Physiology **141**, 33–39.

Daubert, T. E.□; Danner RP. 1990. Physical and thermodynamic properties of pure chemicals: data compilation. Choice Reviews Online **27**, 27-3319-27–3319.

Dean J V., Mohammed LA, Fitzpatrick T. 2005. The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. Planta **221**, 287–296.

Debi BR, Taketa S, Ichii M. 2005. Cytokinin inhibits lateral root initiation but stimulates lateral root elongation in rice (Oryza sativa). Journal of Plant Physiology **162**, 507–515.

Declerck S, Strullu DG, Plenchette C. 1996. In vitro mass-production of the arbuscular mycorrhizal fungus, Glomus versiforme, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. Mycological Research **100**, 1237–1242.

Degani O, Drori R, Goldblat Y. 2014. Plant growth hormones suppress the development of Harpophora maydis, the cause of late wilt in maize. Physiology and Molecular Biology of Plants **21**, 137–149.

Delaux PM, Varala K, Edger PP, Coruzzi GM, Pires JC, Ané JM. 2014. Comparative Phylogenomics Uncovers the Impact of Symbiotic Associations on Host Genome Evolution. PLoS Genetics **10**, 1004487.

Delker C, Stenzel I, Hause B, Miersch O, Feussner I, Wasternack C. 2006. Jasmonate Biosynthesis in Arabidopsis thaliana - Enzymes, Products, Regulation. Plant Biology **8**, 297–306.

Dempsey DA, Vlot AC, Wildermuth MC, Klessig DF. 2011. Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism. The Arabidopsis Book **9**, e0156.

Desjardins AE, Manandhar HK, Plattner RD, Manandhar GG, Poling SM, Maragos CM. 2000. Fusarium species from nepalese rice and production of mycotoxins and gibberellic acid by selected species. Applied and Environmental Microbiology **66**, 1020–1025.

Dimasi-Theriou K, Economou AS, Sfakiotakis EM. 1993. Promotion of petunia (Petunia hybrida L.) regeneration in vitro by ethylene. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **32**, 219–225.

Ding J, Mao L-J, Wang S-T, Yuan B-F, Feng Y-Q. 2013. Determination of Endogenous Brassinosteroids in Plant Tissues Using Solid-phase Extraction with Double Layered Cartridge Followed by High-performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Phytochemical Analysis **24**, 386–394.

Dole M, Hines RL, Mack LL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB. 1968. Gas phase macroions. Macromolecules **1**, 96–97.

Domon B, Aebersold R. 2006. Mass spectrometry and protein analysis. Science **312**, 212–217.

Drábková LZ, Dobrev PI, Motyka V. 2015. Phytohormone profiling across the bryophytes. PLoS ONE **10**.

Dunwell JM, Purvis A, Khuri S. 2004. Cupins: The most functionally diverse protein superfamily? Phytochemistry **65**, 7–17.

El-Aneed A, Cohen A, Banoub J. 2009. Mass spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. Applied Spectroscopy Reviews **44**, 210–230.

Emery RJN, Leport L, Barton JE, Turner NC, Atkins CA. 1998. Cis-isomers of cytokinins predominate in chickpea seeds throughout their development. Plant Physiology **117**, 1515–1523.

Esch H, Hundeshagen B, Schneider-Poetsch H, Bothe H. 1994. Demonstration of abscisic acid in spores and hyphae of the arbuscular-mycorrhizal fungus Glomus and in the N2-fixing cyanobacterium Anabaena variabilis. Plant Science **99**, 9–16.

Etemadi M, Gutjahr C, Couzigou JM, Zouine M, Lauressergues D, Timmers A, Audran C, Bouzayen M, Bécard G, Combier JP. 2014. Auxin perception is required for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis. Plant Physiology **166**, 281–292.

Ezawa T, Smith SE, Andrew Smith F. 2001. Differentiation of polyphosphate metabolism between the extra- and intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist **149**, 555–563.

Fang N, Yu S, Ronis MJJ, Badger TM. 2015. Matrix effects break the LC behavior rule for analytes in LC-MS/MS analysis of biological samples. Experimental Biology and Medicine **240**, 488–497.

Feng F, Sun J, Radhakrishnan G V, *et al.* 2019. A combination of chitooligosaccharide and lipochitooligosaccharide recognition promotes arbuscular mycorrhizal associations in Medicago truncatula. Nature Communications **10**.

Field KJ, Cameron DD, Leake JR, Tille S, Bidartondo MI, Beerling DJ. 2012. Contrasting arbuscular mycorrhizal responses of vascular and non-vascular plants to a simulated Palaeozoic CO2 decline. Nature Communications **3**, 1–8.

Fiorilli V, Lanfranco L, Bonfante P. 2013. The expression of GintPT, the phosphate transporter of Rhizophagus irregularis, depends on the symbiotic status and phosphate availability. Planta **237**, 1267–1277.

Fletcher JC. 1999. Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in Arabidopsis shoot meristems. Science **283**, 1911–1914.

Floss DS, Levy JG, Lévesque-Tremblay V, Pumplin N, Harrison MJ. 2013. DELLA proteins regulate arbuscule formation in arbuscular mycorrhizal symbiosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **110**, E5025–E5034.

Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R. 2009. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. Nature Chemical Biology **5**, 344–350.

Foo E. 2013*a*. Something old, something new: Auxin and strigolactone interact in the ancient mycorrhizal symbiosis. Plant Signaling and Behavior **8**.

Foo E. 2013*b*. Auxin influences strigolactones in pea mycorrhizal symbiosis. Journal of Plant Physiology **170**, 523–528.

Foo E, Davies NW. 2011. Strigolactones promote nodulation in pea. Planta **234**, 1073–1081.

Foo E, McAdam EL, Weller JL, Reid JB. 2016. Interactions between ethylene, gibberellins, and brassinosteroids in the development of rhizobial and mycorrhizal symbioses of pea. Journal of Experimental Botany **67**, 2413–2424.

Foo E, Ross JJ, Jones WT, Reid JB. 2013*a*. Plant hormones in arbuscular mycorrhizal symbioses: An emerging role for gibberellins. Annals of Botany **111**, 769–779.

Foo E, Yoneyama K, Hugill CJ, Quittenden LJ, Reid JB. 2013*b*. Strigolactones and the regulation of pea symbioses in response to nitrate and phosphate deficiency. Molecular Plant **6**, 76–87.

Forbes PJ, Millam S, Hooker JE, Harrier LA. 1998. Transformation of the arbuscular mycorrhiza Gigaspora rosea by particle bombardment. Mycological Research **102**, 497–501.

Fortin JA, Declerck S, Strullu D-G. 2005. In Vitro Culture of Mycorrhizas. In Vitro Culture of

Mycorrhizas. Springer-Verlag, 3–14.

Fracetto GGM, Peres LEP, Lambais MR. 2017. Gene expression analyses in tomato near isogenic lines provide evidence for ethylene and abscisic acid biosynthesis fine-tuning during arbuscular mycorrhiza development. Archives of Microbiology **199**, 787–798.

Fracetto GGM, Peres LEP, Mehdy MC, Lambais MR. 2013. Tomato ethylene mutants exhibit differences in arbuscular mycorrhiza development and levels of plant defense-related transcripts. Symbiosis **60**, 155–167.

Frankenberger WT, Poth M. 1987. Biosynthesis of Indole-3-Acetic Acid by the Pine Ectomycorrhizal Fungus Pisolithus tinctorius. Applied and Environmental Microbiology **53**, 2908–2913.

Frankland B, Wareing PF. 1960. Effect of Gibberellic Acid on Hypocotyl Growth of Lettuce Seedlings. Nature **185**, 255–256.

Frey B, Vilariño A, SchÜepp H, Arines J. 1994. Chitin and ergosterol content of extraradical and intraradical mycelium of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices. Soil Biology and Biochemistry **26**, 711–717.

Fu J, Xiaohong S, Wang J, Jinfang C, Cunyu Y. 2011. Progress in quantitative analysis of plant hormones. Chinese Sci Bull **56**, 355–366.

Fujii H, Verslues PE, Zhu J-K. 2007. Identification of Two Protein Kinases Required for Abscisic Acid Regulation of Seed Germination, Root Growth, and Gene Expression in *Arabidopsis*. The Plant Cell **19**, 485–494.

Fujioka S, Yokota T. 2003. Biosynthesis and Metabolism of Brassinosteroids. Annual Review of Plant Biology **54**, 137–164.

Fukuda H. 2004. Signals that control plant vascular cell differentiation. Nature Reviews Molecular Cell Biology **5**, 379–391.

Fukuda H, Ogawa T, Tanase S. 1993. Ethylene production by micro-organisms. Advances in Microbial Physiology **35**, 275–306.

Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J. 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. Science **261**, 754–756.

Galland L. 2014. The gut microbiome and the brain. Journal of Medicinal Food **17**, 1261–1272.

Gancheva MS, Malovichko Y V., Poliushkevich LO, Dodueva IE, Lutova LA. 2019. Plant Peptide Hormones. Russian Journal of Plant Physiology **66**, 171–189.

García de Salamone IE, Hynes RK, Nelson LM. 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. Canadian Journal of Microbiology **47**, 404–411.

Gay G, Normand L, Marmeisse R, Sotta B, Debaud JC. 1994. Auxin overproducer mutants of Hebeloma cylindrosporum Romagnesi have increased mycorrhizal activity. New Phytologist **128**, 645–657.

Geil RD, Guinel FC. 2002. Effects of elevated substrate-ethylene on colonization of leek (Allium porrum) by the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus aggregatum. Canadian Journal of Botany **80**, 114–119.

Geil RD, Peterson RL, Guinel FC. 2001. Morphological alterations of pea (Pisum sativum cv. Sparkle) arbuscular mycorrhizas as a result of exogenous ethylene treatment. Mycorrhiza **11**, 137–143.

Genre A, Chabaud M, Balzergue C, *et al.* 2013. Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca2+ spiking in Medicago truncatula roots and their production is enhanced by strigolactone. New Phytologist **198**, 190–202.

Genre A, Chabaud M, Faccio A, Barker DG, Bonfante P. 2008. Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both Medicago truncatula and Daucus carota. Plant Cell **20**, 1407–1420.

Genre A, Chabaud M, Timmers T, Bonfante P, Barker DG. 2005. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Elicit a Novel Intracellular Apparatus in Medicago truncatula Root Epidermal Cells before Infection W. The Plant Cell **17**, 3489–3499.

Genre A, Ivanov S, Fendrych M, Faccio A, □árský V, Bisseling T, Bonfante P. 2012. Multiple exocytotic markers accumulate at the sites of perifungal membrane biogenesis in arbuscular mycorrhizas. Plant and Cell Physiology **53**, 244–255.

El Ghachtouli N, Martin-Tanguy J, Paynot M, Gianinazzi S. 1996. First-report of the inhibition of arbuscular mycorrhizal infection of *Pisum sativum* by specific and irreversible inhibition of polyamine biosynthesis or by gibberellic acid treatment. FEBS Letters **385**, 189–192.

Giovannetti M. 2000. Spore Germination and Pre-Symbiotic Mycelial Growth. Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function. Springer Netherlands, 47–68.

Giovannetti M, Balestrini R, Volpe V, Guether M, Straub D, Costa A, Ludewig U, Bonfante P. 2012. Two putative-aquaporin genes are differentially expressed during arbuscular mycorrhizal symbiosis in Lotus japonicus. BMC Plant Biology **12**.

Giovannetti M, Mari A, Novero M, Bonfante P. 2015. Early Lotus japonicus root transcriptomic responses to symbiotic and pathogenic fungal exudates. Frontiers in Plant Science **6**, 480.

Giovannetti M, Sbrana C, Citernesi AS, Avio L. 1996. Analysis of factors involved in fungal recognition responses to host-derived signals by arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist **133**, 65–71.

Glauser G, Grata E, Dubugnon L, Rudaz S, Farmer EE, Wolfender JL. 2008. Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in Arabidopsis in response to wounding. Journal of Biological Chemistry **283**, 16400–16407.

Glick BR. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Canadian Journal of Microbiology **41**, 109–117.

Glick BR. 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. FEMS Microbiology Letters **251**, 1–7.

Glickmann E, Gardan L, Jacquet S, Hussain S, Elasri M, Petit A, Dessaux Y. 1998. Auxin production is a common feature of most pathovars of Pseudomonas syringae. Molecular Plant-Microbe Interactions **11**, 156–162.

Goh DM, Cosme M, Kisiala AB, Mulholland S, Said ZMF, Spíchal L, Emery RJN, Declerck S, Guinel FC. 2019. A Stimulatory Role for Cytokinin in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis of Pea. Frontiers in Plant Science **10**.

Golldack D, Li C, Mohan H, Probst N. 2013. Gibberellins and abscisic acid signal crosstalk: Living and developing under unfavorable conditions. Plant Cell Reports **32**, 1007–1016.

Golovko A, Sitbon F, Tillberg E, Nicander B. 2002. Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from Arabidopsis thaliana. Plant Molecular Biology **49**, 161–169.

Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, *et al.* 2008. Strigolactone inhibition of shoot branching. Nature **455**, 189–194.

Gomez-Roldan V, Roux C, Girard D, Bécard G, Puech-Pagés V. 2007. Strigolactones: Promising plant signals. Plant Signaling and Behavior **2**, 163–164.

González-García MP, Vilarrasa-Blasi J, Zhiponova M, Divol F, Mora-García S, Russinova E, Caño-Delgado AI. 2011. Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in Arabidopsis roots. Development **138**, 849–859.

Gosling P, Hodge A, Goodlass G, Bending GD. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. Agriculture, Ecosystems & Environment **113**, 17–35.

Gough C, Cullimore J. 2011. Lipo-chitooligosaccharide signaling in endosymbiotic plant-microbe interactions. Molecular Plant-Microbe Interactions **24**, 867–878.

Govindarajulu M, Pfeffer PE, Jin H, Abubaker J, Douds DD, Allen JW, Bücking H, Lammers PJ, Shachar-Hill Y. 2005. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Nature **435**, 819–823.

Graham JH. 1982. Effect of Citrus Root Exudates on Germination of Chlamydospores of the Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungus, Glomus Epigaeum. Mycologia **74**, 831–835.

Greco M, Chiappetta A, Bruno L, Bitonti MB. 2012. In Posidonia oceanica cadmium induces changes in DNA methylation and chromatin patterning. Journal of Experimental Botany **63**, 695–709.

Griesmann M, Chang Y, Liu X, *et al.* 2018. Phylogenomics reveals multiple losses of nitrogen-fixing root nodule symbiosis. Science **361**.

Guillotin B, Etemadi M, Audran C, Bouzayen M, Bécard G, Combier JP. 2017. Sl-IAA27 regulates strigolactone biosynthesis and mycorrhization in tomato (var. MicroTom). New Phytologist **213**, 1124–

1132.

Gupta S, Seth R, Sharma A. 2017. Plant growth-promoting rhizobacteria play a role as phytostimulators for sustainable agriculture. Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture. Springer Singapore, 475–793.

Gutjahr C, Paszkowski U. 2009. Weights in the balance: Jasmonic acid and Salicylic acid signaling in root-biotroph interactions. Molecular Plant-Microbe Interactions **22**, 763–772.

Gutjahr C, Radovanovic D, Geoffroy J, *et al.* 2012. The half-size ABC transporters STR1 and STR2 are indispensable for mycorrhizal arbuscule formation in rice. Plant Journal **69**, 906–920.

Gutjahr C, Siegler H, Haga K, Iino M, Paszkowski U. 2015. Full Establishment of Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis in Rice Occurs Independently of Enzymatic Jasmonate Biosynthesis.

Haag AM. 2016. Mass analyzers and mass spectrometers. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer New York LLC, 157–169.

Halouzka R, Tarkowski P, Zwanenburg B, Ćavar Zeljković S. 2018. Stability of strigolactone analog GR24 toward nucleophiles. Pest Management Science **74**, 896–904.

Hamiaux C, Drummond RSM, Janssen BJ, Ledger SE, Cooney JM, Newcomb RD, Snowden KC. 2012. DAD2 is an α/β hydrolase likely to be involved in the perception of the plant branching hormone, strigolactone. Current Biology **22**, 2032–2036.

Hanlon MT, Coenen C. 2011. Genetic evidence for auxin involvement in arbuscular mycorrhiza initiation. New Phytologist **189**, 701–709.

Harrison MJ, Dewbre GR, Liu J. 2002. A phosphate transporter from Medicago truncatula involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Cell **14**, 2413–2429.

Harrison MJ, Ivanov S. 2017. Exocytosis for endosymbiosis: membrane trafficking pathways for development of symbiotic membrane compartments. Current Opinion in Plant Biology **38**, 101–108.

Hartmann M, Voß S, Requena N. 2020. Host-Induced Gene Silencing of Arbuscular Mycorrhizal Fungal Genes via Agrobacterium rhizogenes-Mediated Root Transformation in Medicago truncatula. Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc., 239–248.

Haruta M, Sussman MR. 2017. Ligand Receptor-Mediated Regulation of Growth in Plants. Current Topics in Developmental Biology. Academic Press Inc., 331–363.

Hassan Dar G, Zargar MY, Beigh GM. 1997. Biocontrol of Fusarium root rot in the common bean (Phaseolus vulgaris L.) by using Symbiotic Glomus mosseae and Rhizobium leguminosarum. Microbial Ecology **34**, 74–80.

Hayashi T, Banba M, Shimoda Y, Kouchi H, Hayashi M, Imaizumi-Anraku H. 2010. A dominant function of CCaMK in intracellular accommodation of bacterial and fungal endosymbionts. Plant Journal **63**, 141–154.

Hedden P, Sponsel V. 2015. A Century of Gibberellin Research. Journal of Plant Growth Regulation **34**, 740–760.

Hedden P, Thomas SG. 2012. Gibberellin biosynthesis and its regulation. Biochemical Journal **444**, 11–25.

van der Heijden MGA, Bardgett RD, van Straalen NM. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. Ecology Letters **11**, 296–310.

Helber N, Requena N. 2007. Expression of the fluorescence markers DsRed and GFP fused to a nuclear localization signal in the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices. New Phytologist **0**, 071107070910004-???

Helber N, Wippel K, Sauer N, Schaarschmidt S, Hause B, Requena N. 2011. A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus sp is crucial for the symbiotic relationship with plants. Plant Cell **23**, 3812–3823.

Hennig J, Malamy J, Grynkiewicz G, Indulski J, Klessig DF. 1993. Interconversion of the salicylic acid signal and its glucoside in tobacco. Plant Journal **4**, 593–600.

Le Henry M, Charton M, Alignan M, Maury P, Luniov A, Pelletier I, Pontalier PY, Binder BM, Vaca-Garcia C, Chervin C. 2017. Ethylene stimulates growth and affects fatty acid content of Synechocystis sp. PCC 6803. Algal Research **26**, 234–239.

Hérivaux A, Dugé de Bernonville T, Roux C, *et al.* 2017. The Identification of Phytohormone Receptor Homologs in Early Diverging Fungi Suggests a Role for Plant Sensing in Land Colonization by Fungi (JW Taylor, Ed.). mBio **8**, e01739-16.

Herrera-Medina MJ, Steinkellner S, Vierheilig H, Ocampo Bote JA, García Garrido JM. 2007. Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. New Phytologist **175**, 554–564.

Herrera-Medina MJ, Tamayo MI, Vierheilig H, Ocampo JA, García-Garrido JM. 2008. The Jasmonic Acid Signalling Pathway Restricts the Development of the Arbuscular Mycorrhizal Association in Tomato. Journal of Plant Growth Regulation **27**, 221–230.

Herrera Medina MJ, Gagnon H, Piché Y, Ocampo JA, García Garrido JM, Vierheilig H. 2003. Root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi is affected by the salicylic acid content of the plant. Plant Science **164**, 993–998.

Hewitt EJ, Notton BA. 1966. Effect of Substituted Uracil Derivatives on Induction of Nitrate Reductase in Plants. Biochemical Journal **101**, 39C-40C.

Hijikata N, Murase M, Tani C, Ohtomo R, Osaki M, Ezawa T. 2010. Polyphosphate has a central role in the rapid and massive accumulation of phosphorus in extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus. New Phytologist **186**, 285–289.

Hildebrandt U, Janetta K, Bothe H. 2002. Towards growth of arbuscular mycorrhizal fungi independent of a plant host. Applied and Environmental Microbiology **68**, 1919–1924.

Hilhorst HWM. 1995. A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. Seed Science Research **5**, 61–73.

Hirakawa Y, Torii KU, Uchida N. 2017. Mechanisms and Strategies Shaping Plant Peptide Hormones. Plant & cell physiology **58**, 1313–1318.

Hori S. 1898. Some observations on "bakanae" disease of the rice plant. Mem Agric Res Sta Tokyo **12**, 110–119.

Hosny M, Gianinazzi-Pearson V, Dulieu H. 1998. Nuclear DNA content of 11 fungal species in Glomales. Genome **41**, 422–428.

Hottiger T, Boller T. 1991. Ethylene biosynthesis in Fusarium oxysporum f. sp. tulipae proceeds from glutamate/2-oxoglutarate and requires oxygen and ferrous ions in vivo. Archives of Microbiology **157**, 18–22.

Hou B, Lim EK, Higgins GS, Bowles DJ. 2004. N-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of Arabidopsis thaliana. Journal of Biological Chemistry **279**, 47822–47832.

Houben M, Van de Poel B. 2019. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACO): The enzyme that makes the plant hormone ethylene. Frontiers in Plant Science **10**, 695.

Howe GA. 2004. Jasmonates as signals in the wound response. Journal of Plant Growth Regulation **23**, 223–237.

Hoyerova K, Gaudinova A, Malbeck J, *et al.* 2006. Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. Phytochemistry **67**, 1151–1159.

Hsu YT, Kao CH. 2003. Role of abscisic acid in cadmium tolerance of rice (Oryza sativa L.) seedlings. Plant, Cell and Environment **26**, 867–874.

Hunter DA, Yoo SD, Butcher SM, McManus MT. 1999. Expression of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase during Leaf Ontogeny in White Clover. Plant Physiology **120**, 131–142.

Huo F, Wang X, Han Y, Bai Y, Zhang W, Yuan H, Liu H. 2012. A new derivatization approach for the rapid and sensitive analysis of brassinosteroids by using ultra high performance liquid chromatography-electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. Talanta **99**, 420–425.

Illana A, García-Garrido JM, Sampedro I, Ocampo JA, Vierheilig H. 2011. Strigolactones seem not to be involved in the nonsusceptibilty of arbuscular mycorrhizal (AM) nonhost plants to AM fungi. Botany **89**, 285–288.

Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Kakimoto T. 2001. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. Nature **409**, 1060–1063.

Iribarne J V., Thomson BA. 1976. On the evaporation of small ions from charged droplets. The Journal of Chemical Physics **64**, 2287–2294.

Ishii T, Shrestha YH, Matsumoto I, Kadoya K. 1996. Effect of ethylene on the growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and on the mycorrhizal formation of trifoliate orange roots. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science **65**, 525–529.

Ito Y, Nakanomyo I, Motose H, Iwamoto K, Sawa S, Dohmae N, Fukuda H. 2006. Dodeca-CLE as peptides as suppressors of plant stem cell differentiation. Science **313**, 842–845.

Izumi Y, Okazawa A, Bamba T, Kobayashi A, Fukusaki E. 2009. Development of a method for comprehensive and quantitative analysis of plant hormones by highly sensitive nanoflow liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. Analytica Chimica Acta **648**, 215–225.

Jacobsen J V, Mcglasson WB, Selby HB. 1970. *Ethylene Production by Autoclaved Rubber Injection Caps Used in Biological Systems*.

Jameson PE. 2000. Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions - An overview. Plant Growth Regulation. Springer, 369–380.

Javot H, Penmetsa RV, Terzaghi N, Cook DR, Harrison MJ. 2007. A Medicago truncatula phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**, 1720–1725.

Jentschel K, Thiel D, Rehn F, Ludwig-Müller J. 2006. Arbuscular mycorrhiza enhances auxin levels and alters auxin biosynthesis in Tropaeolum majus during early stages of colonization. Physiologia Plantarum **129**, 320–333.

Jiang CJ, Shimono M, Sugano S, Kojima M, Yazawa K, Yoshida R, Lnoue H, Hayashi N, Sakakibara H, Takatsuji H. 2010. Abscisic acid interacts antagonistically with salicylic acid signaling pathway in rice-magnaporthe grisea interaction. Molecular Plant-Microbe Interactions **23**, 791–798.

Jiang Y, Wang W, Xie Q, *et al.* 2017. Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi. Science **356**, 1172–1173.

Jones JMC, Clairmont L, Macdonald ES, Weiner CA, Emery RJN, Guinel FC. 2015. E151 (sym15), a pleiotropic mutant of pea (Pisum sativum L.), displays low nodule number, enhanced mycorrhizae, delayed lateral root emergence, and high root cytokinin levels. Journal of Experimental Botany **66**, 4047–4059.

Kakimoto T. 2001. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. Plant and Cell Physiology **42**, 677–685.

Kameoka H, Tsutsui I, Saito K, Kikuchi Y, Handa Y, Ezawa T, Hayashi H, Kawaguchi M, Akiyama K. 2019. Stimulation of asymbiotic sporulation in arbuscular mycorrhizal fungi by fatty acids. Nature Microbiology **4**, 1654–1660.

Karabaghli C, Frey-Klett P, Sotta B, Bonnet M, Le Tacon F. 1998. In vitro effects of Laccaria bicolor S238 N and Pseudomonas fluorescens strain BBc6 on rooting of de-rooted shoot hypocotyls of Norway spruce. Tree Physiology **18**, 103–111.

Karavolos MH, Winzer K, Williams P, Khan CMA. 2013. Pathogen espionage: Multiple bacterial adrenergic sensors eavesdrop on host communication systems. Molecular Microbiology **87**, 455–465.

Karssen CM, Zagorski S, Kepczynski J, Groot SPC. 1989. Key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination. Annals of Botany **63**, 71–80.

Kasiamdari RS, Smith SE, Smith FA, Scott ES. 2002. Influence of the mycorrhizal fungus, Glomus coronatum, and soil phosphorus on infection and disease caused by binucleate Rhizoctonia and Rhizoctonia solani on mung bean (Vigna radiata). Plant and Soil **238**, 235–244.

Kazan K. 2015. Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. Trends in Plant Science **20**, 219–229.

Kazan K, Lyons R. 2014. Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors. Plant Cell **26**, 2285–2309.

Keller BO, Sui J, Young AB, Whittal RM. 2008. Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. Analytica Chimica Acta **627**, 71–81.

Kępczyńska E. 1994. Involvement of ethylene in spore germination and mycelial growth of Alternaria alternata. Mycological Research **98**, 118–120.

Keymer A, Pimprikar P, Wewer V, *et al.* 2017. Lipid transfer from plants to arbuscular mycorrhiza fungi. eLife **6**.

Khalloufi M, Martínez-Andújar C, Lachaâl M, Karray-Bouraoui N, Pérez-Alfocea F, Albacete A. 2017. The interaction between foliar GA3 application and arbuscular mycorrhizal fungi inoculation improves growth in salinized tomato (Solanum lycopersicum L.) plants by modifying the hormonal balance. Journal of Plant Physiology **214**, 134–144.

Khan NA. 2005. The influence of exogenous ethylene on growth and photosynthesis of mustard (Brassica juncea) following defoliation. Scientia Horticulturae **105**, 499–505.

Khatabi B, Schäfer P. 2012. Ethylene in mutualistic symbioses. Plant Signaling & Behavior **7**, 1634–1638.

Kieber JJ, Schaller GE. 2014. Cytokinins. The Arabidopsis Book **12**, e0168.

Kikuchi Y, Hijikata N, Ohtomo R, Handa Y, Kawaguchi M, Saito K, Masuta C, Ezawa T. 2016. Aquaporin-mediated long- distance polyphosphate translocation directed towards the host in arbuscular mycorrhizal symbiosis: application of virus-induced gene silencing. New Phytologist **211**, 1202–1208.

Kim EH, Kim SH, Chung JI, Chi HY, Kim JA, Chung IM. 2006. Analysis of phenolic compounds and isoflavones in soybean seeds (Glycine max (L.) Merill) and sprouts grown under different conditions. European Food Research and Technology **222**, 201–208.

Kind T, Tsugawa H, Cajka T, *et al.* 2018. Identification of small molecules using accurate mass MS/MS search. Mass Spectrometry Reviews **37**, 513–532.

Kirwa HK, Murungi LK, Beck JJ, Torto B. 2018. Elicitation of Differential Responses in the Root-Knot Nematode Meloidogyne incognita to Tomato Root Exudate Cytokinin, Flavonoids, and Alkaloids. Journal of Agricultural and Food Chemistry **66**, 11291–11300.

Kobae Y. 2019. The Infection Unit: An Overlooked Conceptual Unit for Arbuscular Mycorrhizal Function. Root Biology - Growth, Physiology, and Functions. IntechOpen, .

Kobae Y, Tamura Y, Takai S, Banba M, Hata S. 2010. Localized expression of arbuscular mycorrhiza-inducible ammonium transporters in soybean. Plant and Cell Physiology **51**, 1411–1415.

Koegel S, Ait Lahmidi N, Arnould C, Chatagnier O, Walder F, Ineichen K, Boller T, Wipf D, Wiemken A, Courty PE. 2013. The family of ammonium transporters (AMT) in Sorghum bicolor: Two AMT members are induced locally, but not systemically in roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist **198**, 853–865.

Kohli A, Sreenivasulu N, Lakshmanan P, Kumar PP. 2013. The phytohormone crosstalk paradigm takes center stage in understanding how plants respond to abiotic stresses. Plant Cell Reports **32**, 945–957.

Koide RT, Goff MD, Dickie IA. 2000. Component growth efficiencies of mycorrhizal and nonmycorrhizal plants. New Phytologist **148**, 163–168.

Kojima M, Kamada-Nobusada T, Komatsu H, *et al.* 2009. Highly sensitive and high-throughput analysis of plant hormones using ms-probe modification and liquid chromatographytandem mass spectrometry: An application for hormone profiling in oryza sativa. Plant and Cell Physiology **50**, 1201–1214.

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

Kong CH, Zhang SZ, Li YH, Xia ZC, Yang XF, Meiners SJ, Wang P. 2018. Plant neighbor detection and allelochemical response are driven by root-secreted signaling chemicals. Nature Communications **9**, 3867.

Koo AJK, Howe GA. 2012. Catabolism and deactivation of the lipid-derived hormone jasmonoyl-isoleucine. Frontiers in Plant Science **3**.

Korasick DA, Enders TA, Strader LC. 2013. Auxin biosynthesis and storage forms. Journal of experimental botany **64**, 2541–55.

Koske RE. 1981. Multiple germination by spores of Gigaspora gigantea. Transactions of the British Mycological Society **76**, 328–330.

Kosuta S, Hazledine S, Sun J, Miwa H, Morris RJ, Downie JA, Oldroyd GED. 2008. *Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes*.

Kountche BA, Novero M, Jamil M, Asami T, Bonfante P, Al-Babili S. 2018. Effect of the strigolactone analogs methyl phenlactonoates on spore germination and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi. Heliyon **4**, e00936.

Ku YS, Sintaha M, Cheung MY, Lam HM. 2018. Plant hormone signaling crosstalks between biotic and abiotic stress responses. International Journal of Molecular Sciences **19**.

Kudo T, Kiba T, Sakakibara H. 2010. Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. Journal of Integrative Plant Biology **52**, 53–60.

Kudoyarova G, Arkhipova T, Korshunova T, Bakaeva M, Loginov O, Dodd IC. 2019. Phytohormone Mediation of Interactions Between Plants and Non-Symbiotic Growth Promoting Bacteria Under Edaphic Stresses. Frontiers in Plant Science **10**.

Kulkarni GB, Sanjeevkumar S, Kirankumar B, Santoshkumar M, Karegoudar TB. 2013. Indole-3-acetic acid biosynthesis in Fusarium delphinoides strain GPK, a causal agent of wilt in chickpea. Applied Biochemistry and Biotechnology **169**, 1292–1305.

Kurakawa T, Ueda N, Maekawa M, Kobayashi K, Kojima M, Nagato Y, Sakakibara H, Kyozuka J. 2007. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. Nature **445**, 652–655.

Kurepa J, Shull TE, Smalle JA. 2019. Antagonistic activity of auxin and cytokinin in shoot and root organs. Plant Direct **3**, e00121.

Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S, Asami T, Hirai N, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E. 2004. The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8′ -hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. The EMBO Journal **23**, 1647–1656.

Kyozuka J. 2007. Control of shoot and root meristem function by cytokinin. Current Opinion in Plant Biology **10**, 442–446.

Laffont C, Rey T, André O, Novero M, Kazmierczak T, Debellé F, Bonfante P, Jacquet C, Frugier F. 2015. The CRE1 Cytokinin Pathway Is Differentially Recruited Depending on Medicago truncatula Root Environments and Negatively Regulates Resistance to a Pathogen.

Leake J, Johnson D, Donnelly D, Muckle G, Boddy L, Read D. 2004. Networks of power and influence: The role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. Canadian Journal of Botany.1016–1045.

Lee KH, Piao HL, Kim HY, Choi SM, Jiang F, Hartung W, Hwang I, Kwak JM, Lee IJ, Hwang I. 2006. Activation of Glucosidase via Stress-Induced Polymerization Rapidly Increases Active Pools of Abscisic Acid. Cell **126**, 1109–1120.

Lei Z, Huhman D V, Sumner LW. 2011. Mass Spectrometry Strategies in Metabolomics *.

Leibar-Porcel E, McAinsh MR, Dodd IC. 2020. Phytohormone profiles of lettuce and pepper grown aeroponically with elevated root-zone carbon dioxide concentrations. Agronomy **10**, 665.

Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, Promé JC, Dénarié J. 1990. Symbiotic host-specificity of Rhizobium meliloti is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. Nature **344**, 781–784.

Letham DS. 1971. Regulators of Cell Division in Plant Tissues XII. A Cytokinin Bioassay Using Excised Radish Cotyledons. Physiologia Plantarum **25**, 391–396.

Li T, Hu YJ, Hao ZP, Li H, Wang YS, Chen BD. 2013. First cloning and characterization of two functional aquaporin genes from an arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices. New Phytologist **197**, 617–630.

Li J, Xiao LT, Zeng GM, Huang GH, Shen GL, Yu RQ. 2005. Immunosensor for rapid detection of gibberellin acid in the rice grain. Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**, 1348–1353.

Lim CW, Baek W, Jung J, Kim JH, Lee SC. 2015. Function of ABA in stomatal defense against biotic and drought stresses. International Journal of Molecular Sciences **16**, 15251–15270.

Liu JF, Ding J, Yuan BF, Feng YQ. 2014*a*. Magnetic solid phase extraction coupled with in situ derivatization for the highly sensitive determination of acidic phytohormones in rice leaves by UPLC-MS/MS. Analyst **139**, 5605–5613.

Liu X, Feng Z, Zhu H, Yao Q. 2019. Exogenous abscisic acid and root volatiles increase sporulation of

Rhizophagus irregularis DAOM 197198 in asymbiotic and pre-symbiotic status. Mycorrhiza **29**, 581–589.

Liu X, Hegeman AD, Gardner G, Cohen JD. 2012. Protocol: High-throughput and quantitative assays of auxin and auxin precursors from minute tissue samples. Plant Methods **8**.

Liu HT, Li YF, Luan TG, Lan CY, Shu WS. 2007. Simultaneous determination of phytohormones in plant extracts using SPME and HPLC. Chromatographia **66**, 515–520.

Liu Q, Parsons AJ, Xue H, Jones CS, Rasmussen S. 2013. Functional characterisation and transcript analysis of an alkaline phosphatase from the arbuscular mycorrhizal fungus Funneliformis mosseae. Fungal Genetics and Biology **54**, 52–59.

Liu CY, Srivastava AK, Wu QS. 2014*b*. Effect of auxin inhibitor and AMF inoculation on growth and root morphology of trifoliate orange (Poncirus trifoliata) seedlings. Indian Journal of Agricultural Sciences **84**, 1342–1346.

Liu Z, Yan JP, Li DK, Luo Q, Yan Q, Liu Z Bin, Ye LM, Wang JM, Li XF, Yang Y. 2015. UDP-glucosyltransferase71C5, a major glucosyltransferase, mediates abscisic acid homeostasis in Arabidopsis. Plant Physiology **167**, 1659–1670.

Ljung K, Sandberg G, Moritz T. 2010. Methods of plant hormone analysis. Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action! Springer Netherlands, 717–740.

Loria R, Kers J, Joshi M. 2006. Evolution of plant pathogenicity in Streptomyces. Annual Review of Phytopathology **44**, 469–487.

Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology **15**, 550.

Ludwig-Müller J, Bennett RN, García-Garrido JM, Piché Y, Vierheilig H. 2002. 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 **159**, 517–523.

Ludwig-Müller J, Kaldorf M, Sutter EG, Epstein E. 1997. Indole-3-butyric acid (IBA) is enhanced in young maize (Zea mays L.) roots colonized with the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices. Plant Science **125**, 153–162.

Luginbuehl LH, Menard GN, Kurup S, Van Erp H, Radhakrishnan G V., Breakspear A, Oldroyd GED, Eastmond PJ. 2017. Fatty acids in arbuscular mycorrhizal fungi are synthesized by the host plant. Science **356**, 1175–1178.

Luo X-T, Cai B-D, Chen X, Feng Y-Q. 2017. Improved methodology for analysis of multiple phytohormones using sequential magnetic solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

Maclean AM, Bravo A, Harrison MJ. 2017. *Plant signaling and metabolic pathways enabling arbuscular mycorrhizal symbiosis*. American Society of Plant Biologists.

MacMillan J. 2001. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. Journal of Plant Growth Regulation **20**, 387–442.

Maillet F, Poinsot V, André O, *et al.* 2011. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. Nature **469**, 58–64.

Makarov A, Scigelova M. 2010. Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. Journal of Chromatography A **1217**, 3938–3945.

Mandaokar A, Browse J. 2009. MYB108 acts together with MYB24 to regulate jasmonate-mediated stamen maturation in Arabidopsis. Plant Physiology **149**, 851–862.

Mandava NB. 1988. Plant Growth-Promoting Brassinosteroids. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **39**, 23–52.

Le Marquer M, Bécard G, Frei dit Frey N. 2019. Arbuscular mycorrhizal fungi possess a CLAVATA3/embryo surrounding region-related gene that positively regulates symbiosis. New Phytologist **222**, 1030–1042.

Martín-Rodríguez JÁ, León-Morcillo R, Vierheilig H, Ocampo JA, Ludwig-Müller J, García-Garrido JM. 2011. Ethylene-dependent/ethylene-independent ABA regulation of tomato plants colonized by arbuscular mycorrhiza fungi. New Phytologist **190**, 193–205.

Martín-Rodríguez JÁ, Ocampo JA, Molinero-Rosales N, Tarkowská D, Ruíz-Rivero O, García-Garrido JM. 2015. Role of gibberellins during arbuscular mycorrhizal formation in tomato: new insights revealed by endogenous quantification and genetic analysis of their metabolism in mycorrhizal roots. Physiologia Plantarum **154**, 66–81.

Martin FM, Uroz S, Barker DG. 2017. Ancestral alliances: Plant mutualistic symbioses with fungi and bacteria. Science **356**.

Martínez C, Pons E, Prats G, León J. 2004. Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development. Plant Journal **37**, 209–217.

Matsubayashi Y. 2014. Posttranslationally modified small-peptide signals in plants. Annual Review of Plant Biology **65**, 385–413.

Maurice N, Erdei L. 2018. Termite Gut Microbiome. Termites and Sustainable Management. Cham: Springer International Publishing, 69–99.

McKendrick SL, Leake JR, Read DJ. 2000. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: Transfer of carbon from ectomycorrhizal Salix repens and Betula pendula to the orchid Corallorhiza trifida through shared hyphal connections. New Phytologist **145**, 539–548.

Meixner C, Ludwig-Müller J, Miersch O, Gresshoff P, Staehelin C, Vierheilig H. 2005. Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supernodulating soybean mutant nts1007. Planta **222**, 709–715.

Mercy L, Lucic-Mercy E, Nogales A, Poghosyan A, Schneider C, Arnholdt-Schmitt B. 2017. A functional approach towards understanding the role of the mitochondrial respiratory Chain in an endomycorrhizal symbiosis. Frontiers in Plant Science **8**.

Miersch O, Neumerkel J, Dippe M, Stenzel I, Wasternack C. 2008. Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. New Phytologist **177**, 114–127.

Mohr PG, Cahill DM. 2003. Abscisic acid influences the susceptibility of Arabidopsis thaliana to Pseudomonas syringae pv. tomato and Peronospora parasitica. Functional Plant Biology **30**, 461–469.

Morris K, Mackerness SAH, Page T, Fred John C, Murphy AM, Carr JP, Buchanan-Wollaston V. 2000. Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. Plant Journal **23**, 677–685.

Morrison EN, Emery RJN, Saville BJ. 2015*a*. Phytohormone involvement in the Ustilago maydis- Zea mays pathosystem: Relationships between abscisic acid and cytokinin levels and strain virulence in infected cob tissue. PLoS ONE **10**.

Morrison EN, Knowles S, Hayward A, Greg Thorn R, Saville BJ, Emery RJN. 2015*b*. Detection of phytohormones in temperate forest fungi predicts consistent abscisic acid production and a common pathway for cytokinin biosynthesis. Mycologia **107**, 245–257.

Moubayidin L, Di Mambro R, Sabatini S. 2009. Cytokinin-auxin crosstalk. Trends in Plant Science **14**, 557–562.

Mugnier J, Mosse B. 1987. Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Infection in Transformed Root-Inducing T-DNA Roots Grown Axenically. Phytopathology **77**, 1045.

Mukherjee A, Ané J-MM. 2011. Germinating Spore Exudates from Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Molecular and Developmental Responses in Plants and Their Regulation by Ethylene. Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI **24**, 260–270.

Müller A, Düchting P, Weiler EW. 2002. A multiplex GC-MS/MS technique for the sensitive and quantitative single-run analysis of acidic phytohormones and related compounds, and its application to Arabidopsis thaliana. Planta **216**, 44–56.

Murphy A., Pryce-Jones E, Johnstone K, Ashby A. 1997. Comparison of cytokinin productionin vitrobyPyrenopeziza brassicaewith other plant pathogens. Physiological and Molecular Plant Pathology **50**, 53–65.

Nagata M, Yamamoto N, Miyamoto T, Shimomura A, Arima S, Hirsch AM, Suzuki A. 2016. Enhanced hyphal growth of arbuscular mycorrhizae by root exudates derived from high R/FR treated Lotus japonicus. Plant Signaling and Behavior **11**, e1187356.

Nakamura T, Kawanabe Y, Takiyama E, Takahashi N, Murayama T. 1978. Effects of auxin and gibberellin on conidial germination in neurospora crassa. Plant and Cell Physiology **19**, 705–709.

Nambara E, Marion-Poll A. 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. Annual Review of Plant Biology **56**, 165–185.

Nehls U. 2008. Mastering ectomycorrhizal symbiosis: The impact of carbohydrates. Journal of Experimental Botany.1097–1108.

Niranjan R, Mohan V, Rao VM. 2007. Effect of indole acetic acid on the synergistic interactions of Bradyrhizobium and Glomus fasciculatum on growth, nodulation, and nitrogen fixation of Dalbergia sissoo Roxb. Arid Land Research and Management **21**, 329–342.

Nobre T, Aanen DK. 2010. Dispersion and colonization by fungus-growing termites: Vertical transmission of the symbiont helps, but then...? Communicative and Integrative Biology **3**, 248–250.

Ogawa T, Takahashi M, Fujii T, Tazaki M, Fukuda H. 1990. The Role of NADH:Fe(III)EDTA Oxidoreductase in Ethylene Formation from 2-Keto-4-Methylthiobutyrate. Journal of Fermentation and Bioengineering **69**, 287–291.

Ogawara T, Higashi K, Kamada H, Ezura H. 2003. Ethylene advances the transition from vegetative growth to flowering in Arabidopsis thaliana. Journal of Plant Physiology **160**, 1335–1340.

Ohnishi T, Nomura T, Watanabe B, Ohta D, Yokota T, Miyagawa H, Sakata K, Mizutani M. 2006. Tomato cytochrome P450 CYP734A7 functions in brassinosteroid catabolism.

Ojha S, Chakraborty M, Chatterjee NC. 2012. Influence of salicylic acid and Glomus fasciculatum on fusarial wilt of tomato and brinjal. Archives of Phytopathology and Plant Protection **45**, 1599–1609.

Okamoto S, Shinohara H, Mori T, Matsubayashi Y, Kawaguchi M. 2013. Root-derived CLE glycopeptides control nodulation by direct binding to HAR1 receptor kinase. Nature Communications **4**.

Oldroyd GED. 2013. Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. Nature Reviews Microbiology **11**, 252–263.

Olsson PA, Johansen A. 2000. Lipid and fatty acid composition of hyphae and spores of arbuscular mycorrhizal fungi at different growth stages. Mycological Research **104**, 429–434.

Omoarelojie LO, Kulkarni MG, Finnie JF, Van Staden J. 2019. Strigolactones and their crosstalk with other phytohormones. Annals of Botany **124**, 749–767.

Overvoorde P, Fukaki H, Beeckman T. 2010. Auxin control of root development. Cold Spring Harbor perspectives in biology **2**.

Pan X, Welti R, Wang X. 2010. Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. Nature Protocols **5**, 986–992.

Park SY, Fung P, Nishimura N, *et al.* 2009. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. Science **324**, 1068–1071.

Park SW, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF. 2007. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. Science **318**, 113–116.

Paszkowski U. 2006. A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses 2006. New Phytologist **172**, 35–46.

Paszkowski U, Kroken S, Roux C, Briggs SP. 2002. Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**, 13324–13329.

Patkar RN, Benke PI, Qu Z, Chen YYC, Yang F, Swarup S, Naqvi NI. 2015. A fungal monooxygenase-derived jasmonate attenuates host innate immunity. Nature Chemical Biology **11**, 733–740.

Patten CL, Glick BR. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Canadian Journal of Microbiology **42**, 207–220.

Pearce G, Moura DS, Stratmann J, Ryan CA. 2001. Production of multiple plant hormones from a single polyprotein precursor. Nature **411**, 817–820.

Pearce G, Strydom D, Johnson S, Ryan CA. 1991. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. Science **253**, 895–898.

Pech JC, Latché A, Bouzayen M. 2010. Ethylene Biosynthesis. Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action! Dordrecht: Springer Netherlands, 115–136.

Pérez-Tienda J, Valderas A, Camañes G, García-Agustín P, Ferrol N. 2012. Kinetics of NH4+uptake by the arbuscular mycorrhizal fungus Rhizophagus irregularis. Mycorrhiza **22**, 485–491.

Perona JJ, David Brucer W. 1985. Kinetics of the Hydrolysis of Methyl Salicylate by Sodium Hydroxide. Industrial and Engineering Chemistry Process Design and Development **24**, 62–65.

Pfeffer PE, Douds DD, Bécard G, Shachar-Hill Y. 1999. Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. Plant Physiology **120**, 587–598.

Pimprikar P, Carbonnel S, Paries M, *et al.* 2016. A CCaMK-CYCLOPS-DELLA complex activates transcription of RAM1 to regulate arbuscule branching. Current Biology **26**, 987–998.

Piotrowska A, Bajguz A. 2011. Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates q.

Pirozynski KA, Malloch DW. 1975. The origin of land plants: A matter of mycotrophism. BioSystems **6**, 153–164.

Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Orešič M. 2010. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. BMC Bioinformatics **11**.

Pons S, Fournier S, Chervin C, Bécard G, Rochange S, Frei Dit Frey N, Puech Pagès V. 2020. Phytohormone production by the arbuscular mycorrhizal fungus Rhizophagus irregularis (RA Wilson, Ed.). PLOS ONE **15**, e0240886.

Porfírio S, Gomes da Silva MDR, Peixe A, Cabrita MJ, Azadi P. 2016. Current analytical methods for plant auxin quantification - A review. Analytica Chimica Acta **902**, 8–21.

Pozo MJ, Azcón-Aguilar C. 2007. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. Current Opinion in Plant Biology **10**, 393–398.

Pradko AG, Litvinovskaya RP, Sauchuk AL, Drach S V., Baranovsky A V., Zhabinskii VN, Mirantsova T V., Khripach VA. 2015. A new ELISA for quantification of brassinosteroids in plants. Steroids **97**, 78–86.

Prado MJ, Largo A, Domínguez C, González MV, Rey M, Centeno ML. 2014. Determination of abscisic acid and its glucosyl ester in embryogenic callus cultures of Vitis vinifera in relation to the maturation of somatic embryos using a new liquid chromatography-ELISA analysis method. Journal of Plant Physiology **171**, 852–859.

Primrose SB. 1977. Evaluation of the Role of Methional, 2-Keto-4-methylthiobutyric Acid and Peroxidase in Ethylene Formation by Escherichia coli. Journal of General Microbiology **98**, 519–528.

Pumplin N, Harrison MJ. 2009. Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in Medicago truncatula roots during arbuscular mycorrhizal symbiosis. Plant Physiology **151**, 809–819.

Rabie GH. 2005. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and kinetin on the response of mungbean plants to irrigation with seawater. Mycorrhiza **15**, 225–230.

Rajjou L, Belghazi M, Huguet R, Robin C, Moreau A, Job C, Job D. 2006. Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on arabidopsis seed germination and establishment of early defense mechanisms. Plant Physiology **141**, 910–923.

Rakitin VY, Karyagin V V., Rakitina TY, Prudnikova ON, Vlasov P V. 2008. UV-B stress-induced ABA production in Arabidopsis thaliana mutants defective in ethylene signal transduction pathway. Russian Journal of Plant Physiology **55**, 854–856.

Ramos L. 2012. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. Journal of Chromatography A **1221**, 84–98.

Rasmussen A, Heugebaert T, Matthys C, Deun R Van, Boyer FD, Goormachtig S, Stevens C, Geelen D. 2013. A fluorescent alternative to the synthetic strigolactone GR24. Molecular Plant **6**, 100–112.

Redecker D. 2000. Glomalean Fungi from the Ordovician. Science **289**, 1920–1921.

Reeve DR, Crozier A. 1980. Quantitative Analysis of Plant Hormones. Hormonal Regulation of Development I. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 203–280.

Regvar M, Gogala N, Zalar P. 1996. Effects of jasmonic acid on mycorrhizal Allium sativum. New Phytologist **134**, 703–707.

Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H. 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**, 11841–11843.

Rensing SA. 2020. How Plants Conquered Land. Cell **181**, 964–966.

Reymond P, Bodenhausen N, Van Poecke RMP, Krishnamurthy V, Dicke M, Farmer EE. 2004. A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. Plant Cell **16**, 3132–3147.

Rich MK, Nouri E, Courty PE, Reinhardt D. 2017. Diet of Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Bread and Butter? Trends in Plant Science **22**, 652–660.

Rikin A, Richmond AE. 1976. Amelioration of Chilling Injuries in Cucumber Seedlings by Abscisic Acid. Physiologia Plantarum **38**, 95–97.

de Román M, Fernández I, Wyatt T, Sahrawy M, Heil M, Pozo MJ. 2011. Elicitation of foliar resistance mechanisms transiently impairs root association with arbuscular mycorrhizal fungi. Journal of Ecology **99**, 36–45.

Ropars J, Toro KS, Noel J, *et al.* 2016. Evidence for the sexual origin of heterokaryosis in arbuscular mycorrhizal fungi. Nature Microbiology **1**, 1–9.

Ruegger M, Dewey E, Gray WM, Hobbie L, Turner J, Estelle M. 1998. The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. Genes and Development **12**, 198–207.

Rush TA, Puech-Pagès V, Bascaules A, *et al.* 2020. Lipo-chitooligosaccharides as regulatory signals of fungal growth and development. Nature Communications **11**, 3897.

Sakakibara H. 2006. CYTOKININS: Activity, Biosynthesis, and Translocation. Annual Review of Plant Biology **57**, 431–449.

Sankaran K, Wu HC. 1994. Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglyceryl moiety from phosphatidylglycerol. Journal of Biological Chemistry **269**, 19701–19706.

Santiago J, Brandt B, Wildhagen M, Hohmann U, Hothorn LA, Butenko MA, Hothorn M. 2016. Mechanistic insight into a peptide hormone signaling complex mediating floral organ abscission. eLife **5**.

Sauer M, Robert S, Kleine-Vehn J. 2013. Auxin: simply complicated. Journal of Experimental Botany **64**, 2565–2577.

Sawers RJH, Svane SF, Quan C, *et al.* 2017. Phosphorus acquisition efficiency in arbuscular mycorrhizal maize is correlated with the abundance of root-external hyphae and the accumulation of transcripts encoding PHT1 phosphate transporters. New Phytologist **214**, 632–643.

Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM. 1998. Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. Plant Physiology **116**, 447–453.

Schäfer M, Brütting C, Baldwin IT, Kallenbach M. 2016. High-throughput quantification of more than 100 primary- and secondary-metabolites, and phytohormones by a single solid-phase extraction based sample preparation with analysis by UHPLC–HESI–MS/MS. Plant Methods **12**, 30.

Schneider G, Schliemann W. 1994. *Gibberellin conjugates: an overview*.

Schuler MA, Werck-Reichhart D. 2003. Functional genomics of P450s. Annual Review of Plant Biology **54**, 629–667.

Schüßler A. 2002. *Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of Geosiphon pyriformis and arbuscular mycorrhizal fungi*.

Schüßler A, Schwarzott D, Walker C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and evolution. Mycological Research **105**, 1413–1421.

Schymanski EL, Jeon J, Gulde R, Fenner K, Ruff M, Singer HP, Hollender J. 2014. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: Communicating confidence. Environmental Science and Technology **48**, 2097–2098.

Selosse MA, Richard F, He X, Simard SW. 2006. Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses?

Trends in Ecology and Evolution **21**, 621–628.

Seto Y, Yamaguchi S. 2014. Strigolactone biosynthesis and perception. Current Opinion in Plant Biology **21**, 1–6.

Sharaf EF, Farrag AA. 2004. *Induced Resistance in Tomato Plants by IAA against Fusarium oxysporum lycopersici*.

Sheard LB, Tan X, Mao H, *et al.* 2010. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. Nature **468**, 400–407.

Shin S, Lv J, Fazio G, Mazzola M, Zhu Y. 2014. Transcriptional regulation of ethylene and jasmonate mediated defense response in apple (Malus domestica) root during Pythium ultimum infection. Horticulture Research **1**, 1.

Siciliano V, Genre A, Balestrini R, Cappellazzo G, Dewit PJGM, Bonfante P. 2007. Transcriptome Analysis of Arbuscular Mycorrhizal Roots during Development of the Prepenetration Apparatus 1[W]. Plant Physiology **144**, 1455–1466.

Simard SW, Perry DA, Jones MD, Myrold DD, Durall DM, Molina R. 1997. Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. Nature **388**, 579–582.

Šimura J, Antoniadi I, Široká J, Tarkowská D, Strnad M, Ljung K, Novák O. 2018. Plant Hormonomics: Multiple Phytohormone Profiling by Targeted Metabolomics. Plant Physiology **177**, 476–489.

Singh DP, Jermakow AM, Swain SM. 2002. Gibberellins are required for seed development and pollen tube growth in Arabidopsis. Plant Cell **14**, 3133–3147.

Smith S, Read D. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press.

Song Y, Wang M, Zeng R, Groten K, Baldwin IT. 2019. Priming and filtering of antiherbivore defences among Nicotiana attenuata plants connected by mycorrhizal networks. Plant Cell and Environment **42**, 2945–2961.

Song YY, Ye M, Li C, He X, Zhu-Salzman K, Wang RL, Su YJ, Luo SM, Zeng R Sen. 2015. Hijacking common mycorrhizal networks for herbivore-induced defence signal transfer between tomato plants. Scientific Reports **4**, 3915.

Song YY, Zeng R Sen, Xu JF, Li J, Shen X, Yihdego WG. 2010. Interplant Communication of Tomato Plants through Underground Common Mycorrhizal Networks (M Van der Heijden, Ed.). PLoS ONE **5**, e13324.

Spaepen S, Vanderleyden J. 2011. Auxin and plant-microbe interactions. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology **3**, 1–13.

Spatafora JW, Aime MC, Grigoriev I V., Martin F, Stajich JE, Blackwell M. 2017. The Fungal Tree of Life: From Molecular Systematics to Genome-Scale Phylogenies. The Fungal Kingdom. Washington, DC, USA: ASM Press, 1–34.

Spence CA, Lakshmanan V, Donofrio N, Bais HP. 2015. Crucial roles of abscisic acid biogenesis in virulence of rice blast fungus Magnaporthe oryzae. Frontiers in Plant Science **6**.

Splivallo R, Fischer U, Göbel C, Feussner I, Karlovsky P. 2009. Truffles regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene. Plant Physiology **150**, 2018–2029.

St-Arnaud M, Hamel C, Vimard B, Caron M, Fortin JA. 1996. Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices in an in vitro system in the absence of host roots. Mycological Research **100**, 328–332.

Stanga JP, Smith SM, Briggs WR, Nelson DC. 2013. SUPPRESSOR OF MORE AXILLARY GROWTH2 1 controls seed germination and seedling development in Arabidopsis. Plant Physiology **163**, 318–330.

Stitz M, Gase K, Baldwin IT, Gaquerel E. 2011. Ectopic expression of at JMT in Nicotiana attenuata: Creating a metabolic sink has tissue-specific consequences for the jasmonate metabolic network and silences downstream gene expression. Plant Physiology **157**, 341–354.

Sugawara S, Hishiyama S, Jikumaru Y, Hanada A, Nishimura T, Koshiba T, Zhao Y, Kamiya Y, Kasahara H. 2009. Biochemical analyses of indole-3-acetaldoximedependent auxin biosynthesis in

Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**, 5430–5435.

Sun Z, Song J, Xin X, Xie X, Zhao B. 2018. Arbuscular mycorrhizal fungal 14-3-3 proteins are involved in arbuscule formation and responses to abiotic stresses during AM symbiosis. Frontiers in Microbiology **9**.

Svačinová J, Novák O, Plačková L, Lenobel R, Holík J, Strnad M, Doležal K. 2012. A new approach for cytokinin isolation from Arabidopsis tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction. Plant Methods **8**.

Takahashi N, Kitamura H, Kawarada A, Seta Y, Takai M, Tamura S, Sumiki Y. 1955. Biochemical studies on "bakanae" fungus: Isolation of gibberellins and their properties: Relation between gibberellins, a1, a2 and gibberellic acid. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan **19**, 267–281.

Takeda N, Handa Y, Tsuzuki S, Kojima M, Sakakibara H, Kawaguchi M. 2015. Gibberellins interfere with symbiosis signaling and gene expression and alter colonization by Arbuscular Mycorrhizal fungi in Lotus Japonicus. Plant Physiology **167**, 545–557.

Takei K, Sakakibara H, Taniguchi M, Sugiyama T. 2001. Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: Implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. Plant and Cell Physiology **42**, 85–93.

Takei K, Yamaya T, Sakakibara H. 2004. Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyse the biosynthesis of trans-Zeatin. Journal of Biological Chemistry **279**, 41866–41872.

Tan RX, Zou WX. 2001. Endophytes: A rich source of functional metabolites. Natural Product Reports **18**, 448–459.

Tansupo P, Suwannasom P, Luthria DL, Chanthai S, Ruangviriyachai C. 2010. Optimised separation procedures for the simultaneous assay of three plant hormones in liquid biofertilisers. Phytochemical Analysis **21**, 157–162.

Tarkowská D, Novák O, Floková K, Tarkowski P, Turečková V, Grúz J, Rolčík J, Strnad M. 2014. Quo vadis plant hormone analysis? Planta **240**, 55–76.

Taulera Q, Lauressergues D, Martin K, Cadoret M, Servajean V, Boyer FD, Rochange S. 2020. Initiation of arbuscular mycorrhizal symbiosis involves a novel pathway independent from hyphal branching. Mycorrhiza **30**, 491–501.

Tejeda-Sartorius M, Martínez de la Vega O, Délano-Frier JP. 2008. Jasmonic acid influences mycorrhizal colonization in tomato plants by modifying the expression of genes involved in carbohydrate partitioning. Physiologia Plantarum **133**, 339–353.

Thaler JS, Humphrey PT, Whiteman NK. 2012. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. Trends in Plant Science **17**, 260–270.

Tian C, Kasiborski B, Koul R, Lammers PJ, Bucking H, Shachar-Hill Y. 2010. Regulation of the nitrogen transfer pathway in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: Gene characterization and the coordination of expression with nitrogen flux. Plant Physiology **153**, 1175–1187.

Tisserant E, Kohler A, Dozolme-Seddas P, *et al.* 2012. The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. New Phytologist **193**, 755–769.

Tisserant E, Malbreil M, Kuo A, *et al.* 2013. Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. Proceedings of the National Academy of Sciences **110**, 20117–20122.

Tofighi C, Khavari-Nejad RA, Najafi F, Razavi K, Rejali F. 2017. Brassinosteroid (BR) and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi alleviate salinity in wheat. Journal of Plant Nutrition **40**, 1091–1098.

Torres de Los Santos R, Vierheilig H, Ocampo JA, García Garrido JM. 2011. Altered pattern of arbuscular mycorrhizal formation in tomato ethylene mutants. Plant Signaling & Behavior **6**, 755–758.

Trépanier M, Bécard G, Moutoglis P, Willemot C, Gagné S, Avis TJ, Rioux JA. 2005. Dependence of arbuscular-mycorrhizal fungi on their plant host for palmitic acid synthesis. Applied and Environmental Microbiology **71**, 5341–5347.

Tsuzuki S, Handa Y, Takeda N, Kawaguchi M. 2016. Strigolactone-induced putative secreted protein 1 is

required for the establishment of symbiosis by the arbuscular mycorrhizal fungus Rhizophagus irregularis. Molecular Plant-Microbe Interactions **29**, 277–286.

Tudzynski B. 1997. Fungal Phytohormones in Pathogenic and Mutualistic Associations. Plant Relationships. Springer Berlin Heidelberg, 167–184.

Tyler L, Thomas SG, Hu J, Dill A, Alonso JM, Ecker JR, Sun TP. 2004. Della proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in Arabidopsis. Plant Physiology **135**, 1008–1019.

Ueda H, Kusaba M. 2015. Strigolactone regulates leaf senescence in concert with ethylene in arabidopsis. Plant Physiology **169**, 138–147.

Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, *et al.* 2005. GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. Nature **437**, 693–698.

Umehara M, Hanada A, Yoshida S, *et al.* 2008. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. Nature **455**, 195–200.

Urbanová T, Tarkowská D, Novák O, Hedden P, Strnad M. 2013. Analysis of gibberellins as free acids by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Talanta **112**, 85–94.

Valls M, Genin S, Boucher C. 2006. Integrated Regulation of the Type III Secretion System and Other Virulence Determinants in Ralstonia solanacearum (J Dangl, Ed.). PLoS Pathogens **2**, e82.

Valluru R, Davies WJ, Reynolds MP, Dodd IC. 2016. Foliar abscisic acid-to-ethylene accumulation and response regulate shoot growth sensitivity to mild drought in wheat. Frontiers in Plant Science **7**, 461.

Varbanova M, Yamaguchi S, Yang Y, *et al.* 2007. Methylation of gibberellins by Arabidopsis GAMT1 and GAMT2. Plant Cell **19**, 32–45.

Veach YK, Martin RC, Mok DWS, Malbeck J, Vankova R, Mok MC. 2003. O-glucosylation of cis-Zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes, and endogenous cytokinins. Plant Physiology **131**, 1374–1380.

Vidova V, Spacil Z. 2017. A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: Targeted and data independent acquisition.

Vierheilig H, Coughlan AP, Wyss U, Piché Y. 1998. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. Applied and Environmental Microbiology **64**, 5004–5007.

Vives-Peris V, Gómez-Cadenas A, Pérez-Clemente RM. 2017. Citrus plants exude proline and phytohormones under abiotic stress conditions. Plant Cell Reports **36**, 1971–1984.

Volpe V, Carotenuto G, Berzero C, Cagnina L, Puech-Pagès V, Genre A. 2020. Short chain chito-oligosaccharides promote arbuscular mycorrhizal colonization in Medicago truncatula. Carbohydrate Polymers **229**, 115505.

Voß S, Betz R, Heidt S, Corradi N, Requena N. 2018. RiCRN1, a crinkler effector from the arbuscular mycorrhizal fungus rhizophagus irregularis, functions in arbuscule development. Frontiers in Microbiology **9**.

Vreman HJ, Skoog F, Frihart CR, Leonard NJ. 1972. *Cytokinins in Pisum Transfer Ribonucleic Acid1.*

Wang FF, Cheng ST, Wu Y, Ren BZ, Qian W. 2017. A Bacterial Receptor PcrK Senses the Plant Hormone Cytokinin to Promote Adaptation to Oxidative Stress. Cell Reports **21**, 2940–2951.

Wang B, Chu J, Yu T, Xu Q, Sun X, Yuan J, Xiong G, Wang G, Wang Y, Li J. 2015. Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **112**, 4821–4826.

Wang ZY, Seto H, Fujioka S, Yoshida S, Chory J. 2001. BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. Nature **410**, 380–383.

Waters MT, Gutjahr C, Bennett T, Nelson DC. 2017. Strigolactone Signaling and Evolution. Annual Review of Plant Biology **68**, 291–322.

Weiler EW. 1984. Immunoassay of Plant Growth Regulators. Annual Review of Plant Physiology **35**, 85–95.

Wellman CH, Osterloff PL, Mohiuddin U. 2003. Fragments of the earliest land plants. Nature **425**, 282–285.

Went F. 1926. On growth-accelerating substances in the coleoptile of Avena sativa. Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen **30**, 10–19.

Went FW, Thimann K V. 1937. Phytohormones. Phytohormones.

Wewer V, Brands M, Dörmann P. 2014. Fatty acid synthesis and lipid metabolism in the obligate biotrophic fungus *Rhizophagus irregularis* during mycorrhization of *Lotus japonicus*. The Plant Journal **79**, 398–412.

Whipps JM. 2004. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. Canadian Journal of Botany.1198–1227.

White RF. 1979. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. Virology **99**, 410–412.

Whitford R, Fernandez A, Tejos R, *et al.* 2012. GOLVEN Secretory Peptides Regulate Auxin Carrier Turnover during Plant Gravitropic Responses. Developmental Cell **22**, 678–685.

Wipf D, Krajinski F, Tuinen D, Recorbet G, Courty P. 2019. Trading on the arbuscular mycorrhiza market: from arbuscules to common mycorrhizal networks. New Phytologist **223**, 1127–1142.

Wolfe RR, Jahoor F. 1990. Recovery of labeled CO2 during the infusion of C-1- vs C-2-labeled acetate: implications for tracer studies of substrate oxidation. The American Journal of Clinical Nutrition **51**, 248–252.

Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, De Luca V, Després C. 2012. The Arabidopsis NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid. Cell Reports **1**, 639–647.

Wullschleger SD, Reid CPP. 1990. Implication of ectomycorrhizal fungi in the cytokinin relations of loblolly pine (Pinus taeda L.). New Phytologist **116**, 681–688.

Yamada H, Suzuki T, Terada K, Takei K, Ishikawa K, Miwa K, Yamashino T, Mizuno T. 2001. *The Arabidopsis AHK4 Histidine Kinase is a Cytokinin-Binding Receptor that Transduces Cytokinin Signals Across the Membrane*.

Yamaguchi S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. Annual Review of Plant Biology **59**, 225–251.

Yamaguchi YL, Ishida T, Sawa S. 2016. CLE peptides and their signaling pathways in plant development. Journal of Experimental Botany **67**, 4813–4826.

Yamamoto Y, Ohshika J, Takahashi T, Ishizaki K, Kohchi T, Matusuura H, Takahashi K. 2015. Functional analysis of allene oxide cyclase, MpAOC, in the liverwort Marchantia polymorpha. Phytochemistry **116**, 48–56.

Yang SF. 1967. Biosynthesis of ethylene. Ethylene formation from methional by horseradish peroxidase. Archives of Biochemistry and Biophysics **122**, 481–487.

Yang SY, Grønlund M, Jakobsen I, *et al.* 2012. Nonredundant regulation of rice arbuscular mycorrhizal symbiosis by two members of the PHOSPHATE TRANSPORTER1 gene family. Plant Cell **24**, 4236–4251.

Yang SF, Hoffman NE. 1984. Ethylene Biosynthesis and its Regulation in Higher Plants. Annual Review of Plant Physiology **35**, 155–189.

Yang T, Lian Y, Wang C. 2019. Comparing and contrasting the multiple roles of butenolide plant growth regulators: Strigolactones and karrikins in plant development and adaptation to abiotic stresses. International Journal of Molecular Sciences **20**.

Yang H, Matsubayashi Y, Nakamura K, Sakagami Y. 1999. Oryza sativa PSK gene encodes a precursor of phytosulfokine-α, a sulfated peptide growth factor found in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**, 13560–13565.

Yano K, Yoshida S, Müller J, *et al.* 2008. CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**, 20540–20545.

Ye Q, Zhu W, Li L, Zhang S, Yin Y, Ma H, Wang X. 2010. Brassinosteroids control male fertility by regulating the expression of key genes involved in Arabidopsis anther and pollen development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**, 6100–6105.

Yin C, Park JJ, Gang DR, Hulbert SH. 2014. Characterization of a tryptophan 2-monooxygenase gene from puccinia graminis f. sp. tritici involved in auxin biosynthesis and rust pathogenicity. Molecular Plant-Microbe Interactions **27**, 227–235.

Yokotani N, Nakano R, Imanishi S, Nagata M, Inaba A, Kubo Y. 2009. Ripening-associated ethylene biosynthesis in tomato fruit is autocatalytically and developmentally regulated. Journal of Experimental Botany **60**, 3433–3442.

Yoneyama K, Xie X, Kim H Il, Kisugi T, Nomura T, Sekimoto H, Yokota T, Yoneyama K. 2012. How do nitrogen and phosphorus deficiencies affect strigolactone production and exudation? Planta **235**, 1197–1207.

Yoshida S, Kameoka H, Tempo M, Akiyama K, Umehara M, Yamaguchi S, Hayashi H, Kyozuka J, Shirasu K. 2012. The D3 F-box protein is a key component in host strigolactone responses essential for arbuscular mycorrhizal symbiosis. New Phytologist **196**, 1208–1216.

Yu X, Li L, Li L, Guo M, Chory J, Yin Y. 2008. Modulation of brassinosteroid-regulated gene expression by jumonji domain-containing proteins ELF6 and REF6 in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**, 7618–7623.

Zadra C, Borgogni A, Marucchini C. 2006. Quantification of jasmonic acid by SPME in tomato plants stressed by ozone. Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**, 9317–9321.

Zapata PJ, Serrano M, García-Legaz MF, Pretel MT, Botella MA. 2017. Short Term Effect of Salt Shock on Ethylene and Polyamines Depends on Plant Salt Sensitivity. Frontiers in Plant Science **8**, 855.

Zdarska M, Dobisová T, Gelová Z, Pernisová M, Dabravolski S, Hejátko J. 2015. Illuminating light, cytokinin, and ethylene signalling crosstalk in plant development. Journal of Experimental Botany. Oxford University Press, 4913–4931.

Zhang Q, Blaylock LA, Harrison MJ. 2010. Two Medicago truncatula half-ABC transporters are essential for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis. Plant Cell **22**, 1483–1497.

Zhang L, Xu M, Liu Y, Zhang F, Hodge A, Feng G. 2016. Carbon and phosphorus exchange may enable cooperation between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate-solubilizing bacterium. New Phytologist **210**, 1022–1032.

Zhao Y. 2012. Auxin Biosynthesis: A Simple Two-Step Pathway Converts Tryptophan to Indole-3-Acetic Acid in Plants. Molecular Plant • **5**, 334–338.

Zhu J-K. 2002. Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants.

Zipfel C, Oldroyd GED. 2017. Plant signalling in symbiosis and immunity. Nature **543**, 328–336.

Zsögön A, Lambais MR, Benedito VA, Figueira AVDO, Peres LEP. 2008. Reduced arbuscular mycorrhizal colonization in tomato ethylene mutants. Scientia Agricola **65**, 259–267.

Zwack PJ, Rashotte AM. 2015. Interactions between cytokinin signalling and abiotic stress responses. Journal of Experimental Botany. Oxford University Press, 4863–4871.

De nombreuses spores de *Rhizophagus irregularis* ont été sacrifiées durant la préparation de cette thèse.

–

Ne pas jeter ce manuscrit sur la voie publique – Recyclable