



**HAL**  
open science

# Caractérisation de protéines sécrétées du champignon Rhizophagus irregularis : criblage de leur effet sur l'établissement de la symbiose endomycorhizienne

Laurent Kamel

► **To cite this version:**

Laurent Kamel. Caractérisation de protéines sécrétées du champignon *Rhizophagus irregularis* : criblage de leur effet sur l'établissement de la symbiose endomycorhizienne. Biologie végétale. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2017. Français. NNT : 2017TOU30052 . tel-03797931

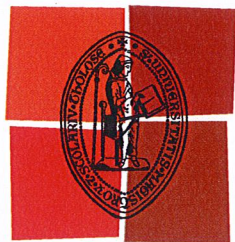
**HAL Id: tel-03797931**

**<https://theses.hal.science/tel-03797931>**

Submitted on 5 Oct 2022

**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.



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Cotutelle internationale avec :

---

**Présentée et soutenue par :**

**Laurent KAMEL**

Le Jeudi 9 mars 2017

**Titre :**

Caractérisation de protéines sécrétées du champignon *Rhizophagus irregularis*  
- Criblage de leur effet sur l'établissement de la symbiose endomycorhizienne

---

ED SEVAB : Interactions plantes-microorganismes

**Unité de recherche :**

Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales (LRSV) UTIII/CNRS UMR 5546

**Directeur(s) de Thèse :**

Christophe ROUX

**Rapporteurs :**

Daniel WIPF

Franck PANABIERES

**Autre(s) membre(s) du jury :**

Claire VENAULT-FOURREY

Matthieu ARLAT

Nicolas FREI-DIT-FREY

Sébastien ROY



# Remerciements

Je voudrais tout d'abord commencer par remercier très chaleureusement Christophe Roux et Nicolas Frei-dit-frey. Christophe, merci de m'avoir fait confiance pour ce projet, de m'avoir initié aux analyses génomiques et transcriptomiques (et ce n'était pas gagné au départ) et pour ton encadrement tant au niveau professionnel qu'humain. Nico, merci pour tes précieux conseils pour les analyses qui m'ont beaucoup apporté, ta rigueur, ainsi que ta bonne humeur au quotidien. J'ai vraiment apprécié travailler avec vous deux et je garderai un excellent souvenir de cette période.

Un grand merci également à l'ensemble des membres de l'entreprise Agronutrition. Plus particulièrement, je voudrai remercier Cédric Cabanes de m'avoir embauché et fait confiance pour mener à bien ce projet, ainsi que Sébastien Roy, pour le suivi de mon travail, les bons conseils, et les discussions très constructives et enrichissantes que nous avons pu avoir durant ces années. Un grand merci également à Julie Viala et Céline Durieu qui se sont intéressées à mon travail ainsi que Barthélémy Martin, Marie-Dominique Da Silva et Murielle Lasserre pour leur aide et leur disponibilité sur les aspects administratifs, et tous les autres membres de la famille Agronutrition que j'ai pu rencontrer.

Je voudrais également remercier les membres de mon équipe que j'ai pu cotoyer au quotidien et m'ont beaucoup appris par leurs conseils : Guillaume, Dodo (la saumure), Francis (plus qu'un voisin de bureau), Soizic, Jean-Philippe, Virginie, Pierre-Marc, Nathalie. Merci aussi aux « non permanents » : Mathilde (Vegan Power), Brubru (Bôgoss), Momo (-motus le marqueur), Malo (Salut patrick), Loic (#Lolo2 la relève), Nico (#Edouardlouis), Alexandra (Miss quizz), Adeline (C'est bon c'est beau c'est bioch !), Julie (la caution culture), Jonathan (Ze stagiaire), Camille (la Grande), Estelle (la pro du Powerpoint), Jessica (Do Brazil), Nianwu (Correspondant teamviewer) et puis tous ceux qui sont passés par l'équipe avec qui j'ai partagé de bons moments.

Plus largement, un immense merci à l'ensemble des non perms du laboratoire (mais pas que...) qui ont rendu cette thèse ma foi fort agréable : Les potos de la première heure, Rafiki (mon gros nazouillet préféré), Adé (Mama gâteaux), Mel (reine des blagues carambar), Vince (#Cortex) et Elo (Arabidopsis pour la vie) qui ont supporté mes blagues pourries depuis plus

de 4 ans déjà et ont été d'excellent soutiens dans les moments parfois plus difficiles ; les potos *de novo* rencontrés au court de la thèse: Didith (Miss couleur), Manon (poneyclub), Aude (La gentillesse incarnée), Kévin et Harold (mes souffre-douleurs favoris du badminton), Chiel et Sarah (salut paraplu !), Charlène (se croit forte à la bataille corse mais il n'en est rien), Maryne (La Globe Taroteuse), Marie-Alexane (Happy Girl), Lukas (le matheux), Marlène (Championne de crossfit), Audrey, Carine, Agustina, Patrizia et Magda (les J-Pêtes), Ambroise (Un gagnant!), et toutes les personnes du laboratoire que j'ai eu plaisir à fréquenter.

Enfin, je voudrais finir par remercier tous mes amis « hors labo » pour les moments de détente et de convivialité nécessaires à la bonne réussite de cette thèse ; ma famille pour leur affection, leurs encouragements, leur soutien et plus globalement pour tout ce qu'ils ont fait pour moi, et Marie, ma petite chérie qui partage ma vie depuis plus de 3 ans, pour tout le bonheur qu'elle m'apporte au quotidien.

**Bref, UN GRAND MERCI à vous tous pour votre contribution à cette belle aventure !!!**

# Liste des abbrévations

<b>aa</b>	acides aminés
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADN-t</b>	ADN de transfert
<b>AMT</b>	Ammonium transporter
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique
<b>Avr</b>	Protéine d'avirulence
<b>BAS</b>	Branched absorbing structure
<b>C</b>	Carbone
<b>CAZyme</b>	Carbohydrate-Active Enzymes
<b>CDS</b>	Séquence codante
<b>CMA</b>	Champignon mycorhizien à arbuscules
<b>COPII</b>	Coat protein complex II
<b>COs</b>	chitooligosaccharides
<b>CRN</b>	Crinkler and Necrosis
<b>CSP</b>	Common Symbiotic Pathway
<b>CWDE</b>	Cell-wall degrading enzyme
<b>DO</b>	Densité optique
<b>DsRNA</b>	ARN double brin
<b>Ecp6</b>	Extracellular protein 6
<b>eGFP</b>	enhanced GFP
<b>ERF19</b>	Ethylene response factor 19
<b>ERM</b>	Extraradical mycelium
<b>ETS</b>	Effector triggered susceptibility
<b>EXP4</b>	Expansin 4
<b>FAM</b>	5(6)-carboxyfluoresceine
<b>FAS</b>	Fatty acid synthase
<b>FC</b>	Fold change
<b>FDR</b>	False discovery rate
<b>FHA</b>	filamentous haemagglutinin adhesin
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein
<b>GPAT</b>	Glycerol-3-phosphate acyl transférase
<b>GPCR</b>	Recepteur couplé à la protéine G
<b>GPI</b>	glycosylphosphatidylinositol
<b>GR24</b>	2-methyl-4-(2-oxo-2,3,3 $\alpha$ ,8 $\beta$ -tetrahydro-4H-indeno[1,2 $\beta$ ]furan-3-yl-idenemethoxy)but-2-en-4-olide
<b>HIGS</b>	Host-induced gene silencing
<b>JA</b>	acides jasmoniques
<b>kb</b>	Kilobases
<b>Kex</b>	Kexin

<b>LCOs</b>	lipochitooligosaccharides
<b>LysM</b>	Lysin Motif
<b>M/P/DAMP</b>	Microbe/Pathogen/Damaged Associated Molecular Pattern
<b>MiSSP7</b>	Mycorrhiza-induced Small Secreted Protein 7
<b>MP</b>	Membrane plasmique
<b>MST2</b>	Monosaccharide transporter 2
<b>N</b>	Azote
<b>NAG</b>	N-acétyl-D-glucosamine
<b>NFs</b>	Nod factors
<b>NGS</b>	Next Generation Sequencing
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	Ammonium
<b>NLS</b>	Nuclear Localization Signal
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Nitrate
<b>Nts</b>	Nucleotides
<b>ORF</b>	Open reading frame
<b>P</b>	Phosphore
<b>p35S</b>	Promoteur 35S
<b>PAM</b>	Periarbuscular membrane
<b>Pep1</b>	Protein essential during penetration-1
<b>PFAM</b>	Protein family
<b>PFK</b>	Phosphofructokinase
<b>Pi</b>	Phosphate inorganique
<b>Pit2</b>	Protein involved in tumor 2
<b>polyP</b>	Polyphosphate
<b>POX</b>	Peroxydase
<b>PPA</b>	Pre-penetration apparatus
<b>PR</b>	Pathogenesis-related protein
<b>PRR</b>	Pattern recognition receptor
<b>PS</b>	Peptide signal
<b>PT4</b>	Phosphate transporter 4
<b>PTI</b>	PAMP triggered immunity
<b>R</b>	Protéines de résistance
<b>R2SPs</b>	SPs identifiées à partir de l'assemblage Rhiir2.1
<b>RAM2</b>	Required for arbuscular mycorrhization 2
<b>RcAQP3</b>	<i>Rhizophagus clarus</i> aquaporin 3
<b>RCP</b>	Repeat-containing protein
<b>RE</b>	Reticulum endoplasmique
<b>RiMST</b>	Monosaccharide transporters from <i>Rhizophagus irregularis</i>
<b>RNAi</b>	ARN interférant
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>RPKM</b>	Reads per kilobase of transcript per million reads mapped
<b>RT-qPCR</b>	Reverse Transcriptase quantitative polymerase chain reaction

<b>SA</b>	acides salicyliques
<b>SCR</b>	Small cystein rich
<b>SEM</b>	Standard error of the mean
<b>SGL</b>	SMP-30/Gluconolactonase/LRE-like
<b>siRNA</b>	Petits ARNs interférant
<b>SIS1</b>	Strigolactone-induced putative secreted protein 1
<b>SLs</b>	Strigolactones
<b>SNP</b>	Single nucleotide polymorphism
<b>SP</b>	Secreted protein
<b>STE</b>	mating-deficient (STERile)
<b>TEF</b>	Transcription elongation factor
<b>UTR</b>	Untranslated region
<b>UV3SPs</b>	SPs identifiées à partir de l'assemblage UnigeneV3
<b>VHIGS</b>	Virus host-induced gene silencing
<b>VIGS</b>	Virus-induced gene silencing
<b>WGA</b>	Whole genome amplification





# Liste des figures, tables et annexes

**Figure 1 :** Stratégies de colonisation des deux principaux types de champignons mycorrhiziens.

**Figure 2 :** Phylogénie des Glomeromycètes.

**Figure 3 :** Organisation génomique au sein des noyaux coexistant au sein d'une même spore.

**Figure 4 :** Schéma résumant la nature des échanges lors de l'établissement de la symbiose mycorrhizienne à arbuscules.

**Figure 5 :** Représentation schématique de différentes étapes de la biologie des CMAs.

**Figure 6 :** Représentation des différentes voies de sécrétions des protéines.

**Figure 7 :** Influence de signaux environnementaux et de facteurs de régulation sur la composition du sécrétome fongique.

**Figure 8 :** Exemples de signaux perçus par les champignons.

**Figure 9 :** Différents modes de colonisation des plantes par les champignons.

**Figure 10 :** Schéma en zigzag représentant la succession des réponses immunitaires végétales selon la perception de l'organisme pathogène au travers des PAMPs/MAMPs ou des protéines effectrices.

**Figure 11 :** Mode d'action d'effecteur fongiques apoplastiques et cellulaires.

**Figure 12 :** Mode d'action de SP7 durant les étapes précoces d'infection.

**Figure 13 :** Pipeline bioinformatique ayant mené à l'identification des gènes les plus exprimés dans la plupart des hôtes à partir de l'assemblage UnigeneV3.

**Figure 14 :** Description du processus ayant mené à l'identification de 40 SPs d'intérêt à partir des différents assemblages.

**Figure 15 :** Validation des cadres ouverts de lectures (ORF) déterminés par notre pipeline informatique à partir des séquences génomiques correspondantes.

**Figure 16 :** Analyse du sécrétome à partir de l'assemblage Rhiir2.1.

**Figure 17 :** Etat de conservation des 872 RiSPs au sein des modèles de gènes définis sur 5 isolats de *R. irregularis* (A1, A4, A5, B3 et C2).

**Figure 18 :** Comparaison des localisations des différentes SPs (construction *p35S::SP:citrine*) dans les épidermes foliaires de *N. benthamiana* et dans des racines transformées de *M. truncatula*.

**Figure 19 :** Localisation subcellulaire des différentes SPs exprimées dans les racines de *M. truncatula* (construction *p35S::SP:citrine*).

**Figure 20 :** Test de transfection du champignon pathogène *Colletotrichum higginsianum* par différentes constructions plasmidiques exprimant la GFP.

**Figure 21 :** Cinétique de croissance d'*Agrobacterium tumefaciens* transformées avec les constructions d'intérêt (*p35S::SP:Citrine*) dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana* récoltées à 8, 12 et 15 jours après agroinfiltration.

**Figure 22 :** Variation du taux de mycorhization de racines de *M. truncatula* transformées par les constructions d'intérêt (*p35S::SP:citrine*) par rapport au témoin (vecteur vide).

**Figure 23** : Variabilité de localisation de la FAM dans les différentes zones cellulaires d'une racine latérale de *M. truncatula*.

**Figure 24** : Localisation subcellulaire des différentes constructions SP-FAM dans les cellules épidermiques de la zone pilifère.

**Table 1** : Comparaison des assemblages Gloin1 et Rir.

**Table 2** : Caractéristique de l'assemblage transcriptomique UnigeneV3.

**Table 3** : liste des 33 SPs candidates avec leurs caractéristiques structurales et leurs niveaux d'expression associés à chacune des conditions testées.

**Table 4** : Caractéristiques de l'assemblage Rhiir2.1.

**Table 5** : Caractéristiques des assemblages génomiques des 5 isolats de *R. irregularis*.

**Table 6** : Etat de conservation de nos 33 SPs candidates au sein des répertoires de gènes de 5 souches de *R. irregularis* (A1, A4, A5, B3 et C2). Sont surlignés en jaune les SPs se retrouvant conservées dans la totalité des souches

**Table 7** : Etat de conservation des 33 gènes candidats sur l'assemblage Rhiir2.1 et au sein des 5 souches de *R. irregularis* (A1, A4, A5, B3 et C2).

**Table 8** : Caractéristique des 33 protéines sécrétées (SP) identifiées.

**Table 9** : Niveau d'expression des gènes candidats dans des racines de *M. truncatula* mycorhizées comparé à une condition témoin de spores de *R. irregularis* en germination, déterminé par RNAseq et RT-qPCR.

**Table 10** : Estimation de l'impact d'un ajout de peptide en solution exogène sur la mise en place des processus symbiotiques.

**Figure S1** : Principales caractéristiques de l'ADN de transfert (ADNt) présent sur le plasmide pCambia 2200 Gold modifié pour clonage Golden Gate.

**Figure S2** : Expression de la DsRed dans des racines de *M. truncatula* transformées avec le vecteur vide témoin (pCambia utilisé comme contrôle).

**Table S1** : Amorces utilisées pour clonage Golden Gate.

**Table S2** : Amorces utilisées pour construction HIGS par Golden Gate.

**Table S3** : Amorces utilisées pour clonage des constructions dans le plasmide pTRV2.

**Table S4** : Amorces utilisées pour la qRT-PCR.

**Table S5** : Composition des milieux de culture.

**Annexe 1** : Confirmation de la localisation pariétale de SP9 et SP12 dans des feuilles de *N. benthamiana* agroinfiltrées..

**Annexe 2** : Confirmation de la localisation pariétale de SP23 par plasmolyse dans des racines de *M. truncatula* transformées (*p35S::SP23:citrine*) et mycorrhizées.

**Annexe 3** : Confirmation de la localisation pariétale de la FAM dans la zone pilifère

**Annexe 4** : Confirmation de la localisation pariétale des SP-FAM dans les racines de *M. truncatula*.

**Annexe 5** : Kamel *et al.*, 2016 : Biology and Evolution of arbuscular mycorrhizal fungi in the light of genomics

# Sommaire

LA SYMBIOSE MYCORHIZIENNE A ARBUSCULES.....	13
<b>1-Préambule.....</b>	<b>13</b>
<b>2-Contexte de l'étude.....</b>	<b>14</b>
<b>3-Les symbioses mycorhiziennes.....</b>	<b>15</b>
<b>4-Les champignons endomycorhiziens.....</b>	<b>16</b>
4.1-Des organismes ancestraux.....	16
4.2-... difficiles à étudier.....	18
4.2.1-Des incertitudes sur le cycle biologique des CMAs.....	18
4.2.2-Une culture difficile.....	19
4.2.3-L'obligation d'approches génétiques indirectes.....	21
4.2.4-Choix de l'organisme d'étude ?.....	22
<b>5-Cycle biologique des CMAs et processus symbiotique.....</b>	<b>23</b>
5.1-Phase asymbiotique.....	25
5.2- Dialogue moléculaire en phase pré-symbiotique.....	25
5.2.1-Les principaux signaux végétaux.....	25
5.2.1.1-Les flavonoïdes.....	26
5.2.1.2-Les strigolactones.....	26
5.2.1.3-Les lipides.....	27
5.2.2-Les signaux d'origine fongique perçus par les plantes.....	27
5.2.2.1-Les lipochitoooligosaccharides.....	27
5.2.2.2-Les chitoooligosaccharides.....	28
5.3-Etablissement d'une relation étroite en phase symbiotique.....	30
5.3.1-Pénétration racinaire.....	30
5.3.2-Propagation dans les tissus.....	31
5.3.3-Mise en place de la fonctionnalité symbiotique.....	32
5.3.4-Croissance extra racinaire.....	32
<b>6-Nature des échanges trophiques hôte-CMAs.....</b>	<b>33</b>
6.1-Apport en phosphore.....	33
6.2-Apport en azote.....	35
6.3-Apport en eau.....	36
6.4-Les échanges carbonés.....	36
<b>7-Le sécrétome des CMAs.....</b>	<b>37</b>
7.1-Généralité sur les protéines sécrétées (SPs).....	37
7.1.1-Les mécanismes de sécrétion chez les eucaryotes.....	37
7.1.2-Diversité des SPs.....	38
7.1.2.1-Définition générique du sécrétome.....	38
7.1.2.2-Sécrétome et adaptation aux contraintes environnementales.....	39
7.1.2.3-Diversité et particularité des sécrétomes fongiques.....	39
La formation de la paroi cellulaire.....	39
Dégradation de la biomasse végétale.....	40
La perception des signaux.....	40
Des SPs impliquées dans l'interaction avec un hôte.....	42

7.2-Les secrétomes de champignons interagissant avec les plantes.....	42
7.2.1-Du génome au secrétome .....	44
7.2.2-Le secrétome des champignons phytopathogènes.....	45
7.2.2.1-Les protéines dégradant la paroi végétale .....	45
7.2.2.2-Les protéines effectrices.....	45
Les effecteurs apoplastiques .....	48
Les effecteurs cytosoliques.....	49
7.2.3-Le secrétome des CMAs .....	50
7.2.3.1-Les protéines dégradant la paroi .....	50
7.2.3.2-Les protéines effectrices.....	51
<b>8-Hypothèse de travail et plan de thèse .....</b>	<b>53</b>
<b>CHAPITRE I - ANALYSE DU SECRETOME DE <i>RHIZOPHAGUS IRREGULARIS</i> DAOM197198 .....</b>	<b>55</b>
<b>1-Avant-propos .....</b>	<b>55</b>
<b>2-Contexte de l'étude.....</b>	<b>55</b>
<b>3-Données à disposition .....</b>	<b>56</b>
3.1-Une souche modèle, deux assemblages génomiques : Gloin1 et Rir .....	56
3.2-Des données d'expression fongique.....	59
<b>4-Présentation des travaux .....</b>	<b>59</b>
4.1-Constataion et hypothèses de travail .....	59
4.2-Résumé de l'article .....	61
<b>5-Article .....</b>	<b>63</b>
5.1-Pour aller plus loin.....	89
<b>6-Génération d'une liste restreinte de candidats pour étude .....</b>	<b>90</b>
6.1-UnigeneV3 : un assemblage transcriptomique « maison » .....	91
6.2-Vers une liste plus complète .....	92
<b>7-Comparaison à de nouvelles données génomiques .....</b>	<b>96</b>
7.1-Rhiir2.1 .....	97
7.1.1-Comparaisons aux 872 RiSPs.....	97
7.2-De nouveaux génomes de 5 isolats de <i>R. irregularis</i> .....	99
7.2.1-Comparaisons aux 872 RiSPs.....	100
7.2.2-Recherche de nos 33 candidats élites parmi les répertoires de gènes .....	101
7.2.3-Présences des 33 candidats au niveau génomique.....	103
<b>CHAPITRE II - A LA RECHERCHE DE PROTEINES SECRETEES DE <i>RHIZOPHAGUS IRREGULARIS</i> DAOM197198 EXPLOITABLES EN AGRICULTURE .....</b>	<b>105</b>
<b>1-Avant-propos .....</b>	<b>105</b>
<b>2-Objectifs.....</b>	<b>105</b>
<b>3-Résultats et discussion .....</b>	<b>106</b>
3.1-Analyse de la séquence et des profils d'expression des candidats .....	106
3.1.1-Les protéines de petite taille à fonction inconnue.....	108

3.1.2-Les protéines annotées .....	108
3.1.3-Autres protéines.....	110
3.2-Validation de l'expression par RT-qPCR .....	110
3.3-Etude en système hétérologue du caractère sécrétoire des SPs sélectionnées et de la cytolocalisation dans les cellules végétales .....	112
3.3.1-Etude par surexpression <i>in planta</i> et analyse histologique .....	112
3.3.1.1- Recherche d'un système d'étude approprié.....	112
3.3.1.2-Expression dans les racines de <i>Medicago truncatula</i> .....	115
3.3.1.3-Essai de validation de la sécrétion par expression hétérologue dans le champignon <i>Colletotrichum higginsianum</i> .....	121
3.3.2-Phénotypage de l'action des SPs candidates sur l'établissement de la symbiose MA.....	124
3.3.2.1-Prolifération d'agrobactéries transformées dans le tabac .....	124
3.3.2.2-Implication de SPs dans la mycorhization.....	126
3.4-Apport exogène de peptides .....	128
3.4.1-Choix des candidats.....	129
3.4.2-Essais des peptides sur l'établissement de la symbiose MA .....	129
3.4.3-Confirmation de l'absorption par les racines .....	131
<b>4-Travaux à venir.....</b>	<b>135</b>
4.1-Diminuer l'expression de gènes fongiques cibles.....	135
4.1.1-Application du HIGS .....	135
4.1.2-Application du VHIGS .....	136
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERPECTIVES.....</b>	<b>137</b>
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>141</b>
<b>1-Matériel biologique.....</b>	<b>141</b>
<b>2-Clonage des gènes candidats.....</b>	<b>141</b>
2.1-Synthèse ADNc .....	141
2.2-Génération d'Escherichia coli / Agrobactéries thermocompétentes .....	141
2.3-Clonage des gènes candidats par Golden Gate .....	142
2.4-Constructions HIGS.....	145
2.5-Constructions V(H)IGS .....	146
<b>3-Analyse d'expression par RT-qPCR .....</b>	<b>147</b>
<b>4-Génération de plantes composites de <i>M. truncatula</i>.....</b>	<b>148</b>
<b>5-Racines en culture .....</b>	<b>149</b>
<b>6-Préparation des solutions peptidiques .....</b>	<b>150</b>
<b>7-Bioessais .....</b>	<b>150</b>
7.1-Agroinfiltration .....	150
7.2-Plantes composites.....	151
7.3-Apport exogène de peptides .....	151
<b>8-Localisation subcellulaire .....</b>	<b>151</b>
<b>9-Observation du processus symbiotique.....</b>	<b>152</b>

10-Analyses statistiques.....	152
BIBLIOGRAPHIE.....	155
ANNEXES .....	171
<b>Annexe 1: Confirmation de la localisation pariétale de SP9 et SP12 dans des feuilles de <i>N. benthamiana</i> agroinfiltrées.....</b>	<b>171</b>
<b>Annexe 2: Confirmation de la localisation pariétale de SP23 par plasmolyse dans des racines de <i>M. truncatula</i> transformées (<i>p35S::SP23:citrine</i>) et mycorrhizées. ....</b>	<b>172</b>
<b>Annexe 3: Confirmation de la localisation pariétale de la FAM dans la zone pilifère .....</b>	<b>173</b>
<b>Annexe 4: Confirmation de la localisation pariétale des SP-FAM dans les racines de <i>M. truncatula</i>.....</b>	<b>174</b>
<b>Annexe 5 : Kamel <i>et al.</i>, 2016 : Biology and Evolution of arbuscular mycorrhizal fungi in the light of genomics .....</b>	<b>176</b>

# La symbiose mycorhizienne à arbuscules

---

## 1-Préambule

Le sol. Nous le foulons tous les jours, il est notre terre nourricière et nous permet de produire toutes sortes de biens, mais qu'est-il réellement ?

Au sens structural du terme, le sol est un matériau hétérogène formé d'éléments minéraux, organiques, mais aussi d'eau et de gaz. Les éléments minéraux sont indispensables à la vie des plantes : potassium, phosphore, azote, bore, magnésium... Mais leur assimilation passe souvent par l'intermédiaire de formes complexées à des composés d'origine organique (nitrates et ammonium, phosphates). La matière d'origine organique, bien que minoritaire, est primordiale car à la base de la fertilité et de la stabilité d'un sol. Elle est formée par l'action des êtres vivants que sont : les végétaux, les animaux, et une extraordinaire diversité de microorganismes (champignons, protistes divers, bactéries). Ces derniers, bien qu'invisibles à notre perception pour la plupart, constituent une biomasse considérable et la composante majeure de la vie des sols. Ils permettent la formation de l'humus, la terre fertile, qui regroupe l'ensemble des matières organiques en cours de décomposition. Les microorganismes du sol ont ainsi un rôle essentiel de transformation de cette matière (le sol est un fermenteur géant), mais vont également les rendre accessible aux végétaux. Cette biologie des sols est d'une complexité encore peu maîtrisée. De fait, il a été plus facile de développer au XX<sup>ème</sup> siècle une agriculture basée sur l'ajout d'intrants chimiques. Malgré la technicité et l'efficacité de notre agriculture intensive, il ne s'agit pourtant que de pratiques agronomiques relativement simples que l'on pourrait qualifier d'agriculture "hors-sol" car ne prenant pas en compte (ou si peu) les mécanismes biologiques fermentaires d'un sol.

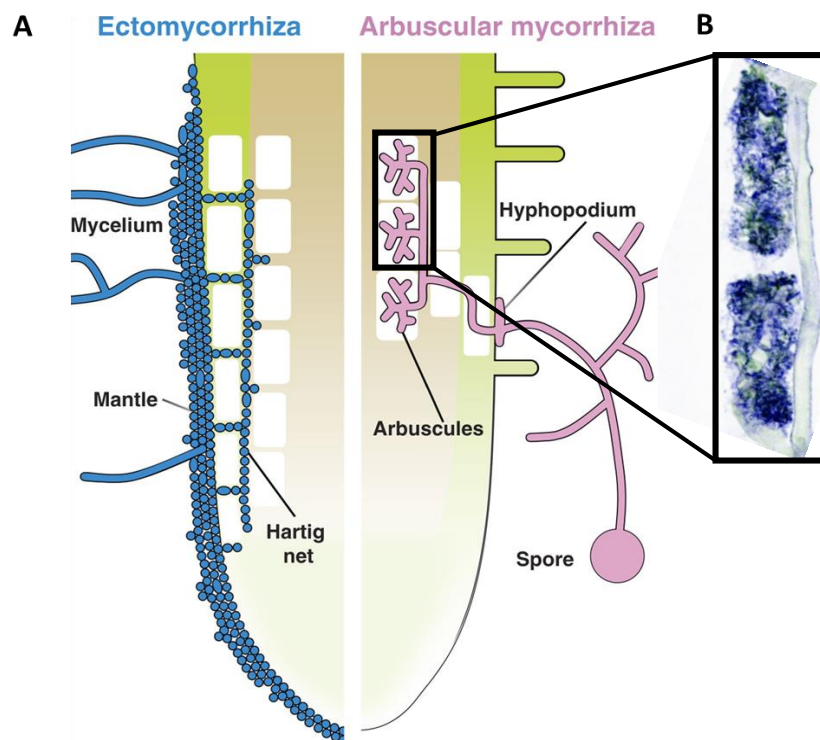


## 2-Contexte de l'étude

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une convention CIFRE (N°2013/0748) liant l'Université Paul Sabatier (par le Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales et l'équipe « symbiose endomycorhizienne et signalisation cellulaire » qui y est rattachée) et l'entreprise Agronutrition, PME sud-toulousaine (Président Cédric Cabanes). La société Agronutrition est spécialisée dans le développement, la production et la vente de compléments nutritionnels pour les plantes, et est sensibilisée à l'incidence environnementale de l'ajout de surplus d'engrais minéraux. Elle s'est ainsi spécialisée dans le développement de préparations à base de microorganismes. Ces dernières ont pour objectif de favoriser le développement ainsi que la nutrition des cultures végétales dans le cadre d'une agriculture alternative « écologiquement intensive ». L'entreprise commercialise plus particulièrement la souche de champignon mycorhizien à arbuscule (CMA) *Rhizophagus irregularis* DAOM197198 (Connectis®). Ce projet de thèse répond à une volonté affichée de l'entreprise de mieux connaître cette symbiose en général, sans finalisation court-termiste, mais en gardant en vue toute application qui permettrait l'optimisation de la production d'inoculum et l'amélioration de l'efficacité mycorhizienne au champ. C'est dans ce double état d'esprit que les travaux ont été menés au LRSV sous la direction du Dr Nicolas Frei dit Frey pour les analyses fonctionnelles des SPs et du Pr Christophe Roux pour les analyses génomiques et transcriptomiques, et avec le concours du Dr Sébastien Roy, correspondant scientifique de ce projet à Agronutrition, pour envisager toute possibilité de transfert technologique. Le projet a consisté à définir, avec la plus grande précision permise par les données génomiques disponibles sur *Rhizophagus irregularis* DAOM197198, le répertoire coeur de protéines sécrétées exprimées dans différentes plantes hôtes (core expressed secretome) et potentiellement conservées entre CMAs (comparaison de ce répertoire avec celui d'une espèce phylogénétiquement éloignée : *Gigaspora rosea*), pour identifier des effecteurs actifs sur l'établissement de la symbiose. Outre les implications de ces approches sur une meilleure compréhension des mécanismes qui régissent cette symbiose, de telles protéines sécrétées pourraient être utilisées pour : 1°) accélérer la mise en culture de nouvelles souches de champignons MA; 2°) accroître la production d'inoculum *in vitro* ; 3°) favoriser l'établissement de la symbiose MA au champ.

### 3-Les symbioses mycorhiziennes

Les champignons et les bactéries constituent la majeure partie de la diversité des microorganismes associés aux plantes. Il a été dénombré qu'un gramme de sol contiendrait en moyenne  $10^9$  bactéries et des dizaines de mètres d'hyphes fongiques (Leake *et al.*, 2004). S'y trouvent des champignons saprotrophes, participant à la dégradation de la matière organique, des champignons phytopathogènes, et des champignons symbiotiques mutualistes. Les champignons symbiotiques capables de s'associer avec les racines de plante hôte sont appelés champignons mycorhiziens. Ce terme regroupe différentes associations, les plus fréquentes étant les ectomycorhizes et les endomycorhizes (**Figure 1**).



**Figure 1 : Stratégies de colonisation des deux principaux types de champignons mycorhiziens. A :** Colonisation d'une racine par un champignon ectomycorhizien (en bleu). Les hyphes forment un manteau autour des racines de l'hôte et s'immiscent dans les couches internes de la racine de manière extracellulaire, formant le réseau de Hartig. **B :** Colonisation d'une racine par un champignon mycorhizien à arbuscule. Le champignon pénètre dans la racine par la formation d'un hyphopode et croît jusque dans les cellules du cortex interne où il développe des structures d'échange hyper-ramifiées, les arbuscules (insert : observation en microscopie confocale). Contrairement aux champignons ectomycorhiziens, l'apex n'est pas colonisé par les champignons endomycorhiziens.

Adapté d'après Bonfante & Genre, (2010)

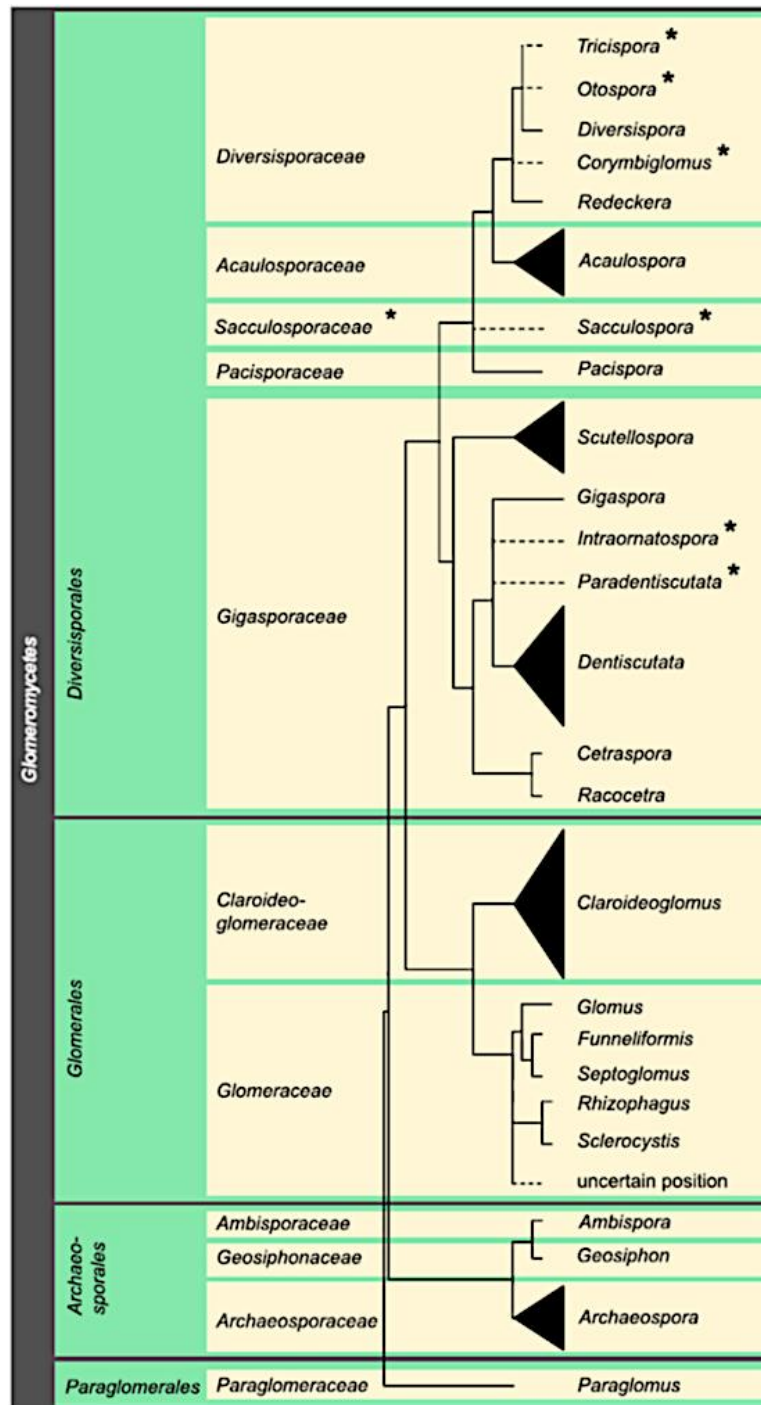
Les champignons ectomycorhiziens, présents essentiellement en milieu forestier, forment un manchon autour des racines de l'hôte et s'immiscent entre les cellules épidermiques et du cortex externe, formant une interface symbiotique nommée réseau de Hartig. La symbiose ectomycorhizienne implique des champignons appartenant à différents ordres des divisions des *Basidiomycètes* et des *Ascomycètes*. Les champignons endomycorhiziens se caractérisent quant à eux par une croissance intracellulaire dans les couches externes (épiderme et cortex externe) puis intercellulaire jusqu'au niveau des cellules du cortex interne où les hyphes forment après avoir traversés la paroi cellulaire une structure hyper-ramifiée au contact de la cellule hôte, nommée « arbuscule ». Cette structure d'échange très spécifique leur a conféré le nom de champignons mycorhiziens à arbuscules (CMAs). Bien qu'invisibles à nos sens, ces champignons représenteraient entre 5 et 50% de la biomasse microbienne des sols, avec des incidences majeures sur le plan écologique - ou service écologique - tels que décrits par la suite (Ryan & Graham, 2002).

## **4-Les champignons endomycorhiziens**

### **4.1-Des organismes ancestraux...**

Les champignons mycorhiziens à arbuscules, appartenant au groupe monophylétique des Gloméromycètes (Schüßler *et al.*, 2001), sont des organismes eucaryotes extrêmement anciens qui ont co-évolués avec leurs hôtes. Différentes traces fossiles de ces champignons ont été retrouvées : sous forme d'hyphes et de spores datant de l'Ordovicien (de l'ordre de 450 MA - Redecker *et al.*, 2000), et à l'état symbiotique sur échantillons de végétaux du Dévonien (de l'ordre de 400 MA - Taylor *et al.*, 1995), correspondant à la plus ancienne association plante-champignon datée à ce jour. C'est également à cette période que l'on assiste à la colonisation de la terre ferme par les plantes (Wellman *et al.*, 2003). Des auteurs suggèrent que les Gloméromycètes, de par leur association ancestrale avec les plantes, auraient favorisé la colonisation du milieu terrestre des végétaux en promouvant le développement racinaire (Brundrett, 2002; Humphreys *et al.*, 2010; Kenrick & Strullu-Derrien, 2014; Field *et al.*, 2015) à partir de fonctions pré-existantes chez les algues (Delaux *et al.*, 2015). Par conservation de cette association ancestrale lors de l'évolution des plantes, la symbiose MA impliquerait près de 80% des espèces et 90% des familles de plantes terrestres

actuelles (Wang & Qiu, 2006; Smith & Read, 2010), amenant à dire que les plantes dans leur état naturel sont mycorhizées. Si les espèces végétales se sont fortement diversifiées depuis les premières associations, le partenaire fongique se serait peu diversifié, formant un groupe homogène de champignons, les Gloméromycètes, pour lequel ne sont différenciés que 250 espèces environ réparties en 26 genres (**Figure 2**).



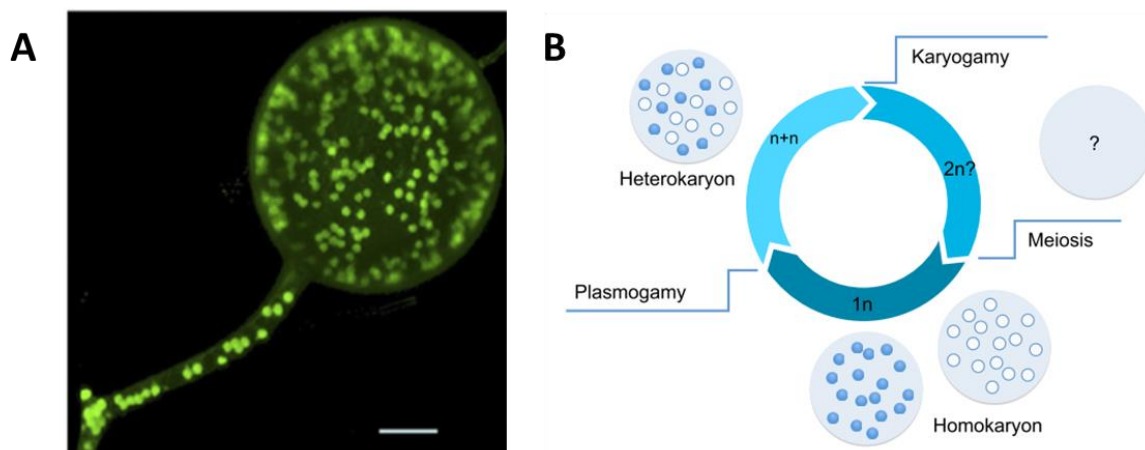
**Figure 2 : Phylogénie des Gloméromycètes.** Cette division comprendrait quatre Ordres : Diversisporales, Glomerales, Archaeosporales et Paraglomerales. D'après Redecker *et al.*, (2013).

## 4.2-... difficiles à étudier

### 4.2.1-Des incertitudes sur le cycle biologique des CMAs

La biologie des CMAs reste mystérieuse sur plusieurs aspects, notamment l'accomplissement du cycle biologique, la sexualité et l'organisation génomique des Glomeromycètes. Ces organismes filamenteux produisent des hyphes coenocytiques (= non cloisonnés) comportant plusieurs centaines de noyaux dans une même cellule, dont certains migrent librement le long du réseau mycélien et s'accumulent dans des spores plurinucléées (plusieurs centaines à plusieurs milliers de noyaux selon les espèces) sans jamais passer par une phase mononucléée (**Figure 3**). Ces champignons sont ainsi considérés comme étant des organismes se propageant de manière clonale (Butlin, 2002). Cette organisation génétique fait d'ailleurs l'objet d'une controverse scientifique. En se basant sur divers arguments moléculaires, une école défend l'hypothèse de la présence de plusieurs génomes dans une spore (Croll *et al.*, 2008; Ehinger *et al.*, 2009; Boon *et al.*, 2015) qui serait alors une sorte de syncytium de génotypes. Selon l'hôte, les noyaux codant pour des allèles apportant un meilleur fitness seraient plus actifs et ainsi favorisés, expliquant la quasi absence de spectre d'hôte de ces champignons. Cette hypothèse n'est toutefois pas confirmée par les travaux sur la génomique du champignon modèle *Rhizophagus irregularis* (Tisserant *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014) indiquant la présence d'un seul nucléotype haploïde dans cette souche. Cette controverse n'est pas pour autant éteinte (Ropars & Corradi, 2015; Young, 2015), mais les travaux de génomique en cours sur d'autres souches et espèces de ces champignons renforcent l'hypothèse d'une organisation génotypique classique (F. Martin, C. Roux, com. pers.). Le caractère asexué peut paraître étonnant au vue de la théorie de l'évolution. En effet, la perte de phénomène de recombinaison devrait entraîner à long terme l'accumulation de mutations potentiellement délétères, entraînant l'extinction de ces organismes. Toutefois le caractère asexué n'est pas exceptionnel chez les champignons, notamment ascomycètes et basidiomycètes. Il a été proposé que de rares événements de recombinaison seraient suffisants pour purger les mutations délétères (Maynard Smith, 1996). Il est difficile par ailleurs d'imaginer que les CMAs, biotrophes obligatoires dépendants de plantes hôtes dont les génomes sont très plastiques, ne présentent pas des mécanismes très actifs d'échange génétique, de ségrégation et de recombinaison, permettant de maintenir la stabilité de la relation mutualiste entreprise

avec l'hôte. La possibilité des CMAs de pouvoir opérer de rapides changements génétiques, démontré par plusieurs études (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2001; Gandolfi *et al.*, 2003; Croll & Sanders, 2009), suggère une plasticité génomique. Une hypothèse pourrait être que les phénomènes d'anastomose (où fusion d'hyphes), constatés chez les Glomeromycètes (Giovannetti *et al.*, 1999, 2001) permettent un échange de matériel génétique entre individus. Mais dans ce cas, il devrait y avoir des noyaux génotypiquement différents, sauf à considérer l'existence de mécanismes de recombinaison très rapides entre les différents noyaux d'un individu. Ces questions restent entières, d'autant qu'un travail récent basé sur la comparaison des génomes de cinq isolats de *R. irregularis*, a révélé une possible organisation homo- et dicaryotique avec la présence de loci de mating – gènes contrôlant la fusion cellulaire, première étape dans le cycle sexuel des champignons - comparables à ceux trouvés chez les dicaryomycètes, laissant supposer l'existence d'une sexualité chez ces champignons (Riley & Corradi, 2013; Ropars *et al.*, 2016).

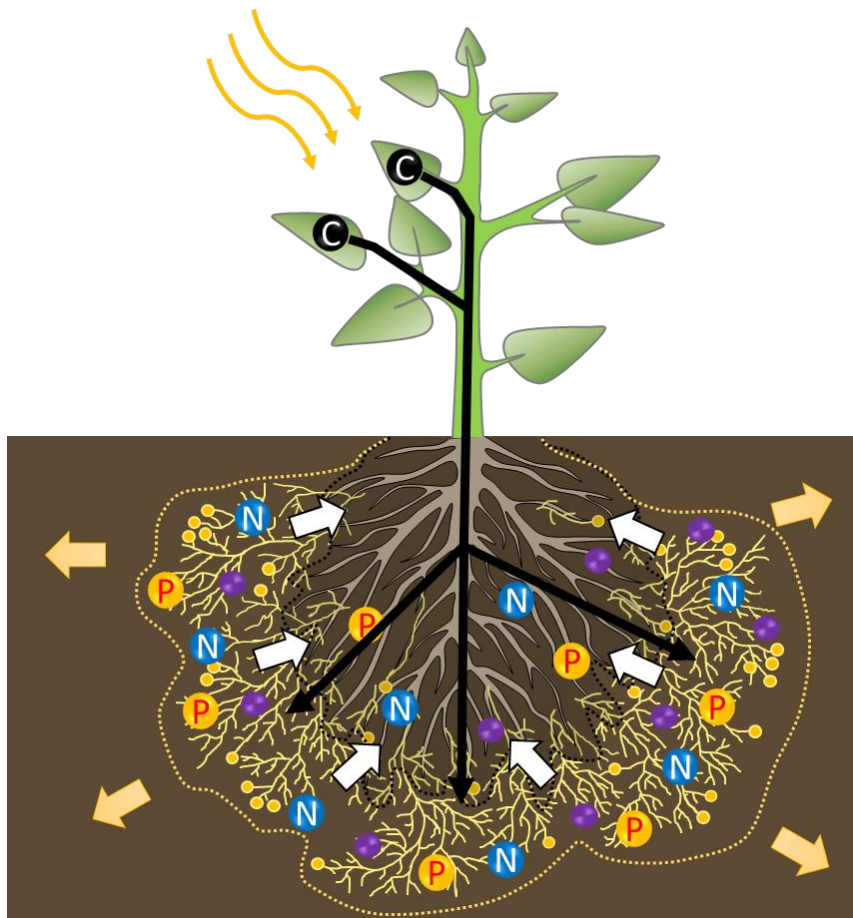


**Figure 3 : Organisation génomique au sein des noyaux coexistant au sein d'une même spore. A :** Spore « asexuée » plurinucléée typique de *R. irregularis*, rattaché à un hyphe coenocytique. D'après Tisserant *et al.*, (2013) **B :** Modèle proposé du cycle cellulaire des CMAs et de l'organisation génomique des noyaux au sein des spores. D'après Sędziewska Toro & Delaux, (2016).

#### 4.2.2- Une culture difficile

Les CMAs sont des organismes biotrophes obligatoires qui doivent interagir avec un partenaire végétal pour en obtenir des ressources carbonées issus de la photosynthèse, en échange de minéraux nécessaires à la croissance de l'hôte (Solaiman & Saito, 1997; Bago *et al.*, 2003)

**(Figure 4).** Si les spores peuvent germer en absence d'hôte, leur croissance est limitée. A ce jour encore, aucun moyen de cultiver ces champignons sans hôte n'a été développé avec succès. Il n'est possible de les cultiver *in vitro* sur milieu artificiel qu'en association avec des plantes, ou de racines transformées par *Agrobacterium rhizogenes*, permettant l'obtention de culture pure (Chabot *et al.*, 1992; St-Arnaud *et al.*, 1996; Declerck *et al.*, 1996). Il est à noter que la croissance des *Glomeromycètes* est lente comparée à celle d'autres microorganismes. Le temps de génération, correspondant à la période entre l'inoculation de racines avec les spores jusqu'à la formation de nouvelles spores est d'environ trois mois.



**Figure 4 :** Schéma résumant la nature des échanges lors de l'établissement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules. Les champignons en s'associant aux racines vont fournir des nutriments à la plante (flèches blanches), essentiellement du phosphate (P, représenté en jaune), de l'azote (N, représenté en bleu) ainsi que divers minéraux (représentés en violet) mais également de l'eau. Le réseau mycélien va jouer un rôle d'extension du système racines augmentant le volume de prospection de sol (en pointillé). En échange, la plante fournit au champignon une source de carbone provenant de la photosynthèse (C, représenté en noir) indispensable à la croissance du champignon (flèches orangées).

### 4.2.3-L'obligation d'approches génétiques indirectes

Plusieurs entraves existent quant à l'étude de la physiologie du champignon. Du fait de l'important nombre de noyaux présents dans leur cytoplasme, de l'absence de phase mononucléée et de l'impossibilité de générer des protoplastes, les tentatives de développement de techniques de transformation stables ont toutes échouées, rendant la transformation uniquement transitoire comme montré par les travaux sur deux espèces de CMAs, *Gigaspora rosea* et *Rhizophagus irregularis* (Forbes *et al.*, 1998; Harrier & Millam, 2001; Helber & Requena, 2007). En conséquence, les études visant à identifier les gènes clés dans le processus de l'établissement symbiotique ont majoritairement été focalisées sur l'hôte au détriment du partenaire fongique. Depuis peu, de nouveaux outils moléculaires ont vu le jour et permis l'étude de gènes fongiques. Parmi eux, le ciblage de transcrite fongique par action de petits ARN interférant (siRNA) surexprimés par l'hôte est en plein essor. L'approche vise à faire exprimer par une plante hôte une cassette RNAi qui cible l'expression d'un gène du microorganisme par complémentarité de séquence, générant un ARN double brin (dsRNA) qui sera dégradé par la machinerie de l'hôte (voir pour revue, Meister & Tuschli, 2004). On parle ainsi d'**Host-induced gene silencing** (HIGS). Bien que le mécanisme de translocation et le rayon d'action de ces petits ARNs reste à déterminer, les premiers résultats montrent une forte diminution de l'expression du transcrite fongique ciblé. Cette technique a été expérimentée pour la première fois en 2010 chez le pathogène fongique biotrophe obligatoire *Blumeria graminis* en utilisant deux hôtes, l'orge et le blé (Nowara *et al.*, 2010). Une étude menée par Helber *et al.* (2011) a transposé pour la première fois cette approche aux CMAs afin de cibler le transcrite fongique d'un gène codant pour un transporteur de monosaccharide à haute affinité, *MST2*. La diminution de l'expression de ce gène se traduit par une altération de la formation de mycorhizes combinée à une malformation des arbuscules et à une baisse de l'expression du transporteur de phosphate de *M. truncatula* MtPT4 impliqué dans l'acquisition du phosphate libéré par les hyphes intraracinaires des CMAs (Harrison *et al.*, 2002). Depuis cette date, seules deux autres études appliquant le HIGS aux CMAs ont été publiées, révélant la difficulté à le mettre en œuvre (Tsuzuki *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2016).

Outre le HIGS, un autre outil de génétique inverse permet également d'éteindre l'expression d'un gène et a également été transposée à l'étude des CMAs. Il s'agit du VIGS (pour Virus-



induced gene silencing), initialement développé pour l'étude de gènes végétaux (Ratcliff *et al.*, 2001). Un avantage du VIGS comparé au HIGS est qu'il n'est pas nécessaire d'obtenir des transformants stables ce qui permet de cribler plus rapidement des gènes candidats (Sahu *et al.*, 2012). Le VIGS se base sur l'utilisation d'un virus à ARN bipartite. Les ADNc correspondants comportant les éléments nécessaires à la réplication et la diffusion du virus dans les cellules végétales ont été insérés dans deux vecteurs binaires et modifiés dans le but de faire exprimer une portion du gène dont l'expression sera éteinte par les mécanismes de défense de la plante (Waterhouse *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002b; Benedito *et al.*, 2004). Bien que le VIGS ait été approuvé pour l'étude de nombreux gènes végétaux (voir pour des exemples récents : Grønlund *et al.*, 2010; Buendia *et al.*, 2015; Groten *et al.*, 2015a; Lee *et al.*, 2015) et plus récemment pour l'étude de gènes de champignons transformables (Mascia *et al.*, 2014), cette technique peine à être développée pour inhiber l'expression de gènes d'organisme interagissant avec un hôte. On parle ainsi de VHIGS (pour Virus Host-induced gene silencing). En effet, des premiers essais pour tenter d'éteindre le gène *MST2* de *R. irregularis* (Helber *et al.*, 2011) par inoculation d'une plante sujette à l'expression des constructions virales se sont conclus par un échec (Groten *et al.*, 2015b), une explication pouvant être que les siRNAs générés par l'hôte ne peuvent diffuser dans le champignon. Cependant, une nouvelle tentative visant à éteindre une aqua-glyceroporine de *R. clarus* -*Rhizophagus clarus* aquaporin 3 ou RcaQP3 - fortement exprimée dans le mycelium intraracinaire a été couronnée de succès, mettant en lumière que les siRNAs pourraient bien diffuser dans le microorganisme (Kikuchi *et al.*, 2016).

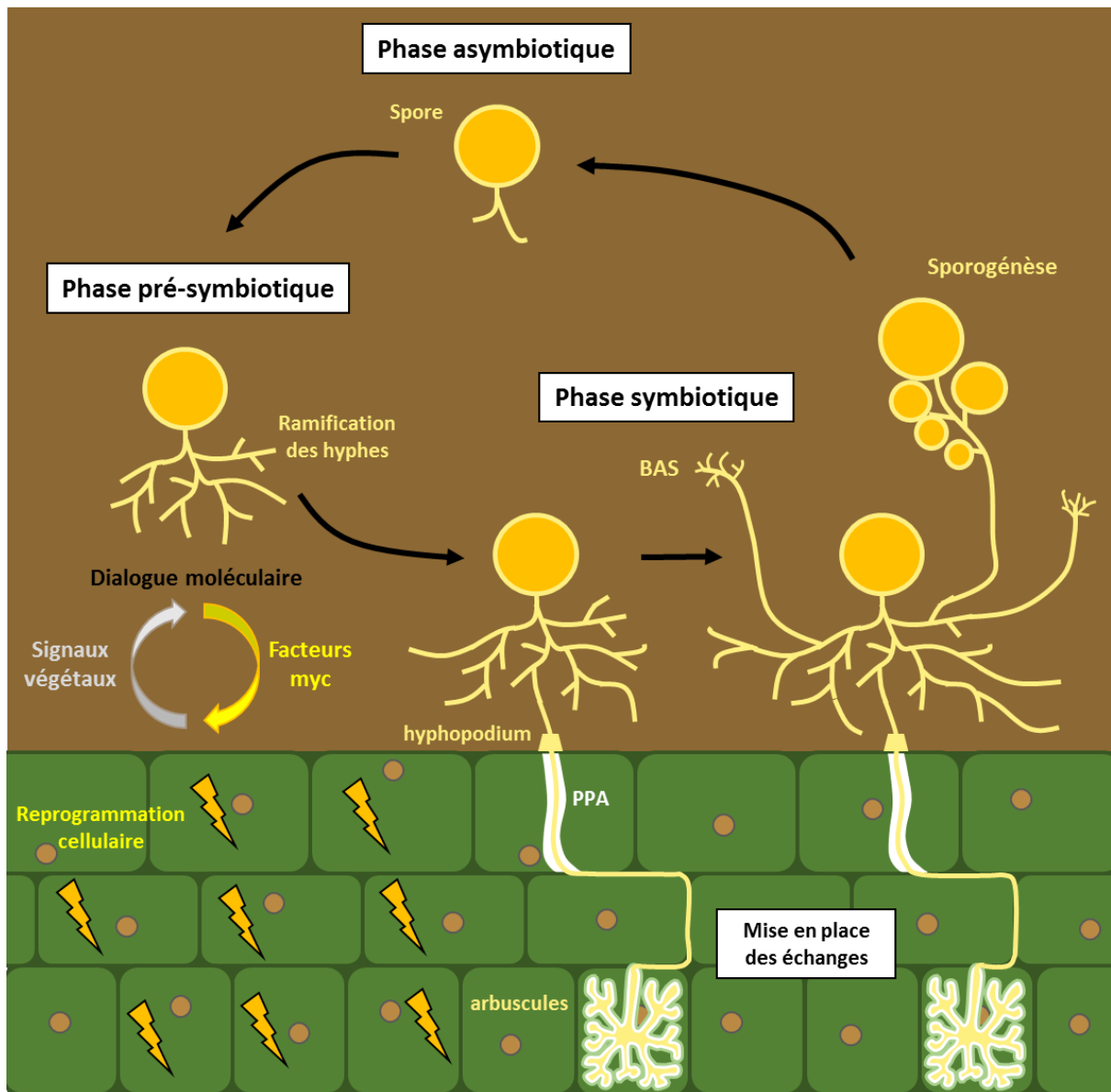
#### **4.2.4-Choix de l'organisme d'étude ?**

Comme mentionné précédemment, le fait que certaines espèces de CMA soient difficilement cultivables limite la liste des prétendants. Parmi les espèces les plus étudiées et pressenties pour occuper ce rôle, on distinguait: *Funneliformis mosseae* (ex *Glomus mosseae*), *Gigaspora sp.* (parmi lesquels *G. rosea*, *G. gigantea* et *G. gigantea*) et *Rhizophagus irregularis* (ex *Glomus intraradices*). Ces espèces ont l'avantage de se multiplier facilement en culture en pot sur des hôtes variés (poireaux, asperge, sorgho ...). Cependant, en culture axénique sur racines transformées, *F. mosseae* ne produit que très peu de spores (Mugnier & Mosse, 1987). De même, les *Gigaspora sp.* produisent peu de matériel biologique *in vitro* (Bécard & Fortin, 1988; Bécard & Piché, 1989; Chabot *et al.*, 1992). Ainsi, *Rhizophagus irregularis* s'est montré le plus

performant, particulièrement en utilisant des boîtes double compartiments (St-Arnaud *et al.*, 1996) et a donc été approuvé par la communauté scientifique.

## **5-Cycle biologique des CMAs et processus symbiotique**

Par souci de simplification, le cycle des CMAs est souvent décomposé en trois étapes distinctes d'interaction avec l'hôte, chacune pouvant regrouper plusieurs étapes développementales (schématisées en **Figure 5**).



**Figure 5 : Représentation schématique de différentes étapes de la biologie des CMAs.** Phase asymbiotique : les spores peuvent germer de manière autonome mais avec un développement limité. Phase pré-symbiotique (avant contact) : si une plante est dans le voisinage d'une spore en germination, un dialogue moléculaire s'effectue entre les deux partenaires menant à la ramification des hyphes fongiques et la reprogrammation des cellules végétales. Phase symbiotique : les hyphes en croissance adhèrent à la racine et forment un hyphopodium. L'hyphe va ensuite traverser les cellules épidermiques guidée par un appareil de pré-pénétration (PPA) et se propager de manière intercellulaire jusqu'aux cellules corticales où il formera une structure d'échange cellulaire hyper-ramifiée, l'arbuscule. L'établissement de la symbiose va se poursuivre par une propagation des hyphes extracellulaires (ERM) dans le sol environnant, permettant le recrutement des nutriments notamment par des structures absorbantes ramifiées (BAS). Les ERM sont également le site de formation de nouvelles spores (sporogénèse).

## **5.1-Phase asymbiotique**

Cette phase consiste en une germination autonome et transitoire des spores hors stimuli végétaux, pouvant être déclenchée par des facteurs environnementaux tels qu'un changement de température et d'hygrométrie, la perception de certaines longueurs d'onde lumineuses, des variations de pH ou encore par l'influence de microorganismes (Schenck *et al.*, 1975; Daniels & Trappe, 1980; Azcon-Aguilar *et al.*, 1986; et voir Giovannetti, 2013 pour une revue complète plus récente). Les spores de CMAs sont riches en composés de réserve de nature lipidique (Olsson & Johansen, 2000; Trépanier *et al.*, 2005) permettant aux spores en germination une autonomie énergétique de plusieurs jours (Bécard *et al.*, 2004). Toutefois en absence d'un partenaire végétal, la germination s'arrête, entraînant selon les espèces une septation des hyphes avec rétractation du cytoplasme dans la spore initiale ou dans de nouvelles spores plus petites nouvellement formées (Hildebrandt *et al.*, 2002). Ce processus peut être reconduit plusieurs fois (Koske, 1981) sans forte diminution des réserves énergétiques des spores initiales (Bécard *et al.*, 2004). Ce mécanisme de conservation énergétique augmente la probabilité pour le champignon de rencontrer une racine.

## **5.2- Dialogue moléculaire en phase pré-symbiotique**

Dans la rhizosphère, des signaux vont être échangés entre le microorganisme et son partenaire végétal afin de préparer chaque protagoniste à l'établissement de cette étroite relation. Ainsi, les CMAs perçoivent le voisinage d'une racine hôte par la détection de composés exsudés par cette dernière et en retour, le champignon relâche dans la rhizosphère des composés déclenchant le programme génétique symbiotique de son futur hôte (Gutjahr & Parniske, 2013; Oldroyd, 2013; Bonfante & Genre, 2015).

### **5.2.1-Les principaux signaux végétaux**

Au voisinage d'une racine de plante hôte, les CMAs présentent une activation de leur activité métabolique avec une ramification intense des hyphes déclenchée par la perception d'exsudats racinaires (Bécard & Piché, 1989; Giovannetti *et al.*, 1996) ce qui n'est pas observé pour les exsudats de plantes non hôtes (Bécard & Piché, 1990; Schreiner & Koide, 1993; Nagahashi & Douds, 2004). Les tentatives d'identification des composés actifs inducteurs de

la ramification des hyphes de spores en germination (« branching factors ») durant une quinzaine d'année ont donné lieu à de multiples publications (citons Buée *et al.*, 2000; Nagahashi & Douds, 2000).

#### **5.2.1.1-Les flavonoïdes**

Cette famille de composés très diversifiés, largement répandue dans les différentes familles végétales, a été très tôt soupçonnée d'être responsable de l'activation de la ramification des hyphes de CMA en germination par les exsudats racinaires (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1989; Bécard *et al.*, 1992). Des accumulations de flavonoïdes sujettes à bouleversement induites par les CMAs lors des étapes tardives de l'interaction ont été observées laissant suggérer un rôle de régulation de la symbiose par ces composés (Larose *et al.*, 2002; Catford *et al.*, 2006). Par ailleurs, ils ont été montrés comme jouant un rôle important dans l'activation de gènes impliqués dans la synthèse de molécules signalétiques chez les bactéries fixatrices d'azotes (Maxwell *et al.*, 1989; Abdel-Lateif *et al.*, 2012). Toutefois, l'observation selon laquelle des mutants de maïs déficients en chalcone synthase (enzyme en amont de la voie de biosynthèse des flavonoïdes) ne présentent pas de phénotype mycorhizien perturbé indique que ces composés n'ont pas un rôle essentiel dans les étapes précoces de la symbiose (Becard *et al.*, 1995).

#### **5.2.1.2-Les strigolactones**

L'utilisation d'approches analytiques plus fines a permis d'analyser des composés exsudés présents à l'état de trace dans les exsudats racinaires : les strigolactones (SLs - Akiyama *et al.*, 2005). Les SLs agissent en activant la germination des spores, la ramification et la croissance des hyphes (Akiyama *et al.*, 2005; Besserer *et al.*, 2006). Ces SLs, initialement identifiées pour leur rôle de signal de germination des graines de plantes parasites (Cook *et al.*, 1966, 1972) ont par la suite été décrites comme une nouvelle famille d'hormones végétales (voir Lopez-Obando *et al.*, (2015) pour revue). L'utilisation d'un analogue synthétique de SLs, le GR24, a permis de mettre en évidence l'action de ces composés sur l'activation du métabolisme énergétique des hyphes en germination (Besserer *et al.*, 2006, 2008, 2009). Cependant, bien qu'activant la croissance des hyphes de spores en germination, les SLs ne sont pas plus obligatoires que les flavonoïdes pour l'établissement symbiotique : des plants de maïs (*Zea*

*mays*) fortement impactés dans la production de ces phytohormones peuvent être mycorhizés (Gomez-Roldan *et al.*, 2007). Toutefois l'histoire n'est pas terminée, et des interconnexions entre le développement *in planta* des champignons mycorhiziens et ces voies hormonales ont été décrites (Gutjahr *et al.*, 2015).

### **5.2.1.3-Les lipides**

Si des acides gras hydroxylés à longue chaîne ont été décrits comme activant la croissance des hyphes de spore en germination (Nagahashi & Doude, 2011), c'est dans des stades plus tardifs que l'action des lipides semble être particulièrement importante. Un marqueur de la transition du champignon du stade pré-symbiotique à la physiologie symbiotique est la différenciation de la structure invasive des racines : l'hyphopode. Cette différenciation apparaît sous influence de signaux de perception de l'hôte. En effet, il a été montré que *Gigaspora gigantea* était capable de développer des hyphopodes au contact de fragments cellulaires pariétaux isolés d'une plante hôte (la carotte), et non sur des fragments isolés d'une plante non hôte (la betterave) (Nagahashi & Doude, 1997). En 2012, Wang et collaborateurs ont mis en évidence que le mutant *ram2* (« required for arbuscular mycorrhization 2 ») de *Medicago truncatula* présentait une forte réduction de l'invasion des racines, caractérisée par un faible nombre d'hyphopodes ainsi qu'une réduction globale de la mycorhization avec des arbuscules anormaux. RAM2 code pour une glycerol-3-phosphate acyl transférase (GPAT) impliquée dans la synthèse de subérine et de cutine. La mutation *ram2* a été montrée comme pouvant être complémentée par l'apport exogène de monomères d'acides gras, révélant une importance des acides gras dans les étapes précoces symbiotiques.

### **5.2.2-Les signaux d'origine fongique perçus par les plantes**

Ces signaux consistent majoritairement en des composés dérivés de la chitine fongique, à base de N-acétyl glucosamine (NAG).

#### **5.2.2.1-Les lipochitoooligosaccharides**

Nos connaissances sur les lipo-chito-oligosaccharides (LCO) sont issues des travaux portant sur les bactéries fixatrices d'azote des genres *Rhizobium* et associées. Ces composés correspondent aux signaux symbiotiques appelés facteurs Nod (NFs), nécessaires pour

l'activation chez les légumineuses hôtes de gènes symbiotiques impliqués dans les processus d'infection et dans l'organogénèse nodulaire (Lerouge *et al.*, 1990; Dénarié *et al.*, 1996; Oldroyd *et al.*, 2009; Gough & Cullimore, 2011). Les NFs sont des chitooligosaccharides (N-acétyl glucosamine en liaison beta 1-4, ou NAG) que l'on trouve également dans la chitine des parois fongiques. Par analogie à la signalisation induite par ces composés bactériens, il a été émis l'hypothèse que les CMAs pouvaient également sécréter des signaux symbiotiques (appelés facteur de mycorhization ou « facteurs myc ») pouvant activer des gènes de plantes dont certains sont partagés entre les deux symbioses (Catoira *et al.*, 2000). L'ensemble des gènes communs à ces processus constitue la voie de signalisation commune symbiotique ou CSP (pour « Common Symbiotic Pathway »). Plusieurs études ont montré que les CMAs sécrètent des molécules diffusibles induisant des réponses chez l'hôte de manière dépendante ou indépendante de la CSP (Oláh *et al.*, 2005; Gutjahr *et al.*, 2008; Kosuta *et al.*, 2008; Chabaud *et al.*, 2011). Se basant sur l'hypothèse que ces facteurs myc pouvaient être proches des NFs, des LCOs fongiques (ou myc-LCOs) ont pu être identifiés chez les CMA (Maillet *et al.*, 2011). Ces myc-LCOs favorisent la mycorhization des plantes après ajout exogène et promeuvent l'apparition de racines latérales dépendamment de la CSP. Outre les myc-LCOs, des études font état de l'existence d'au moins un autre signal fongique actif pouvant être reconnu par *M. truncatula* (Kosuta *et al.*, 2008; Chabaud *et al.*, 2011). Cette hypothèse est supportée par des données acquises sur le riz (*Oryza sativa*) révélant une signalisation empruntant des voies dépendantes et indépendantes de la CSP (Gutjahr *et al.*, 2008).

### 5.2.2.2-Les chitooligosaccharides

En plus des LCOs, les CMAs produisent également des oligomères de chitine ou Chitooligosaccharides (COs) composés d'une chaîne linéaire relativement courte de 4 à 5 résidus de NAG (CO<sub>4-5</sub>) dont la production est augmentée par un apport exogène de GR24 (Genre *et al.*, 2013). Ces derniers sont capables d'activer la CSP et de produire à l'image des myc-LCOs, des oscillations calciques chez *M. truncatula* et *D. carota* mais dont les profils sont plus anarchiques (Genre *et al.*, 2013). Il est important de noter que les COs symbiotiques sont très proches des CO<sub>7-8</sub> produits par les pathogènes qui déclenchent des réactions de défense et activent également une réponse calcique (Kombrink *et al.*, 2011; Nars *et al.*, 2013; Rey *et*

*al.*, 2013). On peut donc se demander comment la plante est capable de discriminer des signaux si proches mais déclenchant des réactions antagonistes. Une explication pourrait résider dans les différences constatées entre les profils d'oscillation en réponse aux COs d'origine pathogène ou symbiotique (Nars *et al.*, 2013; Genre *et al.*, 2013).

Bien que le rôle joué par les myc-COs lors de la mise en place des processus symbiotiques reste encore inconnu, leur importance semble varier selon les hôtes. Ainsi, une étude récente s'intéressant aux différences entre myc-LCOs et -COs chez des légumineuses (*M. truncatula* et *Lotus japonicus*) et une céréale (*Oryza sativa*), a montré des réponses différentielles quant à l'activation de la CSP et l'activation des réponses calciques (Sun *et al.*, 2015). Chez le riz, les myc-COs sont montrés par exemple comme seuls activateurs des oscillations calciques chez les cellules ne formant pas de poils (cellules atrichoblastiques) alors qu'un mix de myc-LCOs et -COs est requis pour les cellules trichoblastiques. A l'inverse, chez *M. truncatula* la stimulation des racines latérales ne se fait que par les myc-LCOs, alors que les myc-COs semblent nécessaires chez le riz. Ces observations indiquent que selon les hôtes, la perception des facteurs myc diffèrerait, et que différentes plantes répondraient à différents composés parmi l'ensemble des signaux produit par les CMAs. Ces observations pourraient être un premier pas dans la compréhension du spectre d'hôte très vaste des CMAs et celui très restreint des bactéries fixatrices d'azotes, chaque *Rhizobium sp.* étant montré comme possédant ses propres structures de LCOs (Gough & Cullimore, 2011).



## 5.3-Etablissement d'une relation étroite en phase symbiotique

### 5.3.1-Pénétration racinaire

La pénétration s'effectue au contact de la racine après différenciation d'une structure d'adhésion et de pénétration, l'hyphopode, dont le mécanisme d'action reste encore inconnu. Il ne peut être totalement assimilé à un appressorium, structure d'effraction des agents pathogènes fongiques et oomycètes, qui utilisent pour percer les surfaces cellulaires une combinaison de forces mécaniques par augmentation de la pression de turgescence et de dégradations enzymatiques (Bastmeyer *et al.*, 2002). De plus, bien que des facteurs de transcriptions similaires soient impliqués dans le développement de ces deux structures (Tollot *et al.*, 2009), l'hyphopode n'est pas une structure septée et ne présente pas d'épaississement pariétal, rendant impossible une action mécanique d'effraction cellulaire. Les données génomiques de CMA indiquent par ailleurs une quasi absence d'enzyme de lyse de la paroi cellulaire végétale (Tisserant *et al.*, 2013). Cet hyphopode est formé au contact de cellules atrichoblastiques (Harrison, 2005). Concomitamment à cette formation, des reprogrammations géniques s'opèrent chez l'hôte (Breuninger & Requena, 2004; Chabaud *et al.*, 2011) et plus particulièrement dans les cellules épidermiques au contact de la structure fongique. Des études d'imagerie *in vivo* utilisant des marqueurs fluorescents ont fait l'état dans cette cellule de la formation transitoire d'une structure formée par l'action de composants du Reticulum endoplasmique (RE) et du cytosquelette, nommé appareil de pré-pénétration ou PPA (pour « pre-penetration apparatus »). Ce PPA comprend un pont cytoplasmique liant le site d'adhésion du champignon situé à la surface cellulaire, au noyau migrant dans toute la cellule afin de délimiter une voie de passage pour l'hyphe fongique (Genre *et al.*, 2005). Ce mécanisme de guidage fongique a été montré comme étant conservé chez les espèces végétales hôtes, spécifique de l'activation par les CMAs à travers l'activation de réponses calciques. Le PPA semble être également associé à la construction de l'interface symbiotique à travers la formation d'une membrane en continuité avec la membrane plasmique, séparant la cellule du champignon lors du développement arbusculaire, nommée membrane péri-arbusculaire (PAM - pour « periarbuscular membrane ») (Genre *et al.*, 2008, 2009; Parniske, 2008).

### 5.3.2-Propagation dans les tissus

Après franchissement de la couche épidermique, le champignon va croître et se développer jusqu'au niveau des cellules du cortex interne. Cependant sa progression est restreinte à certaines zones. Ainsi, le champignon ne peut diffuser dans la zone d'élongation cellulaire ou au-delà de la bande de Caspari (Lauressergues *et al.*, 2012). Selon les plantes hôtes et les CMAs, deux types de colonisation ont été décrits, nommés types *Arum* et *Paris*, même si un gradient structural est le plus souvent observé (Dickson, 2004). Une colonisation mycorhizienne de type *Arum* est caractérisée par une croissance intercellulaire des hyphes intraracinaires, formant des structures arbusculaires très ramifiées, alors que le type *Paris* se distingue par un développement hyphal souvent intracellulaire avec formation d'arbuscules de forme spiralée et grossièrement ramifiés. Ces deux types de mycorhizes peuvent être retrouvés pour la colonisation d'une même plante hôte (Hong *et al.*, 2012).

Le développement de l'arbuscule est associé à des changements drastiques au sein de la cellule corticale, presque entièrement occupée par la vacuole et jouant un rôle structural important dans la racine (Harrison, 2012). Les changements opérés aux étapes précoces seraient similaires à ceux observés lors de la formation du PPA avec développement d'une membrane qui servira à isoler l'arbuscule du reste de la cellule (Genre *et al.*, 2008). Pour illustrer, le noyau va se déplacer au centre de la cellule, la vacuole va s'invaginer, les plastes et mitochondries vont proliférer, formant un réseau plastidial autour de l'arbuscule, interprété comme une réponse cellulaire à la demande importante en acide gras durant la synthèse de la PAM (Fester *et al.*, 2001; Lohse *et al.*, 2005; Pumplin & Harrison, 2009).

L'exocytose de vésicules golgiennes permet l'extension de la PAM au gré de l'extension de l'arbuscule dans les cellules (Genre *et al.*, 2012). L'importance de cette exocytose pour le développement arbusculaire a été illustrée chez le lotier où la dérégulation de l'expression par des approches RNAi d'un gène codant pour une Qb-SNARE servant d'ancrage aux vésicules, *LjVT112*, a été décrite comme interrompant la croissance des arbuscules (Lota *et al.*, 2013). Mais il existe également d'autres protéines impliquées dans le développement de la PAM. On peut citer comme exemple la VAPYRIN et EXO701, deux protéines interagissant entre elles, importante pour les processus de développement de la PAM (Pumplin *et al.*, 2010; Feddermann & Reinhardt, 2011; Zhang *et al.*, 2015). Bien que des approches mutantes chez

les plantes aient permis d'identifier des gènes impliqués dans le développement des hyphes intracellulaires, ces données se font toujours attendre côté CMAs (Gutjahr & Parniske, 2013). Cependant la disponibilité de nouvelles techniques laisse augurer de la caractérisation prochaine des gènes fongiques équivalants (Baulcombe, 2015).

### **5.3.3-Mise en place de la fonctionnalité symbiotique**

La formation de l'interface symbiotique nécessite la mise en place de nombreux éléments participant aux échanges entre le symbionte et son hôte. C'est pourquoi des modifications de l'expression de nombreux gènes sont opérées dans les cellules accueillant des arbuscules ainsi que dans les cellules adjacentes comme montrées par différentes études couplant de la microdissection laser avec des analyses transcriptomiques (Gomez & Harrison, 2009; Gomez *et al.*, 2009; Hogekamp *et al.*, 2011; Gaude *et al.*, 2012, 2015). Ces changements concernent principalement des gènes impliqués dans le transport, les processus de régulation transcriptionnelle et le métabolisme des lipides (Gaude *et al.*, 2012). Parmi les transporteurs dont l'expression est induite par les CMAs, on retrouve des protéines impliquées dans la translocation du phosphate (Javot *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2012; Breuillin-Sessoms *et al.*, 2015), d'ammonium (Guether *et al.*, 2009; Koegel *et al.*, 2013; Pérez-Tienda *et al.*, 2014), de sucres (Doidy *et al.*, 2012; Boldt-burisch *et al.*, 2014; Manck-Götzenberger & Requena, 2016) et potentiellement d'acides gras (Gaude *et al.*, 2012; Kobae *et al.*, 2014). Bien que les données soient moins abondantes côté CMA, plusieurs transporteurs ont cependant pu être identifiés. Parmi les plus récemment identifiés, on peut citer RiMST5 et RiMST6, deux transporteurs de sucres chez *R. irregularis* (Ait Lahmidi *et al.*, 2016), GintAMT3, un transporteur d'ammonium à faible affinité également chez *R. irregularis* (Calabrese *et al.*, 2016), GigmPT, un transporteur de phosphate à haute affinité de *Gigaspora margarita* (Xie *et al.*, 2016). D'autres exemples de transporteurs végétaux et fongiques décrits dans la symbiose MA ont été recensés par Garcia *et al.*, (2016).

### **5.3.4-Croissance extra racinaire**

Dès lors que les échanges de nutriments se mettent en place, le champignon commence à développer son mycélium extraracinaire ou ERM (pour « extraradical mycelium ») dans le sol environnant (Bago, 2000). Cette prolifération comprend la prolifération d'hyphes rampants

droits à paroi épaisse, le développement de structures absorbantes ramifiées (BAS pour « branched absorbing structure ») et la formation de nouvelles spores permettant au champignon de compléter son cycle biologique (Bago *et al.*, 1998a,b). Les BAS présentent des ramifications très fines et semblent être les structures principales d'acquisition des nutriments dans le sol (Bago, 2000). Concernant les hyphes rampants, ils sont la zone de formation des nouvelles spores fongiques (Declerck *et al.*, 2005). Le développement de ces ERM va permettre d'augmenter la surface de prospection des nutriments par la plante *via* le champignon, ces derniers devenant une continuité des racines plus efficace pour puiser d'avantage de nutriments (Sawers *et al.*, 2017). Les ERM participent de façon très active à interconnecter les plantes entre elles *via* la formation d'un réseau mycélien commun (Song *et al.*, 2010; Gilbert & Johnson, 2016). Dans ce sens, des observations ont montré que les ERM étaient capables de coloniser plus efficacement un nouvel hôte que des spores germées (Plenchette *et al.*, 1982).

## **6-Nature des échanges trophiques hôte-CMAs**

Bien que les travaux de cette thèse ne ciblent les échanges trophiques hôte-champignon, il me paraît inévitable de présenter un état des connaissances dans le domaine. Comme déjà précisé, cette symbiose ubiquiste doit son succès majoritairement au bénéfice trophique réciproque entre les deux partenaires. Le champignon associé à l'hôte est un prolongement des racines, augmentant le volume de sol exploré et permettant un approvisionnement supérieur en nutriments pour la plante. En retour, la plante fournira une source de carbone indispensable au développement du partenaire fongique (Shachar-Hill *et al.*, 1995). Etant donné le coût carbone que représente cette association, son bénéfice agronomique n'est pas systématique (Walder & van der Heijden, 2015). De plus, le fait qu'un même CMA puisse coloniser simultanément plusieurs espèces de plantes, et ainsi participer à l'interconnexion entre individus d'espèces végétales différentes à des stades de développement variables complexifie les modèles prédictifs (Bever *et al.*, 2010).

### **6.1-Apport en phosphore**

Le Phosphore (P), est un élément central dans le développement végétal. Ce macronutriment, représentant 0,2% du poids sec de la plante, est requis pour tous les processus

développementaux et de reproduction chez les plantes. Bien que présent en quantité suffisante dans le sol, le phosphore, sous sa forme de phosphate inorganique (Pi), y est très peu mobile et faiblement disponible dans le sol, créant rapidement une zone de carence autour des racines des plantes (Bolan, 1991; Schachtman *et al.*, 1998). Les CMAs pourraient subvenir jusqu'à 90% des besoins en phosphore de la plante selon les espèces (Van Der Heijden *et al.*, 2008). Il s'agit là d'une incidence majeure de cette symbiose. La plante elle-même va favoriser l'acquisition du phosphore par la voie mycorhizienne en réprimant sa voie directe d'acquisition à travers les épidermes racinaires et les poils absorbants (Smith & Smith, 2011). Le phosphate serait puisé dans le sol par l'action de transporteurs fortement exprimés au niveau des hyphes extraracinaires (Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001; Benedetto *et al.*, 2005), en synergie avec l'action de bactéries solubilisatrices du phosphore dans le sol (Zhang *et al.*, 2016). Le phosphore est par la suite transféré par voie vacuolaire sous forme de polyphosphate (polyP) (Hijikata *et al.*, 2010) dont la charge négative serait neutralisée par l'import de cations inorganiques (Kikuchi *et al.*, 2014). Ce mouvement serait guidé par les mécanismes d'évapotranspiration de l'hôte combinée à l'action d'aquaporines fongiques (Kikuchi *et al.*, 2016). Une fois la zone d'échange arbusculaire atteinte, le polyP serait catabolisé par des phosphatase alcalines afin de libérer du Pi dans l'espace apoplastique periarbusculaire (Ezawa *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2013). A ce jour, les mécanismes régissant l'efflux de ce Pi sont toujours inconnus. Côté plante, des études de transcriptomique sur plantes mycorhizées ont participé à la caractérisation de gènes membres de la sous famille 1 de transporteurs de phosphates (PHT1) précédemment montrés comme ayant un rôle important dans la symbiose (Javot *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2013). On peut y citer MtPT4 chez *Medicago truncatula* (Harrison *et al.*, 2002), OsPT11 chez le riz (*Oryza sativa*) (Paszkowski *et al.*, 2002), ou encore AsPT4 d'*Astragalus sinicus* (Xie *et al.*, 2013), tous trois situés au niveau de la membrane periarbusculaire. Une perte de fonction de ces transporteurs affectera négativement la symbiose à travers la dégénérescence des arbuscules (Javot *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2013). De même, un suppression de la carence de la plante en phosphate par un apport (suite à l'ajout d'engrais phosphatés par exemple) aura également des effets néfastes sur l'interaction et l'établissement symbiotique (Menge *et al.*, 1978; Jasper *et al.*, 1979; Amijee *et al.*, 1989; Balzergue *et al.*, 2011; Nouri *et al.*, 2014). Enfin, il y a une corrélation entre le niveau d'expression des gènes PHT1, la biomasse fongique dans les sols, et l'efficacité mycorhizienne (bénéfice agronomique sur la plante ; Sawers *et al.*, 2017).

## 6.2-Apport en azote

Bien que l'on considère le phosphate comme élément majeur du maintien de l'établissement symbiotique, l'azote n'en serait pas moins important. Ceci est illustré par le fait que des mutants de transporteurs de phosphate chez *M. truncatula* ne présentent plus un phénotype de dégénérescence arbusculaire en condition de carence en azote (Javot *et al.*, 2007; Breuillin-Sessoms *et al.*, 2015). Les CMAs joueraient un rôle important dans son assimilation (Smith *et al.*, 2010). On considère que l'azote (N) est majoritairement présent dans les sols sous forme de nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) et d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) (Xu *et al.*, 2012) mais également sous forme d'acides aminés (Hawkins *et al.*, 2000). A l'image de ce qui est décrit pour le phosphore, les transporteurs de ces formes azotées seraient réprimés chez l'hôte (Burleigh, 2001; Kobae *et al.*, 2010) alors que les transporteurs d'azote induits lors de la mycorhization sont quant à eux régulés positivement (Gomez *et al.*, 2009; Guether *et al.*, 2009; Kobae *et al.*, 2010; Koegel *et al.*, 2013). Or, le nitrate et l'ammonium sont des sources d'azote assez mobiles et non susceptibles d'arriver à épuisement. L'avantage conféré par l'association avec le symbionte fongique est que son système d'absorption de l'azote serait plus efficace - jusqu'à cinq fois plus affin pour l'ammonium par exemple - que les mécanismes d'absorption classiques de la plante, permettant aux CMAs de prélever de l'azote même dans des sols à faible teneur (Pérez-Tienda *et al.*, 2012). Cet azote, converti ensuite en arginine, est transféré à l'intérieur des vacuoles le long des hyphes jusqu'à la zone arbusculaire, où il est dégradé afin de libérer les ions ammoniums, lesquels sont exportés au partenaire végétal (Govindarajulu *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2007; Tian *et al.*, 2010). Plusieurs transporteurs d'ammonium de la famille AMT2, montrés comme étant positivement régulés durant la symbiose, ont été identifiés chez plusieurs espèces végétales (Gomez *et al.*, 2009; Guether *et al.*, 2009; Kobae *et al.*, 2010; Hong *et al.*, 2012; Pérez-Tienda *et al.*, 2012; Koegel *et al.*, 2013). Parmi ces transporteurs d'ammonium, deux - GmAMT4;1 chez le soja (*Glycine max*) et AMT3;1 chez le sorgho (*Sorghum bicolor*) - sont montrés comme étant localisés dans la membrane périarbusculaire (Kobae & Hata, 2010; Koegel *et al.*, 2013) rendant probable l'implication de ces transporteurs dans le transfert des ions ammoniums à travers la membrane de l'interface symbiotique.

### 6.3-Apport en eau

Par leur association aux racines de l'hôte, les CMAs participent à augmenter la résistance des plantes face à un stress hydrique (Augé, 2001; Compant *et al.*, 2010; Ruíz-Sánchez *et al.*, 2011). Cette résistance à la dessiccation peut s'expliquer par l'altération des flux d'eau à l'intérieur et à l'extérieur de la plante à travers le réseau mycélien, ainsi que par l'augmentation de l'apport de nutriments comme décrit précédemment. Pour argument physiologique, les expressions de GintAQPF1 et GintAQPF2, deux aquaporines de *R. irregularis* exprimées dans les cellules arbusculaires et le mycelium extraracinaire présentent une expression stimulée durant l'interaction avec des racines de maïs soumis à un stress hydrique (Li *et al.*, 2013). Des aquaporines ont été également identifiées côté plante. On peut citer *LjNIP1*, une aquaporine putative identifiée chez le lotier s'accumulant au niveau de la membrane interne de cellules infectées (Giovannetti *et al.*, 2012).

### 6.4-Les échanges carbonés

L'apport fongique de ces minéraux décrits précédemment au niveau de la zone arbusculaire se traduit par un échange d'une source de carbone vers les CMAs - montré pour la première fois par Ho & Trappe (1973) - nécessaire pour l'accomplissement de leur cycle biologique. On considère que la plante transférerait plus de 20% de son carbone provenant des photosynthétats (Jakobsen & Rosendahl, 1990; Wright *et al.*, 1998) permettant un enrichissement du sol en matière carbonée (Douds *et al.*, 2000; Graham, 2000). Les CMAs obtiendraient majoritairement leur source de carbone au sein de la racine de l'hôte au travers de l'action de transporteurs de monosaccharides (MST) fongique, capable de lier les sucres avec une forte affinité (Schussler *et al.*, 2006; Helber *et al.*, 2011). Furent ainsi identifiés un transporteur chez *Geosiphon pyriformis* (Schussler *et al.*, 2006) et trois transporteurs chez *Rhizophagus irregularis* dont un, MST2 a été montré comme étant exprimé à la fois dans les arbuscules et les hyphes intra-cellulaires à l'image du transporteur de phosphate MtPT4, confirmant des échanges autres que par la seule zone arbusculaire. Une réduction de l'expression de MST2 obtenue par HIGS confirme l'importance du transfert de carbone dans le maintien de la symbiose à travers la diminution de l'expression de MtPT4 et l'altération des arbuscules (Helber *et al.*, 2011). Le carbone serait acquis sous forme d'hexose (notamment

glucose et fructose), dont une faible proportion serait transformée puis stockée en glycogène (Bago *et al.*, 2003) et tréhalose (Bécard *et al.*, 1991), alors que la majorité serait transformée sous forme de lipides (Bago *et al.*, 2002). Toutefois, il était supposé jusqu'à très récemment que les CMAs utilisaient les hexoses pour synthétiser les lipides fongiques (Trépanier *et al.*, 2005). Cependant, les données génomiques obtenues sur différentes espèces fongiques ont révélé l'absence de l'enzyme responsable de la synthèse *de novo* des acides gras, la FAS (pour « fatty acid synthase ») chez les CMAs (Wewer *et al.*, 2014; Salvioli *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2016; Ropars *et al.*, 2016) soulevant la question de l'origine de ces lipides chez ces champignons « oléogéniques" (Kamel *et al.*, 2016 - voir **Annexe 5**).

## **7-Le sécrétome des CMAs**

### **7.1-Généralité sur les protéines sécrétées (SPs)**

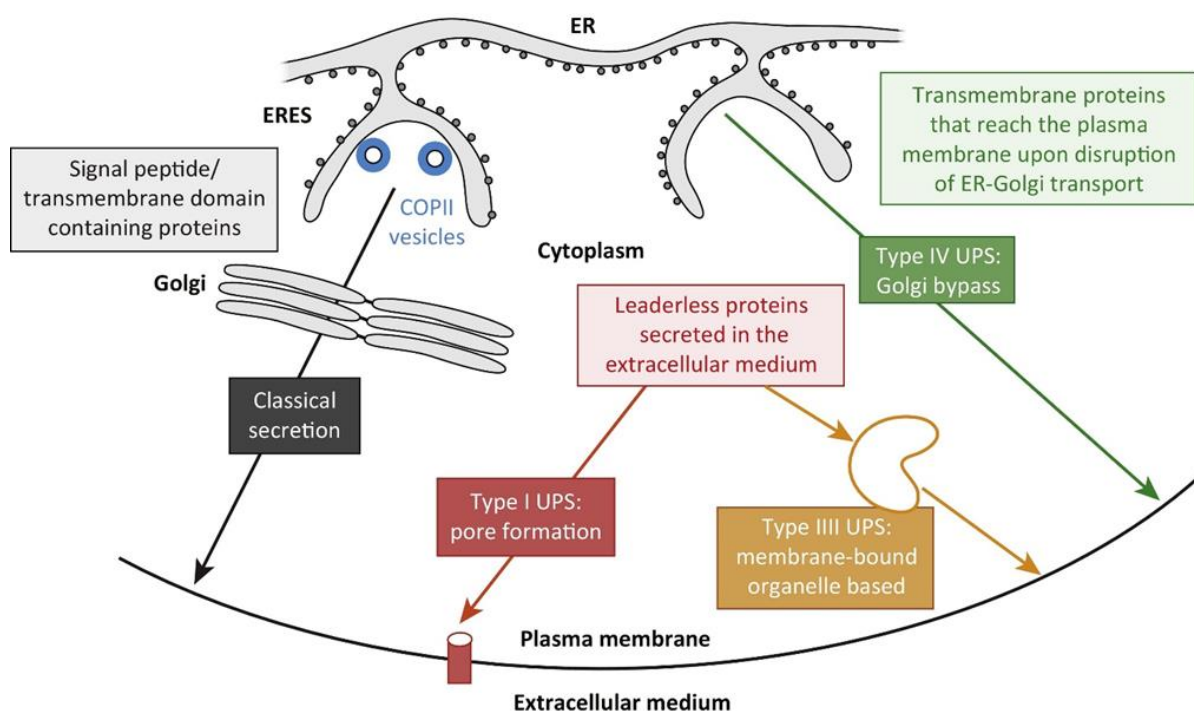
Pour s'adapter à leur environnement immédiat et répondre à de multiples variations, tous les systèmes cellulaires sécrètent des protéines. Ces protéines sécrétées (SPs) peuvent remplir diverses fonctions biologiques incluant un rôle immunitaire (Hooper *et al.*, 2003), hormonal (Cho *et al.*, 2002), d'acquisition de nutriments (Wymelenberg *et al.*, 2006), de construction et de remodelage de la paroi cellulaire (Cosgrove, 2005), de perception de conditions environnementales (Waters & Bassler, 2005) ou encore d'interaction avec d'autres organismes (Hiller *et al.*, 2004). Nous nous limiterons ici aux protéines sécrétées par les cellules eucaryotes.

#### **7.1.1-Les mécanismes de sécrétion chez les eucaryotes**

Il est postulé depuis une demi-décennie que les SPs et les protéines localisées dans la membrane plasmique cellulaire empruntent une même voie de sécrétion dite « classique ». Des protéines arborant en position N terminale une courte séquence reconnue pour l'export (appelée peptide signal) et/ou un domaine transmembranaire, sont internalisées au sein du réticulum endoplasmique (RE) à partir duquel elles transitent vers l'appareil de Golgi pour atteindre la membrane plasmique (MP) *via* des vésicules COPII (COPII-coated vesicles) (Viotti, 2014). Cependant, des études ont montré que cette voie n'est pas unique, et que des protéines peuvent atteindre la MP ainsi que l'espace extracellulaire sans passer par la voie RE-



Golgi. On parle ainsi de mécanismes de sécrétion non conventionnels, dans lesquels deux catégories de protéines sont retrouvées (**Figure 6**). Dans la première, les protéines cytoplasmiques traversent la membrane en dépit de la présence d'un peptide signal (PS) ou d'un domaine transmembranaire. La translocation de ces protéines peut se faire selon trois mécanismes : 1- à travers des pores (Type 1) ; 2- par des transporteurs ABC dédiés à la sécrétion (Type 2) ; 3- à travers des autophagosomes/endosomes (Type 3). La seconde catégorie correspond à des protéines empruntant une partie de la voie de sécrétion classique mais sans passage par l'appareil de Golgi (Type 4) (Rabouille, 2016). Ces voies non conventionnelles sont préférentiellement induites suite à des stress qui génèrent des altérations au niveau de la voie classique et constituent donc une solution de sécrétion alternative (Giuliani *et al.*, 2011).



**Figure 6 : Représentation des différentes voies de sécrétions des protéines.** D'après Rabouille, (2016).

## 7.1.2-Diversité des SPs

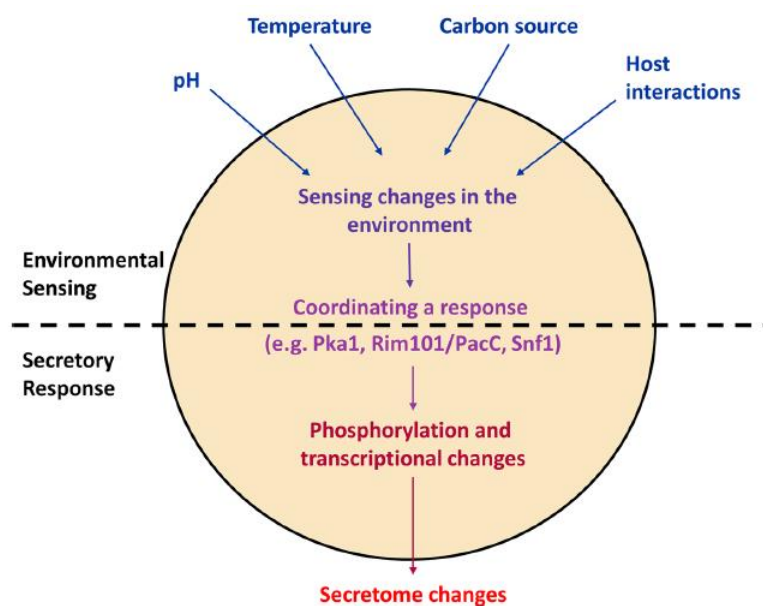
### 7.1.2.1-Définition générique du sécrétome

Ce néologisme a été initialement proposé dans le cadre de l'étude de la sécrétion de protéines par la bactérie *Bacillus subtilis*. Le sécrétome y est décrit comme l'ensemble des protéines

sécrétées et la machinerie de sécrétion de la bactérie (Tjalsma *et al.*, 2000). Une définition plus récente et généraliste le définit comme « l'ensemble des protéines sécrétées dans l'espace extracellulaire par une cellule, un tissu, un organe ou un organisme complet, à n'importe quel temps et condition, par des mécanismes de sécrétion connus ou inconnus impliquant des organites constitutifs ou régulés » (Agrawal *et al.*, 2010).

### 7.1.2.2-Sécrétome et adaptation aux contraintes environnementales

Les champignons constituent de par leur diversité et leur fréquence le premier groupe d'organismes interagissant avec les plantes, comme agent pathogène, mutualiste, et même indirectement en tant que décomposeur de la biomasse végétale. Ces différentes stratégies d'interaction combinées à l'adaptation aux variations environnementales influencent la richesse du sécrétome et la régulation de la sécrétion des protéines (Lowe & Howlett, 2012; McCotter *et al.*, 2016) (Figure 7).



**Figure 7 : Influence de signaux environnementaux et de facteurs de régulation sur la composition du sécrétome fongique.** Des variations quant à la voie d'export des protéines (conventionnelles ou non conventionnelles) peuvent également être impactées. D'après McCotter *et al.*, 2016.

### 7.1.2.3-Diversité et particularité des sécrétomes fongiques

#### La formation de la paroi cellulaire

Les champignons disposent d'une paroi cellulaire. Elle est une structure dynamique impliquée dans le maintien de la forme et de l'intégrité des cellules face aux nombreux stress auxquelles elles sont soumises. Cette barrière physique permet également aux cellules d'interagir avec

leur environnement. Néanmoins, elle doit également avoir une certaine plasticité afin de permettre la croissance, la division ainsi que la formation d'une myriade de types cellulaires durant le cycle de vie de ces organismes. La paroi fongique est constituée à 90% de polysaccharides –  $\beta$ -1,3-glucanes et  $\beta$ -1,6-glucanes,  $\alpha$ -1,3-glucanes et  $\alpha$ -1,4-glucanes, chitine, mannanes – ainsi que des protéines sécrétées nécessaires à son organisation et à sa dynamique (Pérez & Ribas, 2004; Latgé, 2007). Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, ces protéines sécrétées consistent principalement en des mannoprotéines hautement glycosylées qui forment la couche pariétale externe la moins perméable aux macromolécules, et des protéines qui se lient de manière covalente aux sucres pariétaux (protéines à ancre GPI, et de type Pir). D'autres protéines interviennent également dans des processus variés tels que l'adhésion, la dynamique (exemple des chitine déacétylases formant du chitosane), la croissance et dans le métabolisme de cette paroi (Klis *et al.*, 2002; Bowman & Free, 2006).

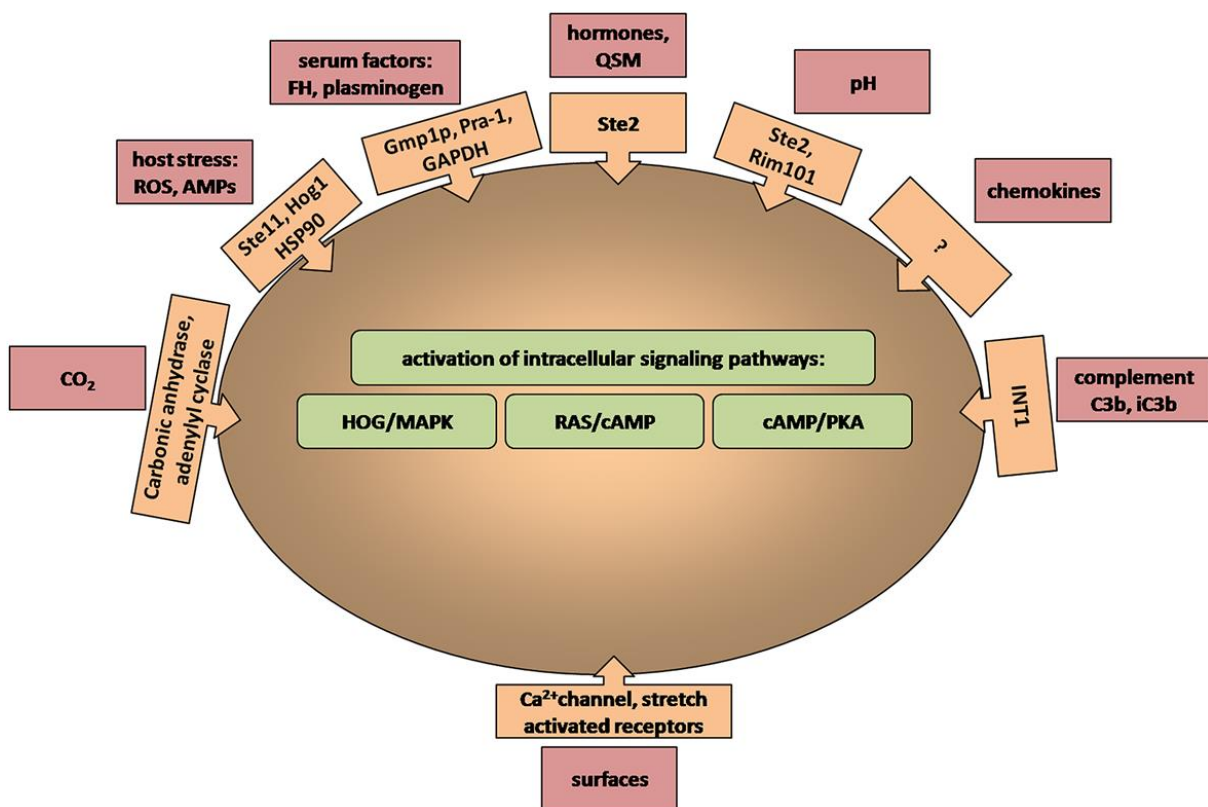
### **Dégradation de la biomasse végétale**

Les champignons sont des acteurs prépondérants de la dégradation de la biomasse végétale. La paroi végétale est composée de cellulose, d'hémicellulose et de lignine, engendrant une structure solide servant de source de carbone et d'énergie à de nombreux microorganismes. Les décomposeurs les plus performants de cette lignocellulose sont des asco- et basidiomycètes saprotrophes. Les champignons lignivores (White rot fungi) s'attaquent préférentiellement à l'hémicellulose et la lignine alors que d'autres (Brown rot fungi) préfèrent la cellulose et l'hémicellulose. Leur capacité à s'adapter à différentes sources de carbone et d'azote leur permet d'occuper des niches écologiques variées. Plusieurs protéines extracellulaires vont intervenir dans ces processus de dégradation de la matière. On peut citer comme intervenant des laccases, des peroxydases ou encore diverses enzymes hydrolytiques (Hatakka, 1994; Hofrichter, 2002; Anh *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2009; Singh Arora & Kumar Sharma, 2010; Girard *et al.*, 2013; Talbot *et al.*, 2015). Cet arsenal d'enzymes extracellulaires représente d'ailleurs une grande part du sécrétome de ces champignons (Girard *et al.*, 2013).

### **La perception des signaux**

Les champignons, comme la majorité des organismes vivants, sont exposés à des signaux environnementaux variés, nécessitant de la part de la cellule une réponse adaptée indispensable si elle veut survivre. Des complexes protéiques faisant office de récepteur de ces signaux sont ainsi nécessaires hors de la cellule et constituent la première étape d'une

voie de réponse. Chez les champignons, les récepteurs couplés à la protéine G (GPCR) sont la famille de récepteurs la plus représentée. Bien que non sécrétées dans l'environnement, ces protéines suivent souvent les voies de sécrétion pour être ancrées dans la membrane. Ces protéines transmembranaires parfois glycosylées perçoivent des stimuli aussi divers que la lumière, des protons, des signaux calciques, des séquences aminées ou nucléotidiques ou encore des acides gras (Maller, 2003) (Figure 8).



**Figure 8 : Exemples de signaux perçus par les champignons.** *Candida albicans* a été utilisé comme modèle ici. Les récepteurs correspondant aux différents signaux (en violet) apparaissent en rose. La plupart sont des membres des GPCRs. Les voies de signalisation déclenchées suite à la perception des signaux apparaissent en vert. D'après Braunsdorf *et al.*, (2016).

Leur implication dans la communication entre individus de même espèce à travers la perception de phéromones est un de ces rôles. Par exemple, chez *S. cerevisiae*, deux gènes, *STE2* et *STE3* avaient ainsi été montrés comme étant des récepteurs de phéromone, permettant d'activer des réponses cellulaires menant à la reproduction (Hagen *et al.*, 1986; Xue *et al.*, 2008). D'autres récepteurs ont également bien été identifiés et caractérisés depuis

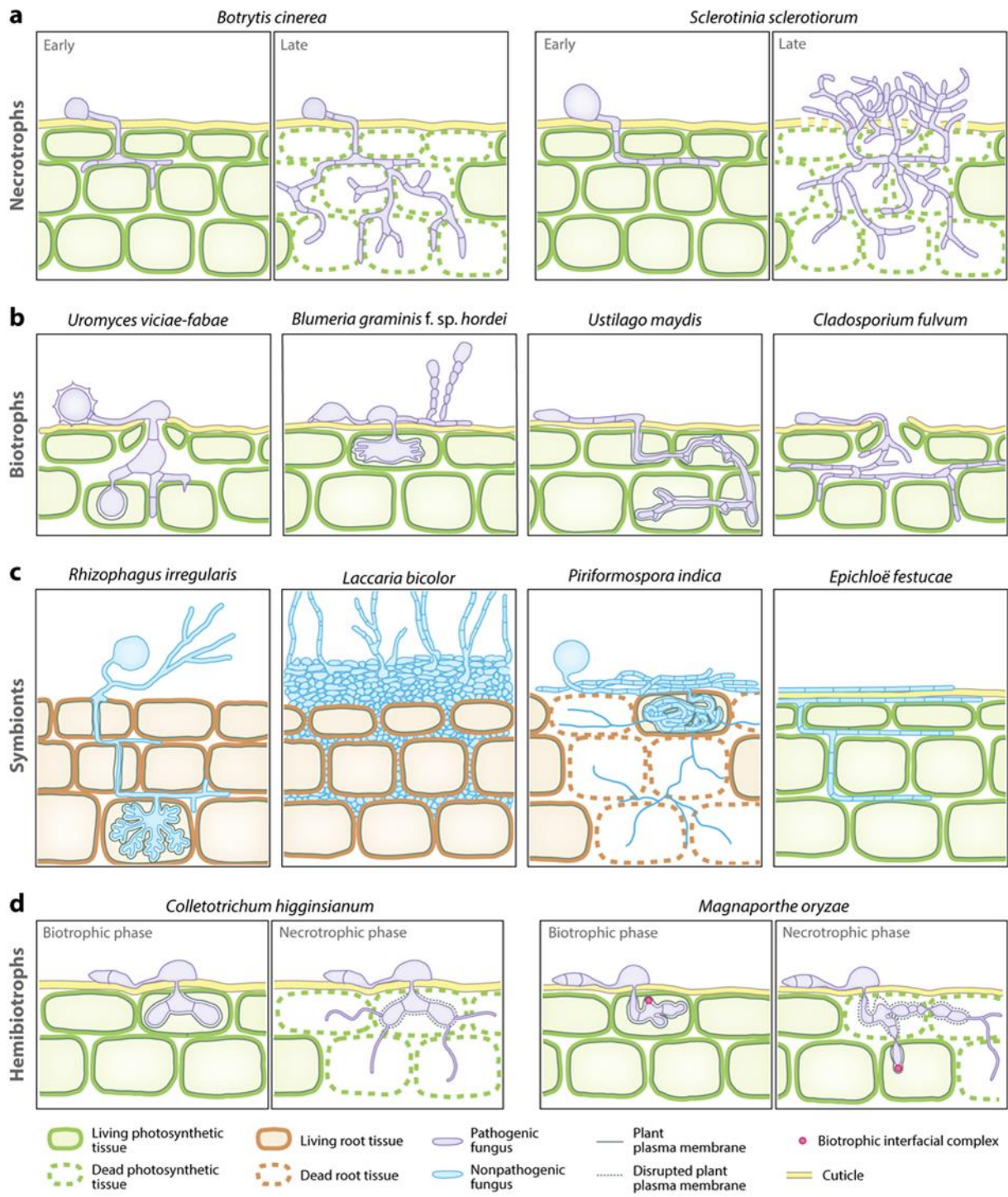
chez les ascomycètes mais également chez les basidiomycètes (Xue *et al.*, 2008; Braunsdorf *et al.*, 2016) (**Figure 8**).

#### **Des SPs impliquées dans l'interaction avec un hôte**

Une stratégie employée par les champignons pour réaliser leur cycle de vie passe par l'interaction avec un hôte. Ces interactions, qui peuvent être de nature parasitaire, commensale ou mutualiste (Leung & Poulin, 2008; Guttman *et al.*, 2014), peuvent se résumer en un contournement de l'immunité de l'hôte et la déviation métabolique permettant le développement du microorganisme (Dean *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2012; Girard *et al.*, 2013; Pellegrin *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016). Leurs fonctions seront détaillées dans la partie suivante.

## **7.2-Les sécrétomes de champignons interagissant avec les plantes**

Les champignons ont différents modes d'interaction avec les plantes (**Figure 9**). Sont différenciés les agents pathogènes **nécrotrophes** qui tuent les cellules végétales de l'hôte ; les agents **biotrophes** qui colonisent des tissus vivants pour réaliser de la déviation métabolique à leur profit. Certains agents phytopathogènes sont par ailleurs des **hémibiotrophes** qui établissent une première phase d'interaction biotrophe lors de la pénétration des tissus, avant de devenir nécrotrophe et de détruire les tissus infectés (Lo Presti *et al.*, 2015). Précisons enfin que selon que le microorganisme soit totalement ou transitoirement dépendant des nutriments de l'hôte, on parle respectivement de parasitisme obligatoire ou facultatif. De façon remarquable, ces différents modes d'interactions se reflètent dans les fonctions protéiques présentes dans les sécrétomes ainsi que dans leur abondance.



**Figure 9 : Différents modes de colonisation des plantes par les champignons. D'après Lo Presti et al., (2015).**

### 7.2.1-Du génome au sécrétome

L'investigation des génomes des champignons interagissant avec les plantes a débuté en 2005 avec le séquençage du champignon ascomycète pathogène du riz *Magnaporthe grisea* (Dean *et al.*, 2005). Depuis, le nombre de génomes fongiques disponibles croît de façon exponentielle, tant sur les espèces fongiques pathogènes (voir pour exemple Kämper *et al.*, 2006; Lévesque *et al.*, 2010; Spanu *et al.*, 2010; Amselem *et al.*, 2011; Duplessis *et al.*, 2011; Islam *et al.*, 2012; O'Connell *et al.*, 2012), qu'ectomycorhiziennes (Martin *et al.*, 2008a) et endomycorhiziennes (Tisserant *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014). De plus, un projet international coordonné par le JGI, prévoit actuellement de séquencer 1000 génomes fongiques. La disponibilité d'assemblages génomiques et/ou transcriptomiques combinés au développement d'outils informatiques prédisant la sécrétion d'une protéine permet d'avoir une vision d'ensemble de l'arsenal des SPs dont dispose un organisme (Choi *et al.*, 2010; Espino *et al.*, 2010; Lum & Min, 2011; Brown *et al.*, 2012; Guyon *et al.*, 2014). Il faut rappeler toutefois que certaines protéines sont sécrétées en dépit de l'absence de peptide signal, par des voies non conventionnelles décrites plus haut, limitant les prédictions de ces outils. Les approches protéomiques sur filtrats de culture permettent d'identifier des SPs quelles que soient les voies empruntées (Braaksma *et al.*, 2010; Espino *et al.*, 2010; Vincent *et al.*, 2012; Meijer *et al.*, 2014). Ainsi, 18% des protéines de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, seraient sécrétées mais entre 40% et 70% d'entre elles ne possèderaient pas de peptide signal (Alexandersson *et al.*, 2013). Des données similaires ont également été retrouvées chez les champignons (Giraldo *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014) et des oomycètes (Liu *et al.*, 2014). L'utilisation combinée de ces deux approches complémentaires donne une vision plus complète de l'ensemble des protéines extracellulaires comme montré pour les analyses du sécrétome d'*Aspergillus niger* (Braaksma *et al.*, 2010) et de l'oomycète *Phytophthora infestans* (Meijer *et al.*, 2014). Cependant des limitations d'ordre technique, comme la quantité de protéines analysables ou l'identification de différents membres de familles multigéniques par spectrométrie de masse perturbent ces investigations.

## **7.2.2-Le secrétome des champignons phytopathogènes**

Les exemples mis en exergue ci-après ont pour objectif de comparer les secrétomes des champignons pathogènes et mutualistes.

### **7.2.2.1-Les protéines dégradant la paroi végétale**

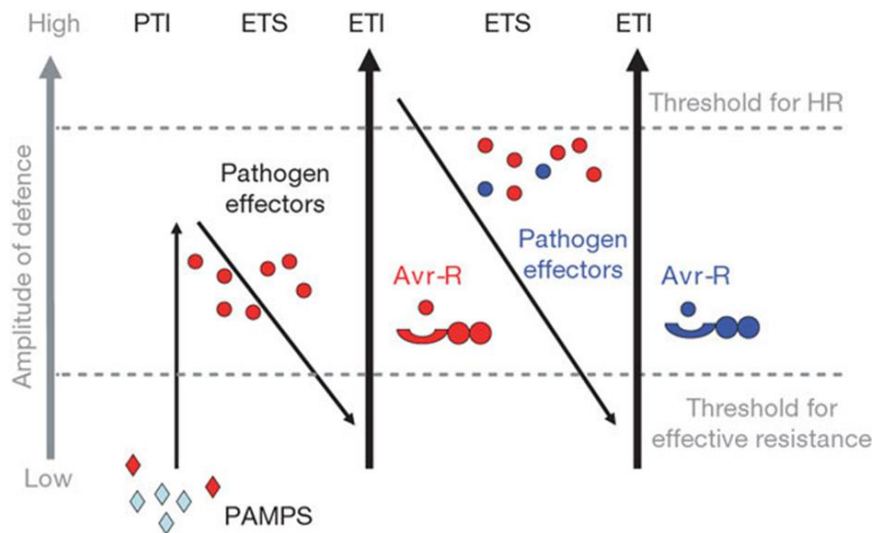
Les gènes codant pour des enzymes de dégradation de la paroi cellulaire végétale (CWDEs – Cell-wall-degrading enzymes) sont fréquents chez les champignons phytopathogènes, tant chez les nécrotrophes que les biotrophes (Kubicek *et al.*, 2014; Lo Presti *et al.*, 2015). Pour les champignons nécrotrophes, ces activités enzymatiques sont particulièrement importantes du fait que ces organismes ne possèdent pas de structure spécialisée de pénétration. Ces enzymes interviennent dans les étapes précoces pour la pénétration, mais également dans les étapes tardives de l'invasion d'un hôte (Gibson *et al.*, 2011) et participent à la dégradation des tissus végétaux entraînant la libération de monosaccharides et oligosaccharides utilisés pour le développement fongique. Différentes classes d'enzymes sont retrouvées dans le secrétome de ces champignons, dépendant de la nature de leur hôte (monocotylédone ou dicotylédone) (King *et al.*, 2011; Glass *et al.*, 2013). Ces enzymes sont généralement regroupées sous le terme d'enzyme actives sur les hydrates de carbone ou CAZymes (pour « Carbohydrate-Active Enzymes »), réparties en plusieurs familles selon leur séquence et leur structure (Lombard *et al.*, 2014).

### **7.2.2.2-Les protéines effectrices**

Quelles que soient les stratégies utilisées, tous les champignons induisent des mécanismes d'immunité végétale durant les processus invasifs. Ces défenses sont activées suite à la reconnaissance de motifs moléculaires conservés chez les microbes, nommés MAMPs et PAMPs (pour « Microbe/Pathogen Associated Molecular Pattern ») (Boller & Felix, 2009; Dodds & Rathjen, 2010). La paroi fongique est la première structure à entrer en contact physique avec les cellules végétales. Elle est composée de chitine, cible de protéines de défense de l'hôte (PR proteins) à activité chitinase qui libèrent des chito-oligosaccharides qui sont des MAMP (ou éliciteur) très efficaces pour l'activation des voies de défense (Kaku *et al.*,

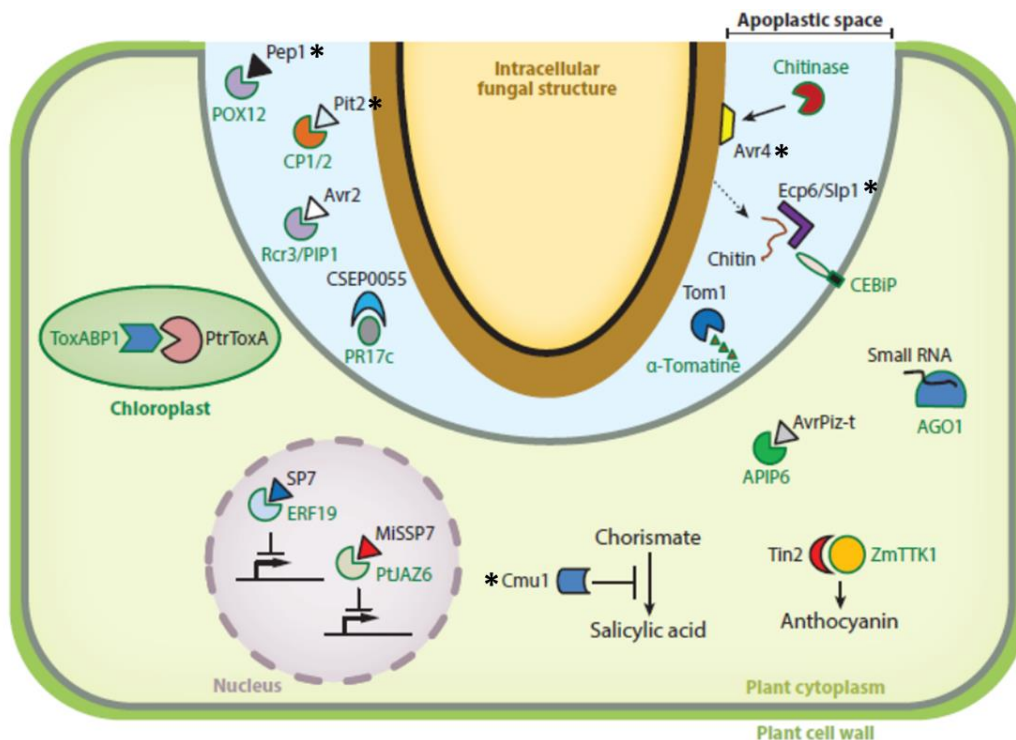


2006; Kombrink *et al.*, 2011; Gust *et al.*, 2012; Sanchez-Vallet *et al.*, 2015). Ces MAMPs sont reconnus par des récepteurs localisés dans la membrane, les PRR (pour « pattern recognition receptor ») qui participent à un mécanisme basal de défense cellulaire nommé PTI (pour « PAMP triggered immunity »). Ces PRRs peuvent également percevoir des produits de dégradation des cellules végétales, appelés DAMPs (Damaged associated molecular pattern). La reconnaissance de MAMP/DAMP par les PRRs entraîne des réponses de défense immédiates menant à la production d'hormones de défense, d'espèces réactives de l'oxygène (ROS – Reactive oxygen species), l'accumulation de composés antimicrobiens (phytoalexines) et l'induction de PR protéines telles que des protéases, chitinases ou encore des glucanases, ainsi que des inhibiteurs de protéases et diverses autres molécules (Dodds & Rathjen, 2010; Macho & Zipfel, 2014). Afin d'établir une interaction compatible menant à une prolifération, les champignons doivent donc limiter l'activité de cette PTI. Des protéines effectrices (ou effecteurs pour la suite) présentes dans le sécrétome de ces organismes fongiques mais également chez des bactéries, nématodes ou oomycètes, ont été montrées comme étant impliquées dans la manipulation de ces voies de défenses mais aussi de processus physiologiques et métaboliques de l'hôte (Alfano & Collmer, 2004; Bozkurt *et al.*, 2012; Mitchum *et al.*, 2013). Ce contournement des voies de défenses par les effecteurs est nommé ETS (pour « effector triggered susceptibility »). Dans certains cas, le système de surveillance des plantes reconnaît ces protéines effectrices au travers de protéines de résistance (R proteins), aboutissant à une seconde vague de défense spécifique appelée ETI (Effector triggered immunity) symbolisée par une réaction hypersensible (HR) entraînant la mort cellulaire pour limiter l'infection (Jones & Dangl, 2006; Gassmann & Bhattacharjee, 2012). La succession de ces événements peut être représentée par un schéma dit en zigzag (**Figure 10**).



**Figure 10 : Schéma en zigzag représentant la succession des réponses immunitaires végétales (amplitude of defence) selon la perception de l'organisme pathogène au travers des PAMPs/MAMPs ou des protéines effectrices.** Ces dernières sont nommées protéines d'avirulence (Avr proteins) lorsqu'elles sont reconnues par des protéines de résistance (R). Ce schéma combine une vision mécanistique et populationnelle des interactions, découlant sur une succession d'évènements adaptatifs des deux partenaires, constituant un moteur évolutif très puissant. Tiré de Jones & Dangl, (2006).

Plusieurs classes d'effecteurs ont été différenciées selon leurs mécanismes d'action et leurs localisations (**Figure 11**).



**Figure 11 : Mode d'action d'effeteur fongiques apoplastiques et cellulaires.** L'apoplaste est représenté en bleu clair et le cytoplasme de la cellule végétale en vert. Les effecteurs marqués d'un astérisque sont présentés dans le texte. Modifié d'après Lo Presti, (2015).

### Les effecteurs apoplastiques

L'apoplaste est défini comme le continuum de l'espace intercellulaire comprenant l'ensemble des composants hors de la membrane plasmique. Chez les végétaux, il est principalement composé de la paroi cellulaire et constitue la première zone de défense contre les agents pathogènes à travers la reconnaissance des MAMPs. Les champignons, lors de la colonisation de cet espace pour une propagation dans les tissus de leur hôte ont donc développé différentes stratégies pour surmonter la PTI dans ces espaces apoplastiques.

- La dissimulation des MAMPs

Une des stratégies employée est la dissimulation de ces MAMPs de la détection par les PRRs. L'effecteur Ecp6 de *Cladosporium fulvum* (Syn. *Fulvia fulva*) a été montré comme possédant des domaines LysM lui permettant de se lier à haute affinité avec les oligomères de chitine, entraînant une compétition avec les récepteurs à LysM de plantes dédiés à la perception de ces composés (hypothèse des "éponges à chitine" ; Bolton *et al.*, 2008; Jonge *et al.*, 2010; Sánchez-Vallet *et al.*, 2013). D'autres effecteurs du même type, Slp1 et Mg3LysM ont été respectivement identifiés chez *Magnaporthe oryzae* et *Mycosphaerella graminicola* et montrés comme également perturbant cette perception chez leurs hôtes respectifs (Marshall *et al.*, 2011; Mentlak *et al.*, 2012). Une perte de ces effecteurs entraîne par ailleurs une perte de la pathogénie de ces champignons (Mentlak *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2014). Toujours chez *C. fulvum* et *M. graminicola*, une autre stratégie consiste en la protection de l'intégrité pariétale du champignon de l'action des chitinases relarguées par l'hôte. Cette action est accomplie par Avr4 chez *C. fulvum* (Esse *et al.*, 2007), Mg3LysM et Mg1LysM chez *M. graminicola* (Marshall *et al.*, 2011). Enfin, une dernière stratégie consiste à modifier la structure de cette paroi afin d'échapper à la détection. Chez les champignons pathogènes, la conversion de la chitine en chitosane par des chitines déacétylases pourrait également limiter la génération des oligomères de chitine (El Gueddari *et al.*, 2002).

- Inhibition des protéases et molécules antimicrobiennes

Bien que déjà exprimées à un niveau basal, l'expression de protéase est induite de façon locale et systémique en réponse à un pathogène (Doehlemann & Hemetsberger, 2013). Ainsi, l'effecteur Pit2 du pathogène biotrophe *Ustilago maydis* a été identifié comme un inhibiteur des protéases à cystéine chez le maïs du fait de la présence d'un domaine conservé de 14

acides aminés servant de domaine inhibiteur de ces protéases. Une approche par mutant de délétion *pit2* a entraîné une diminution de la prolifération du champignon du fait d'une élévation de réponses de défense (Mueller *et al.*, 2013). Un autre effecteur apoplastique de cet organisme, Pep1 a été montré comme inhibant l'activité de la peroxydase POX12, limitant l'accumulation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les parois végétales (Doehlemann *et al.*, 2009; Hemetsberger *et al.*, 2012). Cet effecteur est par ailleurs montré comme étant remarquablement conservé chez d'autres champignons phytopathogènes (Hemetsberger *et al.*, 2015).

### Les effecteurs cytosoliques

Ils sont généralement exprimés dans les étapes plus tardives de la colonisation, lorsque les hyphes ont pénétré dans l'hôte. Produits et excrétés dans l'apoplaste, ces effecteurs vont être transloqués dans les cellules végétales afin de moduler la physiologie de la cellule ou permettre l'acquisition d'éléments nutritifs en ciblant différents compartiments cellulaires (Giraldo & Valent, 2013). On parle alors d'effecteurs cytosoliques. Des motifs de translocation cellulaire de type Crinkler (CRN) et RXLR ont été identifiés chez des effecteurs d'oomycètes (Morgan & Kamoun, 2007; Schornack *et al.*, 2010), les mécanismes homologues chez les effecteurs fongiques ne sont pas connus (Petre & Kamoun, 2014).

- Reprogrammation métabolique

Les hormones jouent un rôle prépondérant dans les réactions de défense. Par exemple, les dérivés d'acide salicylique (SA) et jasmonique (JA) ont été montrés comme particulièrement requis pour une lutte efficace contre respectivement les pathogènes biotrophes et nécrotrophes (Vlot *et al.*, 2009; Gimenez-Ibanez & Solano, 2013). Il a été montré que leurs voies de biosynthèse sont ciblées par des effecteurs fongiques. Citons Cmu1, une chorismate mutase, et VdIsC1, une isochorismatase, respectivement présentes chez *U. maydis* et *Verticillium dahlia*, montrées comme prévenant la formation de précurseurs de SA (Djamei *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014).

- Détournement trophique

Une fois la pénétration des hyphes au sein de l'hôte effectuée, des structures fongiques d'acquisition de nutriments peuvent se développer : selon les espèces, des haustoria ou des hyphes infectieux (IH). Ces structures participent également à délivrer des effecteurs aux cellules hôtes (Rafiqi *et al.*, 2012; Zhang & Xu, 2014). Des transporteurs fongiques ont été

montrés comme étant exprimés au niveau de la membrane plasmique à l'interface plante/champignon afin de concurrencer les transporteurs végétaux. Par exemple, Srt1 est un transporteur de saccharose spécifique à haute affinité impliqué dans la virulence d'*U. maydis*, et est exprimé exclusivement durant l'infection afin de détourner de l'hôte une source de carbone. De plus, cette acquisition se fait sans production intermédiaire de sucres simples qui peuvent déclencher des réactions de défense (Wahl *et al.*, 2010).

### **7.2.3-Le sécrétome des CMAs**

Le sécrétome des CMAs est bien moins caractérisé que celui des eucaryotes filamenteux pathogènes. La disponibilité récente de données transcriptomiques puis génomiques de la souche *R. irregularis* DAOM197198 (Tisserant *et al.*, 2012, 2013; Lin *et al.*, 2014) a permis leur investigation. Ces données ont pu être enrichies grâce à la détermination des répertoires de gènes chez un autre membre des Glomérales, *Rhizophagus clarus* (Sędziewska Toro & Brachmann, 2016) ainsi que sur deux autres espèces phylogénétiquement distantes, *Gigaspora rosea* (Tang *et al.*, 2016) et *Gigaspora margarita* (Salvioli *et al.*, 2015). Des analyses de prédiction de SPs *in silico* ont avancé que le sécrétome de *R. irregularis* représenterait entre 376 et 566 SPs (soit entre 1 et 1,9 % du protéome selon les outils utilisés) et 441 SPs pour *G. rosea* (Tang *et al.*, 2016) ce qui semble assez peu pour des champignons capables d'interagir avec 80% des espèces végétales (Tisserant *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014). En effet, cet effectif serait du même ordre de grandeur que celui d'autres champignons pathogènes biotrophes obligatoires, *Blumeria graminis* et *Melampsora larici-populina* qui interagissent respectivement avec un ou deux hôtes (Spanu *et al.*, 2010; Duplessis *et al.*, 2011). Se posent ainsi les questions de la représentativité de ce jeu de SPs chez *R. irregularis*, et de l'universalité de leur efficacité.

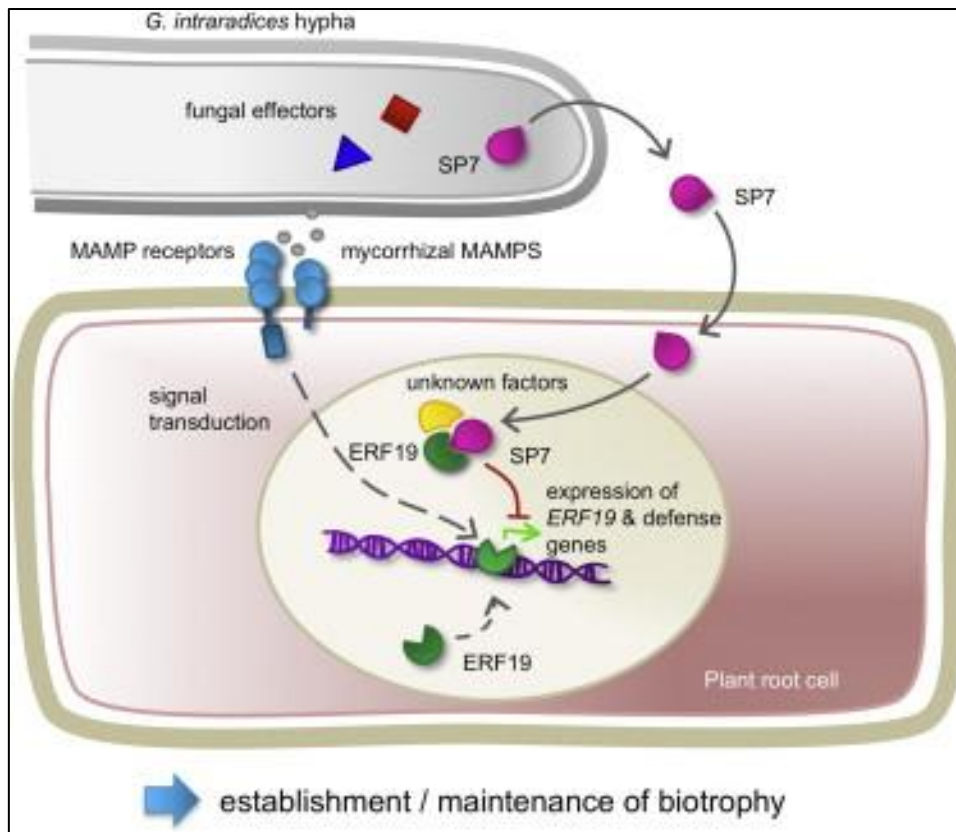
#### **7.2.3.1-Les protéines dégradant la paroi**

Tout comme d'autres biotrophes, les CMAs présentent une faible proportion d'enzymes de dégradation de la paroi, ce qui peut refléter leur incapacité à proliférer hors de la plante comme des saprotrophes (Lo Presti *et al.*, 2015; Pellegrin *et al.*, 2015). Ainsi, aucune des glycosidases identifiées chez *R. irregularis* ne seraient impliquées dans la dégradation

de polysaccharides pariétaux végétaux (Tisserant *et al.*, 2012, 2013) tout comme chez *B. graminis* (Spanu *et al.*, 2010). Aucune présence de ces enzymes n'est par ailleurs retrouvée chez *G. margarita* (Salvioli *et al.*, 2015), seulement deux seraient présentes chez *G. rosea* (Tang *et al.*, 2016) et une seule chez *R. clarus* (Sędziewska Toro & Brachmann, 2016). La perte de ces enzymes permettrait la limitation de la production de MAMPs et donc l'activation de défenses chez la plante hôte.

### **7.2.3.2-Les protéines effectrices**

Bien qu'étant des organismes mutualistes, les CMAs déclenchent les voies de défense de leurs hôtes, certainement par les nombreux MAMPs qu'ils arborent. Cependant, cette activation est relativement faible et n'est que transitoire (Spanu *et al.*, 1989; Garcia-Garrido & Ocampo, 2002; Liu, 2003; Liu *et al.*, 2007). Se basant sur l'hypothèse qu'à l'image de pathogènes, les CMAs pouvaient également posséder des protéines effectrices pour éteindre ces défenses, une étude conduite en 2011 par Klopffholz *et al.* a identifié SP7 chez *R. irregularis*. Cette SP est exprimée durant les étapes précoces d'infection, et est capable de transloquer seule dans la cellule et de cibler le noyau cellulaire de la plante où une interaction avec le facteur de transcription ERF19 de *M. truncatula*, impliqué dans la signalisation de l'éthylène a été établie. Cette interaction conduit à une diminution des processus de défense et favorise la mise en place de la biotrophie (Klopffholz *et al.*, 2011) (**Figure 12**).



**Figure 12 : Mode d'action de SP7 durant les étapes précoces d'infection.** D'après Klopfolz *et al.*, (2011).

Cette notion « d'effecteur symbiotique » n'est pas limitée qu'aux CMAs. Des protéines effectrices ont également été caractérisées chez les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote (Bartsev *et al.*, 2004; Okazaki *et al.*, 2010, 2013) et les champignons ectomycorhiziens à travers MiSSP7 (Plett *et al.*, 2011, 2014; Plett & Martin, 2012). La découverte de ces protéines chez les champignons mycorhiziens a ouvert une nouvelle voie d'étude, rendue possible grâce à l'apport des données génomiques.

Ainsi, depuis SP7, seul un autre effecteur putatif a été identifié. Il s'agit de SIS1, une SP putative de *R. irregularis* fortement exprimée suite à traitement par des strigolactones et en condition symbiotique, et dont la diminution de l'expression par HIGS limite l'invasion de plantes hôtes (Tsuzuki *et al.*, 2016). Cependant, la fonction exacte de cette SP reste à définir afin de valider une action effectrice.

Au-delà d'effecteurs pouvant cibler les réactions de défense, il n'est pas exclu que le sécrétome des CMAs contiennent des SPs impliquées dans le détournement trophique. En effet, comme mentionné précédemment, l'absence de gène de synthèse des acides gras (FAS)

pose la question de l'origine des acides gras. Hors, 36 lipases potentiellement sécrétées ont été identifiées chez *R. irregularis* et il est possible d'imaginer que ces SPs pourraient jouer un rôle de transfert des lipides de l'hôte vers le microorganisme durant l'association (Kamel *et al.*, 2016 - voir **Annexe 5**) (sujet de thèse de Loïc Cusant, 2016-2019).

## 8-Hypothèse de travail et plan de thèse

Les CMAs peuvent être décrits comme des partenaires symbiotiques universels. En effet, *R. irregularis* présente l'aptitude de coloniser toute plante mycorhizable (80% des 250 000 espèces végétales). Cette absence de spécificité d'hôte est unique dans les interactions plante-champignon. Le secret de cette « super compatibilité » avec des hôtes aussi variés ne résiderait-il pas parmi l'ensemble des protéines sécrétées qu'ils possèdent ? Existe-t-il une boîte à outil de SPs universelles, utilisées dans des plantes hôtes très différentes, et conservées chez différents CMAs ?

Outre l'analyse fondamentale et la production de connaissances, ce travail de thèse réalisé dans le cadre d'une convention CIFRE avec l'entreprise Agronutrition a pour contexte la caractérisation d'effecteurs de *R. irregularis* qui pourraient favoriser les interactions entre les CMAs et leurs hôtes pour une application future en champ. Pour cette raison, les données non publiées de ce manuscrit sont confidentielles.

Pour identifier de tels candidats, notre hypothèse de criblage est qu'ils devraient avoir leur expression fortement induite lors de la colonisation de différents hôtes, à l'image de ce qui est observé chez de nombreux pathogènes. Il s'agit d'un travail précurseur dans notre équipe de recherche, portant sur la caractérisation des SPs de *R. irregularis* à partir de leur séquence et de leur expression *in planta*, et le criblage de candidats à potentialité effectrice. Cette double tâche est décrite dans les deux chapitres qui constituent le cœur de ce manuscrit de thèse.

Dans le premier chapitre, sont décrites les données dont je disposais au début de ma thèse pour mener à bien ce projet : assemblages génomiques et données d'expression (RNAseq) du champignon à différents stades biologiques (asymbiotiques, pré-symbiotiques et *in planta*). L'analyse détaillée de ces données m'a permis de définir un jeu de protéines sécrétées



candidates, exprimées dans différentes plantes hôtes. Une partie des données obtenues a fait l'objet d'une publication (Kamel *et al.*, 2017, *Frontiers in Plant Sciences*), enrichie par des données non publiques. De ces analyses, une liste de gènes candidats présentant une surexpression forte *in planta* et une conservation pour la colonisation de différents hôtes a été générée. La définition des modèles de gènes a été validée à partir des dernières données génomiques en vue d'une étude fonctionnelle.

Le second chapitre porte sur la caractérisation fonctionnelle de candidats sélectionnés. Des approches d'expression hétérologues ont été développées afin de mettre en évidence le caractère sécrétoire de ces SPs, une action effectrice et/ou un impact sur la mise en place de la symbiose. Enfin, des premiers essais par apport exogène de peptides ont été effectués pour définir leur incidence sur la mycorhization.

# Chapitre I - Analyse du sécrétome de *Rhizophagus irregularis* DAOM197198

---

## 1-Avant-propos

*Ce premier chapitre porte sur la sélection de gènes fongiques codant pour des protéines sécrétées à travers la description du sécrétome du champignon *Rhizophagus irregularis* DAOM197198 et l'analyse comparative de leurs patrons d'expression dans plusieurs plantes hôtes. Les protéines sécrétées ont des fonctions multiples dans les différentes phases de développement du champignon (modification de la paroi, enzymes agissant sur le substrat, protéines impliquées dans l'établissement de la symbiose). Ce chapitre précise les données dont je disposais au début de ma thèse, ainsi que les analyses effectuées pour définir mon répertoire de gènes candidats. Ces travaux ont donné lieu à une publication qui sera commenté dans ce chapitre. Je présente enfin des gènes candidats inédits, justifiant la confidentialité de cette thèse dans le respect de la contractualisation avec l'entreprise Agronutrition, et qui ont fait l'objet d'analyses complémentaires décrites en fin de chapitre. .*

## 2-Contexte de l'étude

Préalablement à mon arrivée fin 2013, l'équipe de recherche « Symbiose Endomycorhizienne » du LRSV était impliquée dans les premiers travaux transcriptomiques de *Rhizophagus irregularis* DAOM197198 (Tisserant *et al.*, 2012) ainsi que dans l'obtention des premières données génomiques (Tisserant *et al.*, 2013). Ces études ont été réalisées par un consortium international coordonné par le Dr Francis Martin (UMR INRA-UHP Interactions Arbres Microorganismes, Nancy) dans le cadre du programme « 1000 génomes fongiques » (<http://genome.jgi.doe.gov/pages/fungi-1000-projects.jsf?phylumName=all>). En 2014, une étude concurrente réalisée sur la même souche de *R. irregularis* a été publiée (assemblage Rir, Lin *et al.*, 2014). Par ailleurs, l'équipe Symbiose Endomycorhizienne a généré de multiples

données RNAseq à différents stades de développement de *R. irregularis* qui ont permis par assemblage *de novo* d'obtenir un troisième jeu de contigs transcrits (**unigeneV3**). Cette triple approche m'a donné l'opportunité de confronter les modèles de gène de ces trois assemblages pour définir une liste de SPs candidates.

## 3-Données à disposition

### 3.1-Une souche modèle, deux assemblages génomiques : Gloin1 et Rir

Publiée en 2013, la première version du génome de *R. irregularis* est le fruit d'un long travail débuté en 2004 dans le cadre de l'analyse du mésocosme du peuplier (Martin *et al.*, 2004). Réalisé dans le cadre du JGI (Joint Genome Institute) par un consortium international d'équipes de recherche, ce projet s'est heurté à de multiples difficultés: production d'un matériel biologique homogène, taille du génome sous-estimée, un taux en G/C faible et une forte abondance en séquences répétées rendant l'assemblage périlleux (Martin *et al.*, 2008b). Ces problèmes ont en partie été résolus par l'utilisation de nouvelles techniques de séquençage (Next-Generation Sequencing - NGS) plus adaptées à ces organismes difficiles produisant une faible biomasse, ainsi qu'à de nouveaux outils bio-informatiques. C'est ainsi qu'en 2012, une première étape fut franchie par la publication du transcriptome de *R. irregularis* DAOM197198 (Tisserant *et al.*, 2012). Les techniques de séquençage 454 sur des banques d'ADNc ont ainsi permis de générer un set de 25906 transcrits virtuels non redondants (assemblage Mirav2). Un an plus tard fut publiée une première version de l'assemblage génomique, incluant 3,781 Gb de séquences génomiques obtenue par séquençage Sanger, 454 et Illumina. Cette version consiste en un total de 91,08 Mb assemblées (28371 scaffolds, N50= 5997 - Tisserant *et al.*, 2013) correspondant à environ deux tiers (60%) de la taille du génome 153 Mb prédits de cette étude, confirmé par des mesures directes de quantité d'ADN nucléaire en cytométrie de flux (154,8 ±6,2Mb, Sedzielewska *et al.*, 2011).

Bien qu'incomplet, il s'agit là d'un jeu de données robustes avec 30282 modèles de gène prédits (N50 = 15160 pb). Le fait que ces modèles de gènes soient également supportés par des données RNAseq de *R. irregularis* obtenues à différents stades de développement (spores,

spores germées, condition symbiotique, hyphes extra racinaires) appuie la représentativité des modèles générés.

Parallèlement à ce travail, une étude indépendante (Lin *et al.*, 2014) a généré une version génomique (notée **Rir**) de la même souche fongique, notée DAOM197198w car cultivée sur racines transformées de chicorée et non de carotte comme la souche utilisée par Tisserant et collaborateurs. La stratégie employée a consisté en l'isolement de 4 noyaux du champignon puis amplification aléatoire des génomes nucléaires (Whole Genome Amplification – WGA) avant séquençage Illumina sur chacun des amplicons nucléaires. Afin d'avoir un génome plus complet, un séquençage shotgun Illumina sur de l'ADN génomique provenant de mycélium fongique a également été entrepris. Les données générées ont ensuite été combinées dans le but d'avoir un génome de référence le plus complet possible. Il est à noter qu'aucune donnée transcriptomique ne vient appuyer les données génomiques Rir, contrairement à Gloin1. Cet assemblage de 141 Mb (il couvrirait ainsi 92% des 153 Mb de génome déduit), avec un N50 de 16014 pb, a permis la définition de 27392 modèles de gènes par des approches *ab initio* (sans séquences ARN pour validation des modèles prédits) (**Table 1**).

	<b>Assemblage Gloin1</b> (Tisserant <i>et al.</i> , 2013)	<b>Assemblage Rir</b> (Lin <i>et al.</i> , 2014)
taille de l'assemblage	101Mb/ 91.08Mb*	141Mb
N50	15 160pb	16 014pb
Données RNAseq utilisées pour définition des ORF	oui ( <i>R. irregularis</i> DAOM197198, C2 ; spores (germées ou non); hyphes extraracinaires; <i>in planta</i> ; <i>Rhizophagus diaphanus</i> )	non
Répertoire de gènes	28 232 (30282 avec épissage alternatif)	27 392
% de gènes prédits avec similarité Genbank nr	59%	51%
Dont supportés par données transcriptomiques (M. Malbreil, 2014)	26 460 (93.8%)	24 916 (90.9%)
% de couverture des « Core eukaryotic Genes »	98%	92.3%
% de gènes couverts à 100%	71%	65%
Nombre de protéines sécrétées prédites d'après les auteurs	376	299 / 566

**Table 1: Comparaison des assemblages Gloin1 et Rir.** \*91,08 Mb assemblé, étendu à 101 Mb en rajoutant des données PacBio.

L'analyse comparative des données Gloin1 et Rir par le logiciel GMAP montre que malgré des données génomiques moins étendues, l'assemblage Gloin1 présente des critères de définition des modèles de gènes légèrement supérieurs à Rir : meilleure représentativité du « core eukaryotic genes », meilleure couverture par les données RNAseq, meilleur taux de gènes couverts à 100% par les lectures RNAseq. La comparaison directe des deux assemblages par GMAP abouti à 13400 séquences quasi identiques, le reste étant constitué de séquences partiellement similaires, et d'ORF spécifiques présentes dans chacun de ces deux répertoires. Ce comparatif montre tout l'intérêt d'intégrer les séquences définies de chaque assemblage dans un répertoire enrichi et non redondant pour définir une liste plus exhaustive de gènes du sécrétome.

## 3.2-Des données d'expression fongique

Depuis plusieurs années l'équipe Symbiose Endomycorhizienne réalise un effort tout particulier dans l'obtention de données d'expression (RNAseq) dans différentes situations de développement de *R. irregularis* : cinétique de germination autonome des spores à 4 temps de prélèvement (1h puis 2, 7 et 14 jours) en présence ou non d'un analogue de strigolactone (le GR24) ou d'exsudats racinaires ; champignon en condition symbiotique *in planta* dans 3 espèces de plantes hôtes à travers la phylogénie de la lignée verte (une hépatique : *Lunularia cruciata* ; une graminée : *Brachypodium distachyon* ; une légumineuse : *Medicago truncatula*) ; champignon en condition symbiotique mais *ex planta* par obtention des hyphes extraracinaires (ou ERM) provenant de racines de carottes cultivées *in vitro* (Malbreil, 2014). Pour *G. rosea*, les banques étaient les suivantes : spores en germination autonome (à 2 jours, temps unique) traitées ou non par du GR24 ; champignon en condition symbiotique *in planta* avec 2 plantes hôtes – *B. distachyon* ou *M. truncatula* – ou *ex planta* (ERM) provenant de racines de carottes cultivées *in vitro* (Tang *et al.*, 2016).

Le positionnement (ou « mapping ») des lectures RNAseq (ou « reads ») des banques sur les séquences de référence permet de déterminer le niveau d'expression pour un gène dans une condition donnée par simple comptage du nombre de lectures qui s'y positionnent. La normalisation du nombre de lectures par la longueur du gène d'intérêt ainsi que la somme totale des lectures obtenues pour un échantillon vont définir une expression en RPKM, qui est le nombre de lectures par kilobase et par millions de lectures alignées (Mortazavi *et al.*, 2008). Ainsi, il est possible de comparer le niveau d'expression d'un gène entre deux conditions biologiques distinctes en calculant le facteur d'expression (ou fold change - FC) par simple ratio de RPKM obtenu dans les deux conditions.

## 4-Présentation des travaux

### 4.1-Constataion et hypothèses de travail

La publication des données génomiques a permis de mettre en exergue le fait que les CMAs possèdent un arsenal restreint de gènes codant pour des protéines sécrétées (secreted proteins - SP). Chez *R. irregularis* les données Gln1 identifient 376 SPs (soit 1,2% du

protéome prédit de 30282 protéines) dont 153 sont des protéines de petites tailles (< 150 aa) (Tisserant *et al.*, 2013). Selon Sędziewska Toro & Brachmann (2016) qui ont produit de nouvelles analyses sur la base des mêmes données initiales, le sécrétome serait de 727 protéines. Pour les données Rir, cet effectif varie de 299 SPs (1% du protéome prédit) avec des critères stricts, à 566 SPs (1,9% du protéome prédit) avec des critères relaxés (Lin *et al.*, 2014). Le sécrétome global de *R. irregularis* représenterait donc de manière générale 1 à 2,5% du protéome global selon les différentes approches d'analyse. Des données générées sur une autre espèce de gloméromycètes tend à appuyer ce constat : d'après Tang *et al.*, (2016) ce nombre ne serait pas bien plus important chez *G. rosea* où sont dénombrées 441 SPs.

Partant de ces observations, il était intéressant de réaliser des analyses comparatives des sécrétomes de différents membres des Gloméromycètes. Une analyse récemment publiée (Sędziewska Toro & Brachmann, 2016) a ainsi comparé l'effectome de deux espèces proches du genre *Rhizophagus* (*R. irregularis* DAOM197198 et *R. clarus* MUCL46238). La part de l'effectome de *R. irregularis* représenterait 23% du sécrétome prédit (220 SPs sur les 727 au total). Sur ces 220 SPs, près de 95% seraient conservées chez *R. clarus*. Cette conservation, au-delà de montrer qu'une large part des effecteurs ne serait pas spécifique de l'espèce, irait dans le sens d'une conservation du rôle de ces protéines durant les processus d'infection et de colonisation.

Un autre crible consiste à définir les patrons d'expression des protéines sécrétées. Des études sur les interactions plantes-pathogènes ont montré que la plupart des gènes codant pour des protéines effectrices favorisant l'interaction ont leur expression induite *in planta* (Doehlemann *et al.*, 2009; Kleemann *et al.*, 2012; Guyon *et al.*, 2014). Ainsi, les données d'expression dont nous disposons vont ainsi être un crible essentiel pour la caractérisation de telles protéines.

Cette double analyse, définition du sécrétome et profil d'expression, nous a permis d'aborder les questions suivantes : **Quel est le degré de conservation des SPs entre espèces distantes de CMA ? Les SPs sont-elles toutes exprimées lors de l'établissement symbiotique ? Les patrons d'expression géniques diffèrent-ils selon l'hôte ?**

Pour y répondre, nous avons comparé les profils d'expression des secrétomes de deux Gloméromycètes phylogénétiquement distants, *R. irregularis* DAOM197198 et *G. rosea* DAOM194757, à différents stades d'interaction et avec différents hôtes.

## 4.2-Résumé de l'article

La première partie du travail a consisté en l'obtention d'un set de gènes de *R. irregularis* DAOM197198 non redondant et le plus exhaustif possible à partir des deux assemblages génomiques publics disponibles (Tisserant *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014). Il fut ainsi obtenu une liste de 35893 modèles de gènes, ayant servi à la prédiction de 872 protéines sécrétées (RiSPs) après passage dans un pipeline bioinformatique (représentant 2,9% du protéome prédit) et annotées par la suite.

Des données d'expression RNAseq de *R. irregularis* seul (spores en germination), en phase présymbiotique (spores stimulées par des exsudats racinaires ou par un analogue des strigolactones – GR24), en condition symbiotique dans différents hôtes (*Lunularia cruciata*, *Brachypodium distachyon*, *Medicago truncatula*) ou à l'extérieur de l'hôte (Hyphes extraracinaires – ERM – à partir de racines de carottes en culture mycorhizées) sont venues enrichir ces données donnant une vue instantanée de l'expression de ces différentes protéines à des étapes clés de l'interaction.

Les observations principales montrent que *R. irregularis* posséderait une batterie de SPs dont une part importante serait surexprimée et conservée quel que soit l'hôte. Un nombre de SP plus restreint serait dévoué à une spécificité d'hôte, parmi lequel un certain nombre d'effecteurs putatifs, qui ainsi pourraient favoriser une meilleure adaptation selon le partenaire végétal.

Le secrétome de *G. rosea* a également été déterminé de la même manière à partir de l'assemblage transcriptomique de *G. rosea* (Tang *et al.*, 2016) pour comparaison à celui de *R. irregularis*, utilisé comme référence. 2633 protéines sécrétées de *G. rosea* (GrSPs) ont été dénombrées (représentant 2,7% du répertoire de protéome prédit). Il s'est avéré que 22% des RiSPs étaient partagées avec *G. rosea*, indiquant que les SPs serait principalement composées de protéines spécifiques à chaque lignée. De plus, *G. rosea* possède une part plus importante



que chez *R. irregularis* de SPs spécifiquement surexprimées selon l'hôte, ce qui pourrait témoigner d'une certaine préférence d'hôte pour les membres de cette famille.

La recherche chez ces deux symbiontes de SPs exprimées à différentes étapes de la symbiose a permis de mettre en évidence l'existence d'un «sécrétome conservé» qui bien que limité, pourrait être important si l'on pense que ces SPs pourraient cibler des voies de signalisation conservées chez les plantes mycotrophes qui seraient indispensables à la mise en place symbiotique.

## 5-Article

### **The comparison of expressed candidate secreted proteins from two arbuscular mycorrhizal fungi unravels common and specific molecular tools to invade different host plants**

*Kamel L.<sup>1,2</sup>, Tang N.<sup>1,3</sup>, Malbreil M.<sup>1</sup>, San Clemente H.<sup>1</sup>, Le Marquer M.<sup>1</sup>, Roux C.<sup>1\*</sup>, Frei dit Frey N.<sup>1\*</sup>*

*\* Corresponding authors*

1: Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, Université de Toulouse, UPS, CNRS 24 chemin de Borde Rouge-Auzeville, BP 42617, 31326 Castanet-Tolosan, France

2: Agronutrition, Laboratoire de biotechnologies, 436 rue Pierre et Marie CURIE-31670 LABEGE- France

3: present address: Key Laboratory for Plant Diversity and Biogeography of East Asia, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Heilongtan, Kunming 650201, China



# The Comparison of Expressed Candidate Secreted Proteins from Two Arbuscular Mycorrhizal Fungi Unravels Common and Specific Molecular Tools to Invade Different Host Plants

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Andrea Genre,  
University of Turin, Italy

### Reviewed by:

Sebastian Schornack,  
Sainsbury Laboratory, UK  
Stefano Ghignone,  
National Research Council of Italy, Italy

### \*Correspondence:

Christophe Roux  
roux@lrsv.ups-tlse.fr  
Nicolas Frei dit Frey  
frei-dit-frey@lrsv.ups-tlse.fr

### † Present Address:

Nianwu Tang,  
Key Laboratory for Plant Diversity and  
Biogeography of East Asia, Kunming  
Institute of Botany, Chinese Academy  
of Sciences, Heilongtan, Kunming,  
China

### Specialty section:

This article was submitted to  
Plant Microbe Interactions,  
a section of the journal  
Frontiers in Plant Science

**Received:** 27 September 2016

**Accepted:** 20 January 2017

**Published:** 07 February 2017

### Citation:

Kamel L, Tang N, Malbreil M, San  
Clemente H, Le Marquer M, Roux C  
and Frei dit Frey N (2017) The  
Comparison of Expressed Candidate  
Secreted Proteins from Two  
Arbuscular Mycorrhizal Fungi Unravels  
Common and Specific Molecular  
Tools to Invade Different Host Plants.  
Front. Plant Sci. 8:124.  
doi: 10.3389/fpls.2017.00124

Laurent Kamel<sup>1,2</sup>, Nianwu Tang<sup>1†</sup>, Mathilde Malbreil<sup>1</sup>, Hélène San Clemente<sup>1</sup>,  
Morgane Le Marquer<sup>1</sup>, Christophe Roux<sup>1\*</sup> and Nicolas Frei dit Frey<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, Université Paul Sabatier - Université de Toulouse, Centre National de la  
Recherche Scientifique, Castanet-Tolosan, France, <sup>2</sup> Agronutrition, Laboratoire de Biotechnologies, Labege, France

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), belonging to the fungal phylum Glomeromycota, form mutualistic symbioses with roots of almost 80% of land plants. The release of genomic data from the ubiquitous AMF *Rhizophagus irregularis* revealed that this species possesses a large set of putative secreted proteins (RiSPs) that could be of major importance for establishing the symbiosis. In the present study, we aimed to identify SPs involved in the establishment of AM symbiosis based on comparative gene expression analyses. We first curated the secretome of the *R. irregularis* DAOM 197198 strain based on two available genomic assemblies. Then we analyzed the expression patterns of the putative RiSPs obtained from the fungus in symbiotic association with three phylogenetically distant host plants—a monocot, a dicot and a liverwort—in comparison with non-symbiotic stages. We found that 33 out of 84 RiSPs induced *in planta* were commonly up-regulated in these three hosts. Most of these common RiSPs are small proteins of unknown function that may represent putative host non-specific effector proteins. We further investigated the expressed secretome of *Gigaspora rosea*, an AM fungal species phylogenetically distant from *R. irregularis*. *G. rosea* also presents original symbiotic features, a narrower host spectrum and a restrictive geographic distribution compared to *R. irregularis*. Interestingly, when analyzing up-regulated *G. rosea* SPs (GrSPs) in different hosts, a higher ratio of host-specific GrSPs was found compared to RiSPs. Such difference of expression patterns may mirror the restrained host spectrum of *G. rosea* compared to *R. irregularis*. Finally, we identified a set of conserved SPs, commonly up-regulated by both fungi in all hosts tested, that could correspond to common keys of AMF to colonize host plants. Our data thus highlight the specificities of two distant AM fungi and help in understanding their conserved and specific strategies to invade different hosts.

**Keywords:** Glomeromycota, secretome, comparative transcriptomics, effectors, symbiosis

## INTRODUCTION

Arbuscular Mycorrhizal fungi (AMF) are soil fungi belonging to the Glomeromycota, a basal phylogenetic lineage of fungi (Schüßler et al., 2001). All species of this clade are obligate mutualistic symbionts, mainly associated with plant roots (Smith and Read, 2010). AMF have aseptated hyphae and form spores accumulating hundreds to thousands of nuclei without any characterized mononuclear stage (Bécard and Pfeffer, 1993). As obligate biotrophs, AMF cannot be cultivated axenically and can only be propagated with plant roots in pot culture or *in vitro* on root organ culture (Bécard and Fortin, 1988). Due to these biological features and the absence of transformation protocol, their genetic structure is poorly documented. Transcriptomic and genomic approaches are useful tools to investigate their intimate biology (Tisserant et al., 2012, 2013; Lin et al., 2014). Interaction of AMF and host roots is triggered by signals that are exchanged prior to contact. AMF perceive plant exuded compounds, including the phytohormone strigolactones (Akiyama et al., 2005; Besserer et al., 2006), that modulate their metabolism and stimulate hyphal branching (Besserer et al., 2006, 2008), leading to higher probability of physical contact between the fungus and the plant root. After penetration, the fungus grows intra- and intercellularly and develops in host cells highly branched cell structures called arbuscules where nutrient exchanges occur between the two partners. Once the symbiosis is established, AMF produce a profuse mycelium outside of the root (ExtraRadical Mycelium or ERM). The ERM has a great implication in symbiotic physiology as it is involved in soil water and mineral foraging (Marschner and Dell, 1994; Wright et al., 1998). It is also crucial for fungal propagation through sporogenesis and colonization of new host roots.

Many questions remain unresolved about the molecular mechanisms governing AMF–plant interaction. A major issue concerns the broad host spectrum of these fungi: It was estimated that up to 80% of land plant species and 90% of Spermatophyta associate with AM fungi (Wang and Qiu, 2006; Smith and Read, 2010). As shown by inoculation assays in controlled condition or barcoding approaches in environmental samples (Öpik et al., 2010), each fungal species can be hosted by a large diversity of plant species. Usually, colonization of a host plant by pathogenic fungi encompasses intense cell signaling events that precede the activation of plant immunity. Surface or intracellular fungal molecules (Microbe Associated Molecular Patterns—MAMPs) or molecules released following host-degradation (Damaged Associated Molecular Patterns—DAMPs) are recognized by host cell receptors, thus triggering reactive oxygen species production, cell wall reinforcement, and secretion of antimicrobial compounds (Boller and Felix, 2009; Wu and Zhou, 2013). Hormone production (mainly salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene) is also stimulated and promotes subsequent defense signaling, locally, or systemically (Bari and Jones, 2009). In order to overcome the plant defense, microbes limit their production of M(D)AMPs and secrete proteins, called effectors, that interfere with plant immunity. This strategy has been reported for many prokaryotic and eukaryotic microbial pathogens (Galán et al., 2014; Rovenich

et al., 2014) and strong evidences support similar mechanisms in mutualistic interactions (Kloppholz et al., 2011; Plett et al., 2011; Okazaki et al., 2013; Yasuda et al., 2016). During AMF-plant interactions, non-self recognition should induce plant defenses thus limiting root colonization. Previous results argue that AMF have developed mechanisms to remain largely undetected by the plant defense, allowing their stealth growth in the roots. For example the low number of genes encoding Glycosyl hydrolases found in the genome of *Rhizophagus irregularis* could result in a low production of DAMPs (Tisserant et al., 2013; Lin et al., 2014).

The uniqueness of AMF to interact with a large range of host plants explains the interest on their effector catalog over the last few years. A first work provided evidence that *R. irregularis* secretes a small protein (SP7) that is translocated to the plant nucleus and facilitates the establishment of the interaction by repressing the activity of ERF19, a transcription factor mediating plant defenses (Kloppholz et al., 2011). More recently, transcriptomic approaches identified a second putative secreted protein, SIS1, whose expression is up-regulated during pre- and symbiotic stages. SIS1 was required for host colonization as well as arbuscular formation using silencing approaches (Tsuzuki et al., 2016). The release of genomic data from *R. irregularis* revealed the presence of hundreds of putative secreted proteins (SPs—Tisserant et al., 2013; Lin et al., 2014). In a kingdom-wide comparison of fungal secreted proteins, it was shown that *R. irregularis*, as other fungal mutualists, encodes more small secreted proteins than saprotrophs and necrotrophs (Kim et al., 2016) and a very low number of CAZymes (Tisserant et al., 2012, 2013; Kim et al., 2016). Recently, additional gene repertoires have been published, broadening the field of investigation: From *R. clarus* (Sędziewska Toro and Brachmann, 2016), a species closely related to *R. irregularis*, and from *Gigaspora margarita* (Salvioli et al., 2015) and *G. rosea* (Tang et al., 2016). *Gigaspora* spp. belong to the order Diversisporales, phylogenetically distant from Glomerales that includes *R. irregularis* (Schüßler et al., 2001). Diversisporales and Glomerales present distinct morphological, ecological and biological features. *G. rosea* forms larger hyphae than those of *R. irregularis* and develops arbuscules that have a different morphology (Parniske, 2008). *R. irregularis* is an ubiquitous AMF observed in a wide range of hosts (Öpik et al., 2006; Börstler et al., 2008), while *G. rosea* was not reported so far in all continents (Jansa et al., 2002; Öpik et al., 2010) and several reports suggest that its host spectrum is narrower than *R. irregularis* (Russell and Bulman, 2005; Sýkorová et al., 2007). The non-homogeneous mycorrhizal responses induced on diverse plants by Glomerales and Diversisporales suggest host selectivities by these fungi (Hong et al., 2012; de Novais et al., 2014; Mensah et al., 2015). As an illustration, it was observed significant differences regarding host phosphate uptake, growth, and/or reproduction of flax, tomato, and barrel medic when associated with *G. rosea* compared to *R. irregularis* (Smith et al., 2003). Comparison of expressed secretomes from these two AMF is hence a way to define the convergent/divergent strategies for the establishment of the symbiotic interface. SPs can indeed be involved in mechanisms as various as fungal cell wall remodeling (Ene et al., 2015), substrate degradation (Bouws et al., 2008),

nutrient recruitment from the host interfaces (Fernandez et al., 2014), and repression of host immunity (Krijger et al., 2014).

Our project aimed first at investigating whether the same set of SPs is consistently expressed by an AMF when colonizing different hosts. It also aimed at evaluating to which extent SPs, either involved in fungal cell processes (nutrition, cell wall formation, and modification) or in modulating plant immune responses (effectors) are conserved among AMF. We first generated a comprehensive list of putative SPs by applying a bioinformatic pipeline on the two independently generated genome assemblies of the same strain (Tisserant et al., 2013; Lin et al., 2014). Then, we investigated the expression profiles of *R. irregularis* SPs (RiSPs) obtained in association with three distant plant hosts. Finally we compared RiSP sequences and expression patterns to those of SPs from *G. rosea* (GrSPs). Our findings showed that specific classes of SPs were expressed at different fungal developmental stages explored in this study. Comparative SP expression patterns in different hosts highlighted that *R. irregularis* displayed a lesser ratio of host-specific secreted proteins compared to *G. rosea*. Finally, *R. irregularis* and *G. rosea* were found to share a small but nevertheless interesting set of SPs that are good candidate effectors targeting host conserved mechanisms.

## MATERIALS AND METHODS

### Production of Fungal Materials

*R. irregularis* DAOM 197198 and *Gigaspora rosea* DAOM 194757 spores and extraradical mycelium (ERM) produced on carrot root organ cultures (St-Arnaud et al., 1996) were purchased from Agronutrition (Labège, France). Spores were germinated and grown in liquid M medium (Bécard and Fortin, 1988), in the dark at 30°C with 2% CO<sub>2</sub>. All biological samples were produced in triplicates for sequencing. *R. irregularis* and *G. rosea* were treated during 48 h with control solution or GR24 (10<sup>-6</sup> M final) respectively 2 and 5 days post germination. For the production of mycelium exposed to root exudates, spores were deposited on a cellophane membrane placed on *in vitro* carrot root organ culture, or on a cellophane membrane placed on solid M medium for Mock condition, for 14 days (*R. irregularis*) or 10 days (*G. rosea*) at 30°C and 2% CO<sub>2</sub>. Concerning the production of Intra Radical Mycelium (IRM), *Medicago truncatula* Gaertn “Jemalong” genotype A17 and *Brachypodium distachyon* genotype Bd21 were cultivated in association with *R. irregularis* DAOM 197198 during 5 weeks. For *Gigaspora rosea* DAOM 194757, a nursery system was used to increase mycorrhizal rates in the same time frame of assay. *M. truncatula* and *B. distachyon* plantlets were co-cultivated on Oil-Dri US special substrate (Damolin) in pot containing a leek plant cultivated since 3 months with *G. rosea* (growing conditions: 25°C, 16 h of day and 22°C, 8 h of night). After 3 weeks, plants were removed from the nursery system and individualized in single pots for 2 additional weeks of culture. Mycorrhizal rates were assessed using the grid intersection line system (Giovannetti and Mosse, 1980) and roots were sampled when mycorrhization reached a sufficient colonization rate. The plants produced as triplicate for experiments were mycorrhized at 59, 61, and 58%

for *M. truncatula* and 39, 48, and 39% for *B. distachyon* by *R. irregularis*, respectively. The colonization rate of all triplicate plants mycorrhized by *G. rosea* reached over 80% (detailed informations at NCBI GEO portal GSE67911). Plants were grown with 16 h light (25°C)/8 h (22°C) cycles and fertilized twice a week with 0.5x Long Ashton solution.

*Lunularia cruciata* were collected in the Pyrenees Mountains (France). Gemmae were sterilized (Fonseca et al., 2006) and grown on KNOP medium (Reski and Abel, 1985) at 22°C with a 16 h photoperiod. *L. cruciata* was mycorrhized according to Fonseca et al. (2006). As the intergrid method used to assess mycorrhizal rate in roots was not appropriate, we checked by staining that the fungus highly colonized the central part of the thalli.

### RNA Production and Sequencing

Total RNA extraction and sequencing were performed according to Tisserant et al. (2013) for *R. irregularis* and Tang et al. (2016) for *G. rosea*. Apart from ERM of *G. rosea* where short paired-end sequencing reads were obtained from Illumina Miseq1000 protocols (2 × 151 bp), all libraries were obtained from Illumina Hiseq2000 protocols (2 × 101 bp). Library constructions and sequencing were performed on the GeT-PlaGe facility (Toulouse, France), according to standard Illumina protocols. Data are available at NCBI GEO portal (GSE67906 and GSE67911) for *G. rosea*, and at NCBI Sequence Read Archive (SRR1027885—see details on libraries in Table S1A) for *R. irregularis*. Number of reads per libraries, representativeness of fungal reads in symbiotic tissues and variability of data are presented in Tables S1A, S5A for *R. irregularis* and *G. rosea* respectively.

### Bioinformatic Analysis

GMAP analysis (Wu and Watanabe, 2005) was performed with the standard parameters between the two genomic assemblies of *R. irregularis* (Tisserant et al., 2013; Lin et al., 2014). When different gene definitions were present for the same locus, only ORFs supported by RNAseq data were selected and protein lacking a start or a stop codon were discarded. Because of a lack of complete coverage by RNAseq reads, SP7 (Kloppholz et al., 2011) was at first absent from the analysis. We therefore used the second assembly (Lin et al., 2014) that contains a SP7 gene definition (Rir018650) to recover this protein in the RiSPs set. In order to be easily identified in the study, this gene is not designated by a RiSP number but keeps its original name. SIS1, a previously characterized putative secreted protein that was described to be essential for mycorrhizae establishment (Tsuzuki et al., 2016) is absent from our set of 872 RiSPs. Indeed, in our pipeline, a transmembrane domain was identified in the protein sequence. RiSPs and GrSPs were identified using the following pipeline with standard software parameters. SignalP3.0 (Bendtsen Dyrlov et al., 2004) allowed the identification of a signal peptide, TMHMM (Krogh et al., 2001), and Phobius (Käll et al., 2004) excluded proteins presenting a transmembrane domain. TargetP (Emanuelsson et al., 2007) was used to remove proteins with a mitochondrion targeting signal. We selected mature proteins as small as 15 amino acids after the cleavage of the peptide signal and discarded protein sequences with duplicates. No upper

size limit was applied. This screen resulted in a list of 872 proteins for *R. irregularis* and 2633 for *G. rosea* (Tables S1C, S5C, respectively). In these repertoires, we searched for conserved domains by PFAM analysis (Finn et al., 2014), repeated motifs by T-reks analysis (Jorda and Kajava, 2009), Nuclear Localization by NLStradamus analysis (Nguyen Ba et al., 2009) and we scored disulfide-bond forming proteins among small cysteine-rich proteins (SCR) with Disulfind (Ceroni et al., 2006). Finally, Blastclust (Alva et al., 2016) was used to identify paralog groups of proteins. The MEME discovery tool (Bailey et al., 2009) was used to screen GrSPs and RiSPs displaying no PFAM domain in order to identify previously unknown motifs, present as internal repeats or displayed by several proteins. A first screen searching for short motifs (3 to 6 amino acids) was performed and identified a subgroup of SPs containing short internal repeats. These proteins were then excluded from the second screen focusing on SPs displaying longer motifs (7 to 100 amino acids). Only motifs present at least three times and with an e-value  $< 10^{-3}$  were conserved. Motifs spanning almost entirely the sequence of tribe members were not conserved, since sequence similarity introduces a strong bias in motif identification. GPI anchor domains containing proteins are not considered as true secreted proteins and are thus not discussed in the present study. SCR proteins were described as proteins with less than 200 amino acids, containing at least two cysteines and with a 3% minimum Cysteine content. MAFFT (Kato et al., 2002) was used to align SP7 with its relative SPs. For comparison, the 726 RiSPs predicted from Gloi1 gene models were compared to the previously identified *R. irregularis* SPs of the fungal secretome database (classes: SP, SP<sup>3</sup>, and SL—Choi et al., 2010). To identify putative RiSPs and GrSPs orthologs in other fungi, BLAST-P analyses were performed against the RefSeq with a e-value  $< 10^{-5}$  with exclusion of glomeromycota proteins (Altschul et al., 1990). The 220 *R. irregularis* and 64 *R. clarus* candidate effectors described in Sędziewska Toro and Brachmann (2016) were compared to RiSPs through BLAST-P analysis; a e-value  $< 10^{-5}$  was selected to define putative orthologous proteins. *G. margarita* genes were analyzed through our pipeline to identify SPs with a similar approach and compared through BLAST-P analysis to GrSPs; a e-value  $< 10^{-5}$  was selected to define putative orthologous proteins. The same analysis was performed with *P. indica* (Zuccaro et al., 2011), *T. melanosporum* (Martin et al., 2010), and *L. bicolor* genes (Martin et al., 2008) for comparison with RiSPs. Search for isoforms in GrSPs was performed by reciprocal BLASTN (GrSPs against themselves with the following criteria: Identity  $> 97\%$ , query coverage  $> 50\%$ , query hit  $> 10\%$ ) followed by sequence alignments using SeaView version 4 program for validation (Gouy et al., 2010).

## Gene Expression and Differential Expression Analysis

Raw sequence paired reads were trimmed using CLC Genomics workbench 8.0 suite (CLC Bio workbench, Qiagen, Aarhus, Denmark) based on Phred quality scores  $> 20$  by removal of adapter Illumina primer, trimming end sequences of reads to limit the number of ambiguous nucleotides at 2, and discarding

of reads shorter than 50 bp. Homogeneity of triplicates was defined by carrying out principal component analyses of samples according to CLC Genomic Workbench procedure and confirms the grouping of samples (Tables S1A, S5A for *R. irregularis* and *G. rosea* respectively). For each replicates, the correlation matrix (“normalized” version of the covariance matrix) was calculated to define the orthogonal eigenvectors of the first and second major principal components, showing a simplified version of the variability of data. For expression analyses, trimmed paired-end reads were mapped onto the transcripts of 872 and 2633 SP genes of *R. irregularis* and *G. rosea*, respectively, using CLC Genomics workbench with stringent settings (similarity and length read mapping criteria at 98 and 95% respectively, maximum number of hits for a read on different genes limited to 10). We used the settings “one reference sequence per transcript” and “Maximum number of hits for a read = 10” to define unique and total reads mapping on each transcript, allowing the differentiation of expression patterns of close sequences. The mapped reads for each transcript were calculated and normalized as RPKM for calculating gene expression (reads per kilobase of transcripts per million reads mapped—Mortazavi et al., 2008). Intact and broken pairs were both counted as one. The RPKMs of each transcript in different conditions were compared using proportion-based test statistics (Baggerly et al., 2003) implemented in CLC genomic Workbench suite. This beta-binomial test compares the proportions of counts in a group of samples against those of another group of samples. Different weights are given to the samples, depending on their sizes (total counts). The weights are obtained by assuming a Beta distribution on the proportions in a group, and estimating these, along with the proportion of a binomial distribution, by the method of moments. The result is a weighted *t*-type test statistic. We then calculated False Discovery Rate (FDR) correction for multiple-hypothesis test (Benjamini and Hochberg, 1995). Only genes showing a difference of 10 reads between compared conditions were considered as significantly expressed. Genes were considered as differentially expressed when meeting the requirements of fold change  $\geq |2|$  and  $FDR \leq 0.05$ . Extreme fold-change values (+/- 1,79769313486232E+308) are depicted as “+/-999999” in Tables S1, S5. RNAseq raw expressed data and calculated fold changes are depicted in Tables S1B, S5B for *R. irregularis* and *G. rosea* respectively.

## RESULTS

### Definition of a Consensus Set of SPs of *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198

Two independent genomic assemblies of the same strain of *R. irregularis* (DAOM 197198) were previously published (Tisserant et al., 2013; Lin et al., 2014). Due to incomplete assembly, the deduced catalogs of putative SPs from these two sets of data were partial and very few SPs were found totally identical by direct blast (Table S1C, see column B). In order to get a more robust global dataset, we performed a bidirectional Genomic mapping and alignment program (GMAP) analysis (Wu and Watanabe, 2005) of the two gene repertoires. GMAP allowed the

identification of common genes (perfect match), genes unique to each dataset, and genes partly similar, i.e., truncated or differently defined in each gene repertoire. For the last two situations, ORFs covered by reads from RNAseq data were given preference (<http://genome.jgi.doe.gov/Gloin1/Gloin1.home.html>). Based on this approach, we obtained 35893 predicted genes. Using a specific pipeline to identify putative secreted proteins (**Figure 1**), we then defined a list of 872 secreted protein encoding genes (RiSPs) (**Table S1C**). This repertoire is larger than previously published ones from different assemblies and pipelines (376 SPs in Tisserant et al., 2013; 566 SPs in Lin et al., 2014; 475 SPs in Kim et al., 2016). This was expected because our input uses two different assemblies while only one was processed in the previous works. In the case of Kim et al. (2016), they also removed proteins containing nuclear localization signals. As noticed by Sędziewska Toro and Brachmann (2016), there is a very high similarity with *R. clarus* available secreted proteins (**Table S1C**). We compared the SPs that we identified from the Gloin1 gene models (726 Gloin1-originating RiSPs) to already characterized *R. irregularis* Gloin1-SP identified in the Fungal Secretome Database (FSD; Choi et al., 2010; Kim et al., 2016). These proteins were classified in various categories according to their signal peptide predictions (SP, SP<sup>3</sup>, SL, **Table S1C**). Due to differences in pipeline definition (e.g.: SPs containing a NLS are discarded in the FSD), 216 out of 726 of our Gloin1-originating RiSPs are absent in the FSD.

Within the 872 RiSPs, different sequence features were identified: Presence of PFAM domains, nuclear localization sequences (NLS), cysteine rich regions (SCRs), organization as repeat contain proteins (RCPs), and distribution in protein families (tribes). As mentioned in **Table S1C** (“Tribe” column), 772 RiSPs were unique proteins, 54 were present in tribes of two members (D1–27) and 46 are grouped in 13 tribes of at least three members. Among the 872 RiSPs, 184 proteins displayed a PFAM domain. As observed in previous studies (Tisserant et al., 2012, 2013; Kim et al., 2016), *R. irregularis* displays a very limited number of CAZymes (25 RiSPs). Several PFAM domains were found enriched when compared to the whole gene repertoire (**Table S2**), including several proteases such as subtilases, aspartic proteases, M28 peptidases. Proteins involved in cell wall modification (polysaccharide deacetylase) or interaction with lipids (ML domain) were also found enriched. A survey of RiSPs present in other beneficial fungi revealed a low number of conserved SPs (**Table S1**). 92 RiSPs were conserved in *P. indica*, *T. melanosporum* or *L. bicolor*. Forty-two were present in all three fungi within which 40 display a PFAM domain (see below).

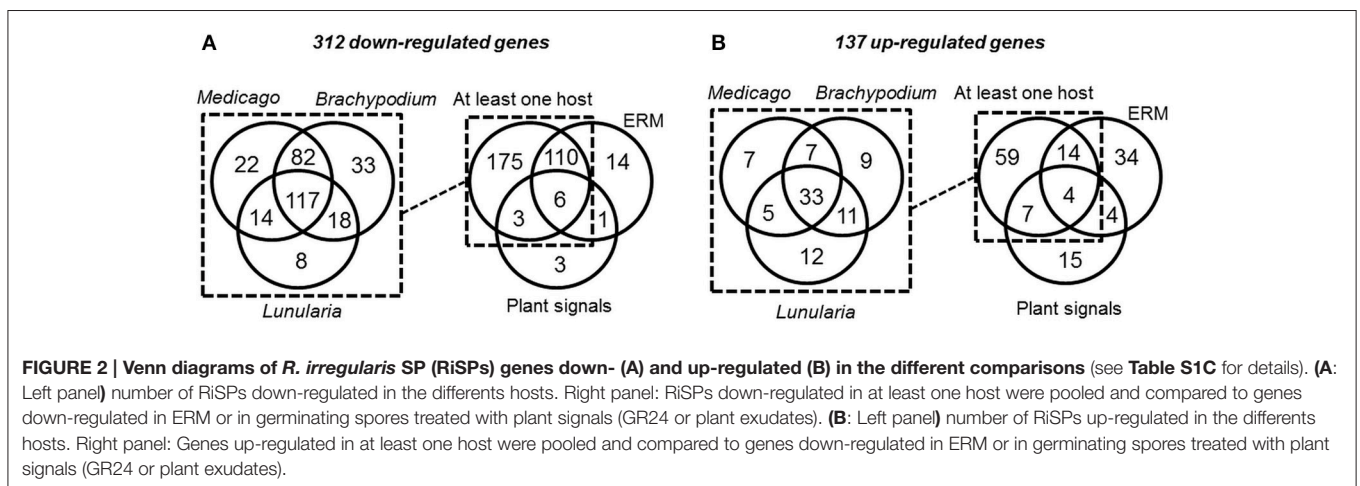
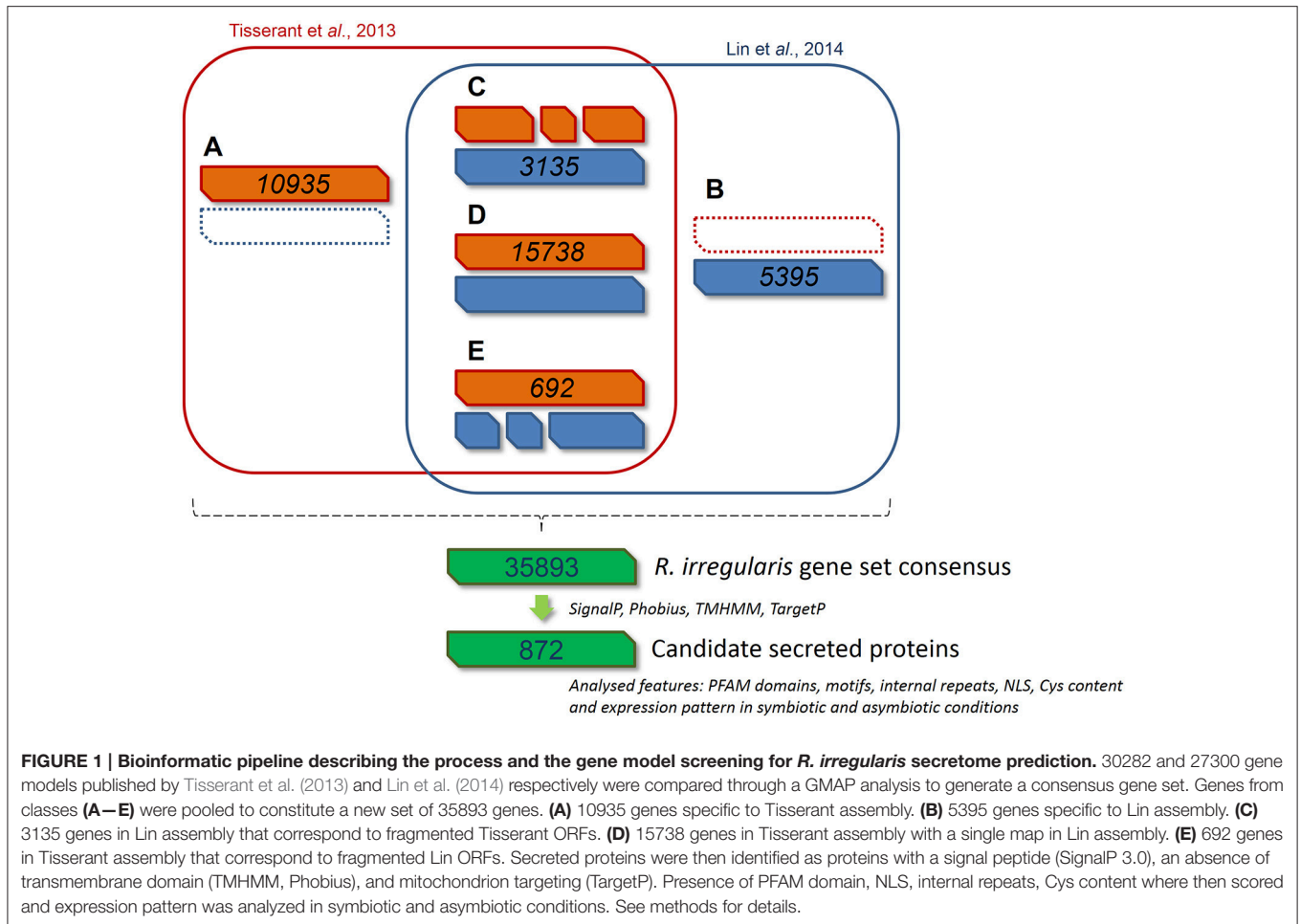
## Expression Patterns of RiSPs

As potentially important players in the interaction of AM fungi with their hosts, RiSP-coding genes are expected to be up-regulated in symbiotic conditions (Kloppholz et al., 2011). To analyse gene expression, RNAseq data were generated from various pre-symbiotic and symbiotic stages of fungal development (summarized in **Figure S1**; see methods). Briefly, spores of *R. irregularis* were germinated in liquid medium supplemented or not with root exudates or with GR24, a

strigolactone synthetic analog. For symbiotic conditions, the fungus was cultivated in association with *L. cruciata*, *B. distachyon*, and *M. truncatula*. These three hosts—a liverwort, a monocot, and a dicot—belong to distant clades of the embryophytes, allowing to highlight host selectivity of SP-encoding genes. In addition to these three conditions of intraradical mycelium (IRM), extraradical mycelium (ERM) was also sampled from carrot root organ culture (**Figure S1**). Regarding global expression, 590 among the 872 RiSPs showed a transcriptional activity in at least one of the tested conditions (**Tables S1B,C**). At this stage, it is impossible to conclude whether the 282 SPs with no transcriptional activity are pseudogenes or just not detected/not expressed in these biological conditions. Around 70% of the expressed RiSPs presented a statistically robust (FDR < 0.05) up- or down-regulation pattern (137 and 312 respectively over a 2 fold change) in at least one experimental comparison (**Figure 2**). An important overlap of down regulated genes (116) was observed in IRM and ERM compared to the reference (germinating spores), representing 88% of the genes downregulated in the ERM (**Figure 2A** right panel). Independent biological samples were produced to perform RT-qPCR on ten IRM up-regulated genes in medicago. All of them validated the RNAseq data (**Table S1F**).

Considering the 137 up-regulated RiSPs, 84 are up-regulated in the IRM (**Figure 2B** right panel), among them 33 are shared between the three hosts (**Figure 2B** left panel, **Table S1D**), suggesting that *R. irregularis* produces a common set of RiSPs irrespectively of the colonized host. Among these 33 RiSPs, a majority (19) are short proteins (< 200 aa) and include 12 SCRs (**Table S1D**), two (RiSP646 and RiSP734) are predicted to possess a NLS and display repeated motifs and six present a PFAM domain. Conversely, one third of RiSPs (28 among 84) are specifically up-regulated in a single host: 7, 9, and 12 have a specific up-regulation in *M. truncatula*, *B. distachyon*, and *L. cruciata* respectively (**Figure 2B** left panel, **Table S1E**). Among these 28 RiSPs, 25 code for proteins without any predicted function and may represent candidate host specific effectors.

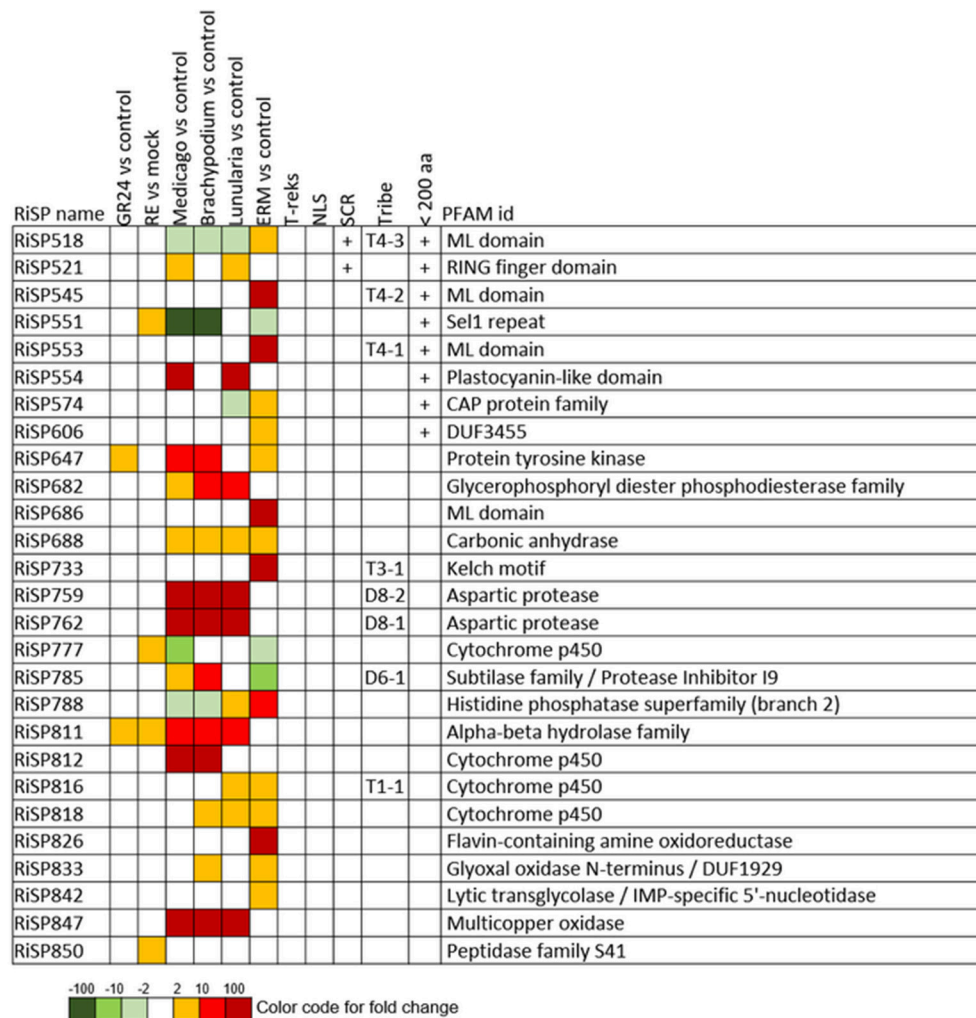
When considering the predicted features and functions of the 137 *in planta* up-regulated RiSPs, 27 present a PFAM domain (**Figure 3**). These SPs display an enrichment for Cytochrome P450s and the lipid binding ML domain (**Table S3**). Three RiSPs are exclusively expressed *in planta*: The two aspartic proteases RiSP759 and RiSP762 and a protein with Cu-oxidase domains, RiSP847. This three RiSPs are conserved in *P. indica*, *T. melanosporum*, and *L. bicolor*, suggesting a shared role between beneficial fungi. RiSP847 is likely a laccase-like multicopper oxidase that may act as a lignin modifier, although secondary cell wall are weakly developed in epidermal and cortical root cell layers (Baldrian, 2006). RiSP833, only found up-regulated in *B. distachyon*, could be involved also in cell wall modification since glyoxal oxidase domain-containing proteins have been shown to degrade lignin (Whittaker et al., 1999). Additionally, RiSP574 is a CAP protein that has been described to fulfill different roles including cellular matrix remodeling, cell-cell adhesion, and also fungal virulence (Barrero et al., 2002; Schreiner and Di Pietro, 2013), that fits with its specific up-regulation in ERM. Similarly, RiSPs with lipid binding activities (ML domain) are also uniquely



up-regulated in ERM. Four Cytochrome P450 with contrasted expression patterns may be involved in the production of fungal molecules or in cell detoxification required at different stage of development. Another protein of interest, induced by plant signals and also up-regulated in host roots encodes an alpha-beta hydrolase (RiSP811). Such proteins present a hydrophobic

pocket and are known to play multiple roles in perception and cleavage of endogenous and xenobiotic compound (Carr and Ollis, 2009). A putatively secreted carbonic anhydrase (RiSP688) is up-regulated *in planta* but also in ERM. The role of secreted fungal carbonic anhydases is yet unclear. However, their function seems shared between mutualistic fungi since





**FIGURE 3 | RiSPs with a PFAM domain that are up-regulated in at least one comparison.** RE, root exudates; ERM, Extra-Radical Mycelium; NLS, Nuclear Localization Signal; SCR, Small Cysteine Rich.

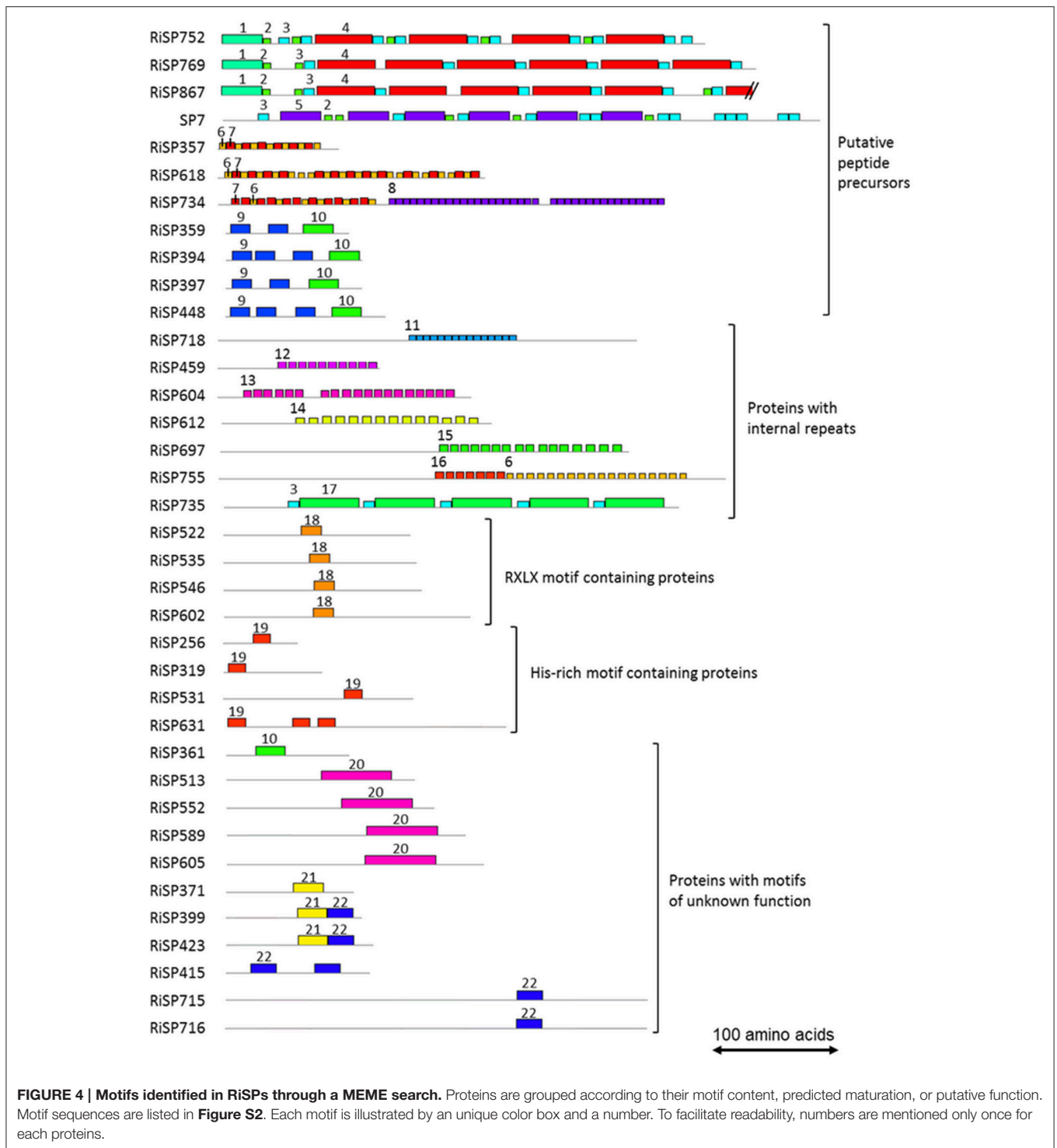
this protein is also present in *P. indica*, *T. melanosporum* and *L. bicolor* (Table S1C). Intracellular isoforms were described to participate in the regulation of intercellular pH. For instance, Nce103, a *Saccharomyces cerevisiae*  $\beta$ -class of carbonic anhydrase, was shown to be important for the fungal growth under ambient air condition and play a role in  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  homeostasis (Götz et al., 1999; Amoroso et al., 2005; Elleuche and Poggeler, 2010). Secreted fungal carbonic anhydrases are supposed to have a role also in soil acidification (Thorley et al., 2015), thus allowing a better mineral acquisition in ERM.

688 among 872 RiSPs lack PFAM annotation and have no predicted function. We used the MEME software to identify motifs present as internal repeats or shared by different proteins that may unravel functional groups not yet described (Figure 4; Figure S2), before sorting them by expression groups. Within RiSPs with no PFAM domain, we identified 44, 33, and 14 RiSPs with a preferential expression pattern in IRM, ERM or in response to plant signals, respectively (Figures 5–7). In RiSPs

preferentially expressed in IRM (Figure 5), 27 genes show a specific up-regulation in all three hosts tested, whereas six are also induced in response to plant signals and six also induced in ERM. Among these 27 RiSPs, three display a motif containing a RXLX sequence and are not induced in the ERM (motif 18, Figure 4; RiSP522, RiSP535, and RiSP546; Figure S2). The RXLX motif is reminiscent of RXLR effectors found in oomycetes (see next section).

### Search for Candidate Effectors

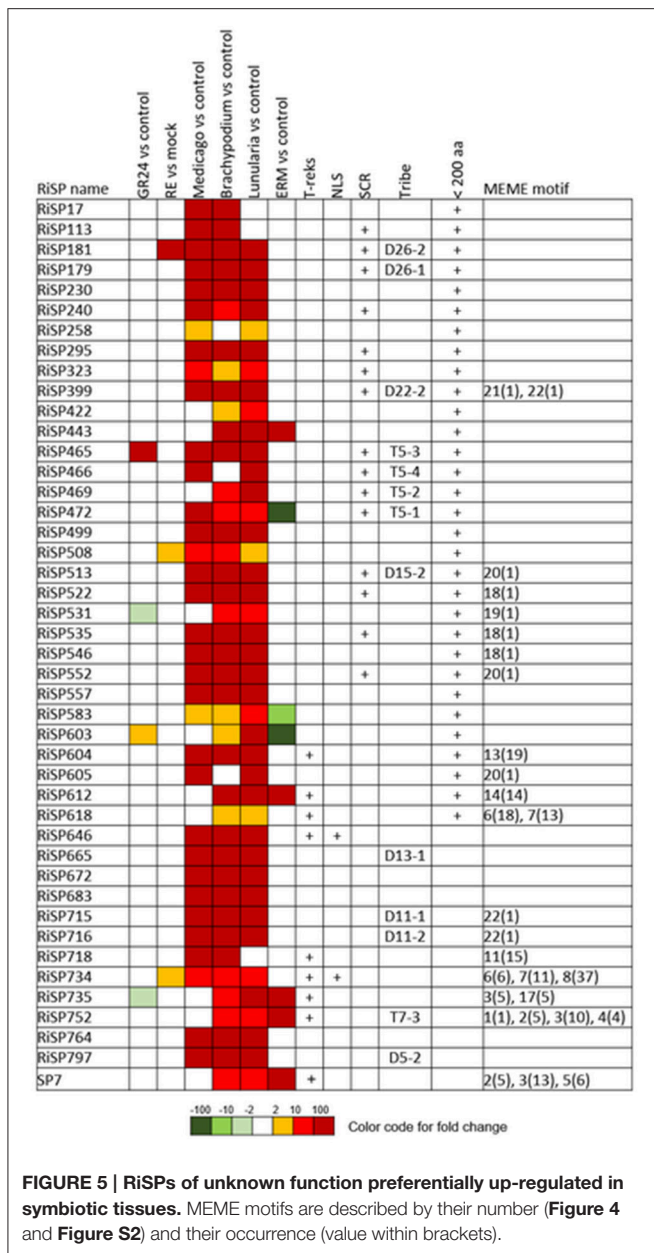
Effectors are SPs that have an incidence on host cell metabolism or immunity. Although functional validations are necessary to identify SP coding genes, *in silico* analysis allows the prediction of candidate effector proteins. Genes coding for effector proteins are often up-regulated during early and/or late stage of interaction with the host. Effectors of many different sizes have been reported in the literature dedicated to bacteria, oomycetes, or fungi. Therefore, we did not apply a size criterion and SPs of all sizes



can be assigned to the effector category. However, since fungal effectors are usually relatively small (< 200 aa), we report this additional protein feature in our description. Finally, fungal effectors often do not possess any known functions and may present structural features such as a NLS for nuclear host cell targeting, a high number of Cysteine for increasing protein

stability in plant apoplasm (Ellis et al., 2009), or internal repeats such as SP7 and Ss-RhS1 (Kloppholz et al., 2011; Yu et al., 2016).

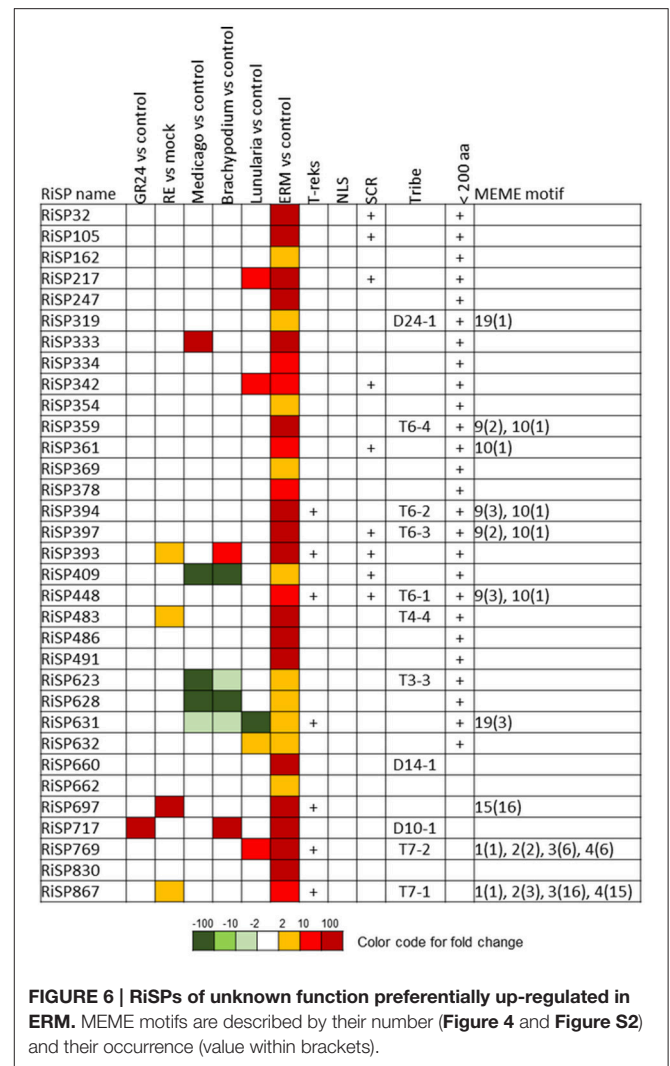
A total of 41 SP-coding genes containing a NLS motif were identified from the 872 RiSP candidates (**Table S1C**). Only four are up-regulated. RiSP668 and RiSP755 (**Figure 7**) are up-regulated in response to root exudates, RiSP646 (**Figure 5**) in IRM



**FIGURE 5 | RiSPs of unknown function preferentially up-regulated in symbiotic tissues.** MEME motifs are described by their number (Figure 4 and Figure S2) and their occurrence (value within brackets).

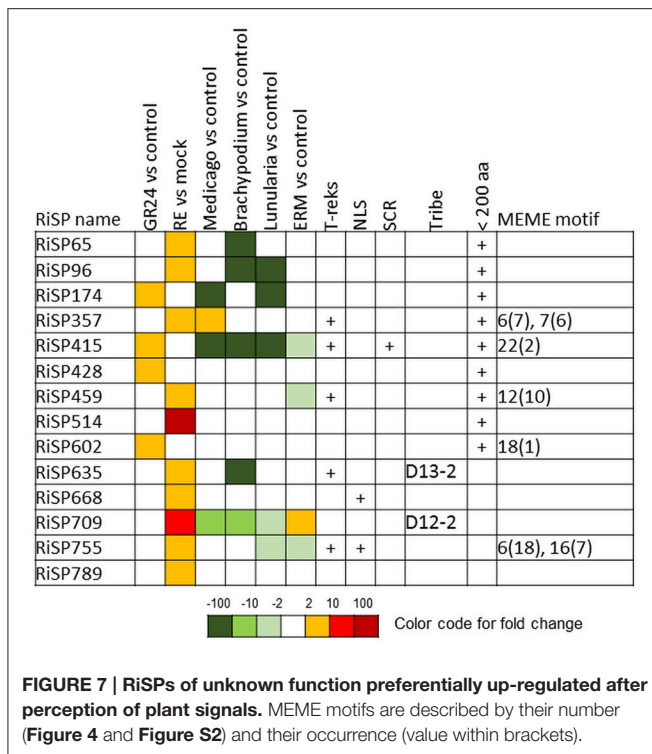
and RiSP734 in both conditions (Figure 5). The software MEME did not identify any significant enriched putative translocation motif in these four proteins or in the 41 NLS-containing RiSPs.

Throughout the 872 RiSPs, 141 can be assigned to Small Cysteine Rich (SCR) proteins. The analysis of the 872 RiSPs did not reveal an enrichment of Cysteine-containing motifs compared to the whole genome repertoire. In order to identify the motifs conserved in SCRs, we run the MEME software in this subgroup of proteins but no motif enrichment was observed. Similarly, no enrichment was detected in 127 SCRs predicted to form disulfide bond by Disulfind. Although *R. irregularis* produces SCRs, they did not form expression clusters in our conditions, as it was already observed for fungal pathogens (Saunders et al., 2012).



**FIGURE 6 | RiSPs of unknown function preferentially up-regulated in ERM.** MEME motifs are described by their number (Figure 4 and Figure S2) and their occurrence (value within brackets).

In addition to SCRs, Repeat Containing Proteins (RCPs) are often found in the secretome of eukaryotic filamentous plant pathogens (Mueller et al., 2008). The identification of RCPs was performed in all RiSPs using intra-sequence investigation (T-reks algorithm—Jorda and Kajava, 2009) (column D in Table S1C, see methods). On the 110 up-regulated genes with no PFAM domain, the motif discovery tool MEME (Bailey et al., 2009) was then used to identify motifs present in different proteins to reveal functional groups of proteins sharing domains yet uncharacterized (Figure 4; Figure S2). An intra-sequence MEME search allowed a visualization of the repeated motifs previously identified by the T-reks algorithm (Figure 4; Figure S2). As observed in the basidiomycete fungus *Ustilago maydis*, we identified two classes of RCPs where the repeated motifs display or not a putative KEX2 protease cleavage site, which consist of a dipeptide containing a Lysine or an Arginine followed by an Arginine: [KR]R (Mueller et al., 2008). In plant-fungus interactions, limited information is available for such proteins predicted to be cleaved and secreted as peptides. In the RCPs predicted to be cleaved, a first group is mainly up-regulated



in ERM: RiSP752, RiSP769 and RiSP867 (Figures 4, 6). These three RCPs have striking similarities with SP7, a previously characterized effector of *R. irregularis* (Kloppholz et al., 2011; Lin et al., 2014). These four RiSPs share the motifs 2 and 3. An alignment of SP7 with these RiSPs reveals indeed key conserved amino acids within the repeated motifs and a very strong conservation of the predicted KEX2 cleavage site (Figure S3). These observations suggest that SP7 and its relatives may be cleaved into short peptides. A second group of RiSPs putatively cleaved is mostly expressed *in planta* and present repetitions of the very short motifs 6, 7, and 8. Finally, four RiSPs with up-regulation in ERM display the motif 9 in two or three copies and is followed by the C terminal motif 10. This last motif is also found alone in RiSP361.

RCPs without cleavage sites were proposed to play a role in fungal cell wall as repetitive proteins (Mueller et al., 2008). Ss-Rhs1, a *Sclerotinia sclerotiorum* SP, was also recently reported as important for virulence (Yu et al., 2016). In *R. irregularis*, seven repetitive proteins were identified (Figure 4; Figure S2, motif 11 to 17). Our expression analysis reveals that these proteins are expressed at different physiological stages: RiSP604 and RiSP718 are IRM specific (Figure 5), RiSP459 and RiSP755 are up-regulated in response to root exudates (Figure 7), RiSP612 and RiSP735 are induced in both IRM and ERM (Figure 5) and RiSP697 is induced in ERM and in response to plant exudates (Figure 6). The motif 19, a Histidine rich motif, is present in four proteins (Figure 4; Figure S2). The motif 18, that contains a RXLX sequence, that resembles the well-characterized RXLR motif in effectors of oomycetes (Whisson et al., 2007), is present in four proteins,

either strongly expressed *in planta* (RiSP522, RiSP535, RiSP546, Figure 5) or induced in response to GR24 treatment (RiSP602, Figure 7).

We then searched for all known motifs identified in effectors of eukaryotic filamentous plant pathogens: [LI]xAR, [RK]Cx<sub>2</sub>Cx<sub>12</sub>H (Yoshida et al., 2009), RxLx (Plett et al., 2011), RxLR, [YFW]xC (Godfrey et al., 2010), YxSL[RK] (Lévesque et al., 2010), [WYF]CxTYxSTYL, [SG]PC[KR]P (Sperschneider et al., 2013), G[IFY][ALST]R (Catanzariti et al., 2006), CHxC (Kemen et al., 2011), [FY][MR][HY]V[AE]Y[PR]CM, CL[AK][TW]LHM, [WI][HG]N[WE] (Louis et al., 2014), KECxD (Nicastro et al., 2009), RSIDELD (Zuccaro et al., 2011), IGYRxVxxxxA, K[AV]W[VI]P, Q[ML]LIP (Cheng et al., 2014). Most of these motifs were present in *R. irregularis* secretome, however none of them was significantly enriched compared to non-secreted proteins (Table S4). Furthermore, we were unable to identify a positional constraint for these motifs. Previously, Lin and collaborators interestingly noticed that *R. irregularis* presents CRN-type effectors (Lin et al., 2014). These effector proteins are also present in the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (Joneson et al., 2011). Three CRN-like proteins are present in the 872 SPs (RiSP187, RiSP488, and RiSP756), but none of them present an expression pattern of interest (Tables S1B,C). One is expressed at a low basal level in all conditions tested (RiSP187), the two others have no or very weak expression levels in our experimental conditions (RiSP756 and RiSP488).

Finally, all genes coding for proteins with unknown function and up-regulated either specifically in one host, or up-regulated in all hosts tested (Figure 2 and Table S1) are candidates to fulfill an effector role, even though they do not display structural features of interest: NLS, *de novo* identified motif, repeated motifs or Cys-rich content. It is for example worth mentioning RiSP646 that displays a NLS, is upregulated in all three tested hosts and is conserved in *P. indica*, *T. melanosporum* and *L. bicolor*. This SPs may be a good candidate effector acting in a large range of mutualistic fungi.

## **Gigaspora rosea Secreted Proteins Up-Regulated during Symbiosis**

Previous RNA sequencing data were obtained from *G. rosea* cultivated in the same conditions as for *R. irregularis*, except that we were unable to obtain mycorrhized thalli of *Lunularia* (Figure S1). The *G. rosea* transcriptome assembly consists of 86332 contigs (mean length: 643 bp; 13318 contigs > 1 kb, 57472 contigs > 300 bp) (Tang et al., 2016). Similarly to *R. irregularis*, we curated *G. rosea* secretome for the presence of NLS, PFAM domains, SCR and T-reks features and used Blastclust to identify protein tribes. We obtained 2633 GrSPs (Table S5C), a number that could be however overestimated as defined from a transcriptome assembly of 86332 non-redundant virtual transcripts that contain probable partial sequences (Tang et al., 2016). We displayed in Table S5 the GrSPs that present homologies with *G. margarita* SPs, although this comparison is limited by the use of a minimal cut-off size of 350 bp in this assembly (Salvioli et al., 2015). Few paralog groups of proteins were identified among GrSPs using Blastclust: Only 87 proteins

were grouped in 20 tribes of at least 3 members. Seventy-eight other proteins were present in tribes of two members. A total of 42, 78, and 625 GrSPs presented respectively NLS, T-reks and SCR features while 152 displayed a PFAM domain, including 16 CAZymes. Only five motifs were identified by the MEME discovery tool in GrSPs, either as repeated motifs or shared by different proteins (Figure S4). The motif “a” presents a putative KEX2 cleavage site.

When analyzing expression patterns, only 289 GrSPs are found statistically significantly up-regulated in at least one tested condition (Figure 8 and Table S5D). Nine of them encode proteins with a NLS, 77 are assigned to SCRs, 13 display internal repeats and 40 present a PFAM domain (Figure S5). Eleven of them code for proteases including seven Aspartic protease already highly abundant in *R. irregularis* up-regulated genes. Proteins with domains involved in protein-protein interaction (Kelch, TPR) or known as chaperone (DnaJ), not previously described as secreted proteins) are also present. Additionally, proteins potentially involved in fungal/host cell wall modification were found: One polysaccharide deacetylase, two glycosyl hydrolases, one glycosyl transferase and one GDSL lipase-like. We already described proteins involved in cell wall modification in *R. irregularis*, but these proteins displayed different domains from those of *G. rosea*.

Considering the 289 up-regulated GrSP genes (Table S5D; Figure 8 right panel), a majority (203) is up-regulated *in planta*, among which 53 are commonly up-regulated in Medicago and Brachypodium (Table S5E). In this set, 29 are short proteins (< 200 aa) including 9 SCRs. Seventeen out of the 53 common GrSPs present a PFAM including six proteases. Two others (GrSP2592 and GrSP2603) are predicted to possess both a PFAM domain (a Calcineurin-like phosphoesterase and DnaJ chaperone respectively) and a NLS, suggesting a regulatory function in the host nucleus.

The other up-regulated GrSPs *in planta* are host-specific: 150 among 203 GrSPs, with 69 and 81 GrSPs respectively specific to Medicago and Brachypodium (Figure 8; Table S5F). Most of them (134) correspond to short proteins (< 200 aa), 46 are SCRs

and three contain a NLS (GrSP711, GrSP1384, and GrSP1700). Accordingly to these investigations, *G. rosea* displays a larger proportion of host specific SPs (74%) than *R. irregularis* (44%).

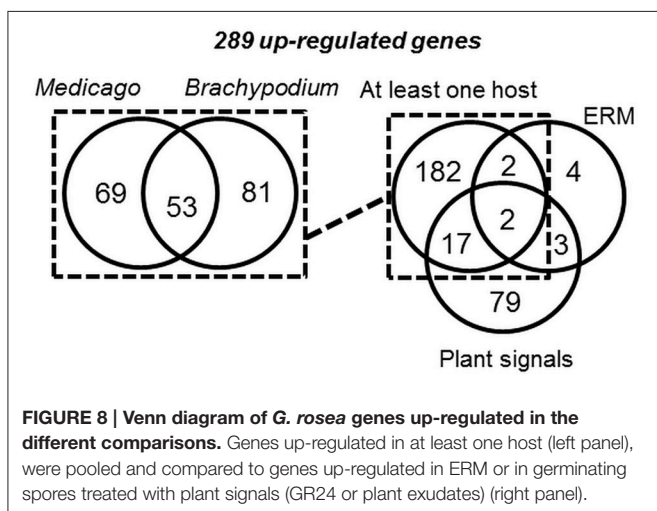
## Definition of a Core Set of SPs Shared by *R. irregularis* and *G. rosea*

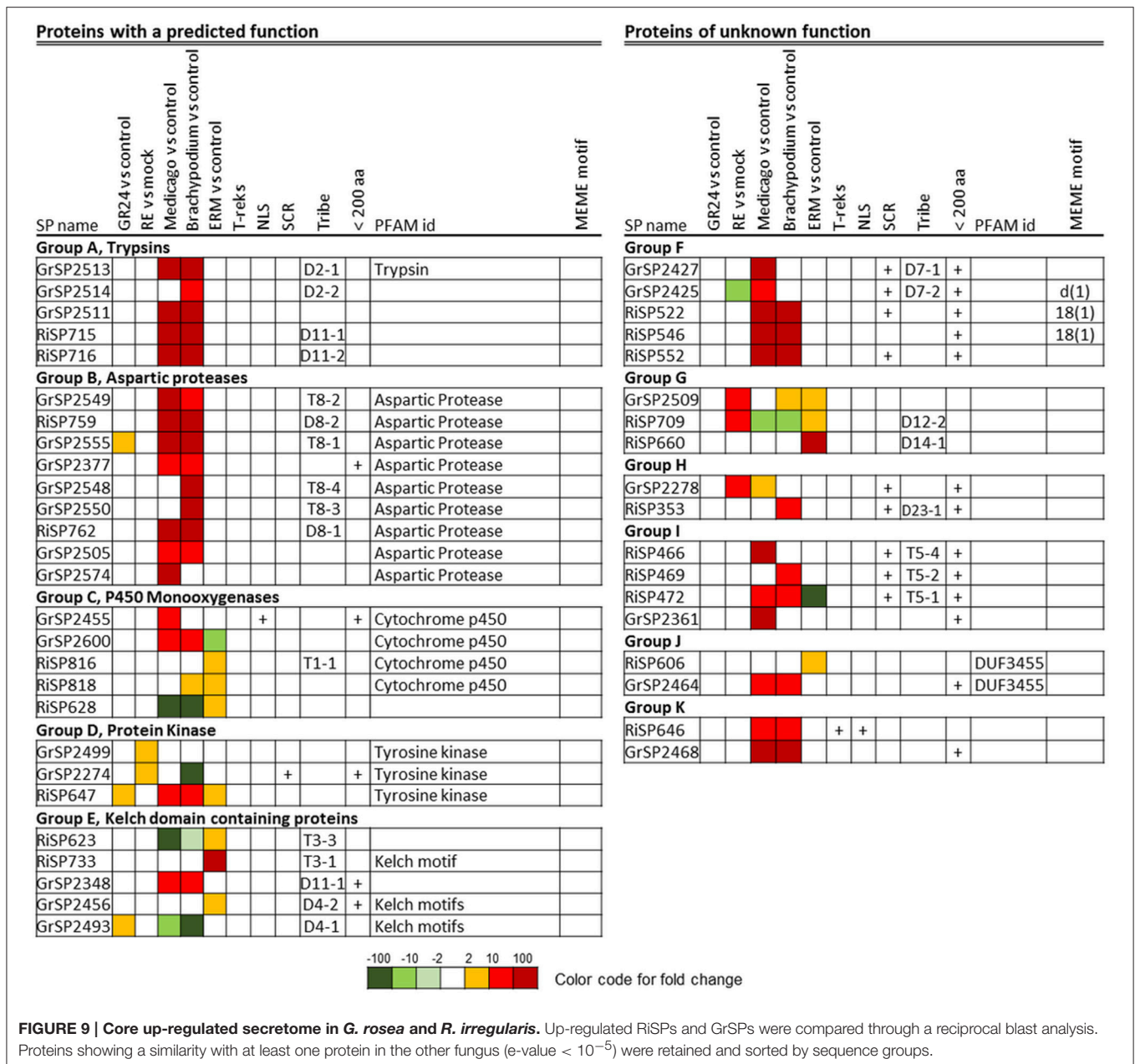
A BlastP analysis revealed that 194 out of 872 RiSPs (22%) present sequence similarities with GrSPs even with an e-value lower than  $10^{-1}$  (Table S1C column AB). In order to identify a possible conserved core secretome expressed at the different steps of the symbiosis, we considered RiSPs and GrSPs that showed homology through a blastP analysis at an e-value  $< 10^{-5}$ . It resulted in 21 RiSPs and 24 GrSPs, sorted in 11 sequence groups (Figure 9). Within PFAM domain-containing proteins, we identified several Aspartic proteases and trypsins, but also proteins containing a Kelch domain, involved in protein-protein interaction. Kinases and Cytochrome P450 were also present. Interestingly, some proteins of unknown function clustered with proteins containing a PFAM domain, thus suggesting a putative similar function. For example in group A (Figure 9), three GrSPs belonged to the same group even though only one of them contains a Trypsin domain. They were grouped with two RiSPs for which a predicted trypsin-like activity was also inferred. In groups F to K, secreted proteins with unknown functions were present, including the above mentioned RiSPs with a RXLX containing motif (group F). The RXLX motif is however not conserved in GrSPs of the same orthologous group.

These 45 genes did not always display the same expression patterns in *G. rosea* and *R. irregularis* (Figure 9). For example in group D (tyrosine kinase), RiSP647 was found up-regulated *in planta*, in ERM and in response to plant signals while the GrSP2274 and GrSP2499 orthologs were exclusively up-regulated in response to root exudates. In group C, P450-coding GrSPs were induced *in planta* whereas in *R. irregularis* they were mostly up-regulated in ERM. The DUF3455 containing proteins in *R. irregularis* and *G. rosea* also displayed striking difference in expression (group J). Within the 11 groups, six are formed by SPs that have conserved expression pattern in *G. rosea* and *R. irregularis*: Group A and B that contain proteases quite exclusively expressed *in planta*; groups F, I, and K, that are composed of SPs of unknown function up-regulated *in planta*; and group G, formed by SPs of unknown function mainly up-regulated by plant signals and in ERMs. These groups form the core set of SPs shared by *R. irregularis* and *G. rosea* that could have conserved roles during the establishment of AM symbiosis. Throughout the SPs presented in Figure 9, a small fraction shows conservation in other beneficial fungi (groups B, C, D, and K), thus suggesting a broader role in plant/mutualistic fungi interactions.

## DISCUSSION

Secreted proteins (SPs) are major actors of fungal cell organization and development such as cell wall structure (e.g., chitin deacetylase, structural proteins), mating, and nutrient acquisition (e.g., hydrolases) (Thorner, 1981; Bouws et al., 2008).





SPs are also described for their role in host invasion as some of them can be effectors that are key outposts modulating or altering host immunity (Koeck et al., 2011; Petre et al., 2014; Plett and Martin, 2015). In this work, we first defined sets of secreted protein (SP) genes from two phylogenetically distant AM fungi—*R. irregularis* and *G. rosea*, based on gene model definition and gene expression activity. We then compared the expression patterns of SPs during the establishment of AM symbiosis in the two AM fungi associated with different host plants in order to investigate the conservation of their invasion strategies. Our interest particularly focused on the following questions: (i) Does *R. irregularis* use the same set of SPs whatever the host plants or are there host-specific SPs in *R. irregularis*? (ii) Are expressed

secretomes of *R. irregularis* and *G. rosea* reflecting similar strategy for plant invasion? (iii) Are there “universal keys” for AM fungi to invade diverse host plants?

## Secretome Sets of *R. irregularis* and *G. rosea*

We identified 872 RiSPs representing 2.4% of the 35893 predicted proteins present in the proteome of *R. irregularis*. It is interesting to compare this repertoire to those of other plant interacting fungi, like the maize pathogen *U. maydis* (431 predicted SPs, 6.6% of the proteome) (Lum and Min, 2011), the rice pathogen *Magnaporthe oryzae* (1471 predicted SPs, 10.5% of the proteome) or the multi-host ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (650

predicted SPs, 3.6% of the proteome - Lum and Min, 2011). Considering that *R. irregularis* can interact with thousands of host plants, one could have expected a much larger set of putative effector proteins in the secretome, different ones for different hosts. However, it has been documented that fungal secretome size is the result of environmental and evolutive adaptive traits as various as life-style, host spectrum, genome, and proteome sizes (Meinken et al., 2014; Pellegrin et al., 2015; Kim et al., 2016). Since the number of RiSPs is not higher than average, we can speculate that this fungus evolved with a limited number of effectors to possibly interact with conserved targets. In the case of *G. rosea*, a larger set was identified from the transcriptome assembly (2633 GrSPs, i.e., 2.7% of the gene repertoire), although it can be estimated that genomic data would resolve some isoforms and fragmented ORFs. When the *G. rosea* genome will be available, these results will be enhanced and fine-tuned. When comparing these GrSPs with RiSPs (this study), we found that only 22% have sequence similarities, whereas 95% of RiSPs have similarities with SPs defined from *Rhizophagus clarus* (Sędziewska Toro and Brachmann, 2016). This result indicates that SPs are mainly composed of lineage specific proteins. This is in agreement with previous findings in literature on interspecies comparative analysis of the secretomes. Closely related fungal species, either parasitic (Schirawski et al., 2010; Heard et al., 2015) mutualistic or saprotrophic (Pellegrin et al., 2015), obviously present highly conserved secretome or effectome. Different factors can contribute to secretome variation and evolution: Host specificity (Dutheil et al., 2016), phylogenetic history (Krijger et al., 2014; Pellegrin et al., 2015) and also life-style (Kim et al., 2016). *G. rosea* and *R. irregularis* sharing the same lifestyle, the great divergence of their secretome should mostly result from differences in host range and phylogenetic history of these two species.

## Search for Putative Effectors

The first effector described in AMF was SP7 in *R. irregularis* (Kloppholz et al., 2011). Interestingly, and in agreement with previous findings, three RiSPs were found to have similarities with SP7 (Lin et al., 2014). These RiSPs were found up-regulated *in planta* and also highly up-regulated in ERM. Our sequence analysis revealed that these genes contain repetitive motifs all starting with a conserved ([KR]R) signature previously identified as a KEX2 proteolytic cleavage site. An example of KEX2-cleaved proteins is Rep1 from *U. maydis* that produces 11 secreted peptides involved in cellular attachment (Teertstra et al., 2009). SP7 was described to act as a native protein, repressing the expression of a plant transcription factor in the nucleus. The presence of KEX2-cleavage sites suggests that SP7 and its orthologs might also be present in the fungal/plant interface as short peptides previously matured in the fungal Golgi. Two proteins in the *G. rosea* proteome also present repeated motifs containing a putative KEX2-cleavage site (GrSP2479 and GrSP2488). However, their sequence is different from that of the *R. irregularis* “SP7 family.” Further functional characterization will unravel whether these proteins are indeed processed and secreted as short peptides and how these peptides act, either as

cell wall attached components similarly to Rep1 or whether they fulfill a different role on the plant surface or within plant cells.

Another putative effector, SIS1, was recently published (Tsuzuki et al., 2016). This gene (corresponding to the Gloin1 transcript ID 342269) was not included in our analysis since a transmembrane domain was detected by our bioinformatic pipeline.

Among the different RiSPs that we analyzed, none have strong similarities with known fungal virulence proteins (not shown). We attempted to identify large groups of gene families likely encoding effector proteins, as it was found in oomycetes species. Oomycetes display large expanded genes families containing conserved N-terminal motifs, proposed to be crucial for translocation into plant host cells and for virulence (de Jonge et al., 2011; Giraldo and Valent, 2013). Within these gene families, the encoded RXLR and CRN effectors are the most well-studied. In fungi, there is no functional evidence of expanded gene families sharing large conserved domains. However, a conserved motif (Y/F/WxC), proximal to the signal peptide, was observed in a large proportion of secreted proteins in *Blumeria* and *Puccinia* species (Godfrey et al., 2010). Four RXLX-motif-containing proteins were identified in the RiSP set. While in oomycetes a RXLR sequence is proximal to the signal peptide, we only found the RXLX motif (18) in central position of *R. irregularis* proteins. It remains to be determined whether these proteins are true effectors and if this RXLX motif is important for protein translocation into host cells, as it is the case for miSSP7 in *L. bicolor* that contains a RXLX motif (RALG sequence, Plett et al., 2011) required for host cell entry. Interestingly, three of the SPs that contain this motif were specifically expressed *in planta* whatever the hosts tested. Conversely, while some RiSPs contain a CRN-like motif, they do not display an expression profile suggesting a role as effector. In the case of GrSPs, the typical CRN amino acid sequence LFLAK (Haas et al., 2009) was not found, and *de novo* search for enriched motifs did not allow identifying sequences containing a RXLX motif.

Another feature frequently observed in the secretome of eukaryotic filamentous plant pathogens is the presence of families of small cysteine rich proteins. The RiSP set includes 141 SCR proteins, and 625 for the GRSP set. In the two sets, SCR proteins were not organized in protein families as defined by Blastclust. Different SCR proteins from *R. irregularis* and *G. rosea* were highly induced in at least one host (24 and 55 respectively), suggesting a role at the plant-fungus interface.

Even though host cell wall degrading enzymes are absent in *R. irregularis* (Tisserant et al., 2013) and *G. rosea* secretomes (Tang et al., 2016), we identified proteins that may act as plant cell wall modifiers. Lignin targeting enzymes were present such as a laccase-like (RiSP847) induced in the three hosts and a glyoxal oxidase domain-containing protein (RiSP833) up-regulated only in *B. distachyon* and in ERM. Many enzymes acting as glycoside modifiers were also identified in GrSPs (e.g., the glycoside hydrolases GrSP2566 and GrSP2573, or GrSP2525, a polysaccharide deacetylase). A CAP-domain-containing protein (RiSP574) may also be involved in cell wall remodeling or cell-cell adhesion. This protein is induced in ERM, as observed for the group of proteins with lipid binding motifs (ML motifs).

Altogether, they may play an important role in the sensing machinery devoted to host recognition. Since proteins with ML domains are also present in fungal pathogen secretomes (Saunders et al., 2012), one could also consider that they may be involved in targeting specific host membrane regions, possibly involved in PAMP perception.

Through our *de novo* searching for unknown motifs, we identified as His-rich motif in two genes expressed specifically in ERM (RiSP319 and RiSP631) and in two genes expressed *in planta* (RiSP531 and RiSP256). Interestingly, these motifs have been proposed to have a metal binding property and are present in plant cell wall arabinoglactan proteins (Hijazi et al., 2014) and in plant dehydrins, where they regulate plasma membrane stability (Hara et al., 2005). Based on this observation, an effector role can be also suspected for these four proteins, acting at the plant-fungus interface.

Lastly, it is interesting to point out that numerous aspartic proteases and trypsins present in RiSP and GrSP sets are up-regulated *in planta* in these two species. They are good candidates in the targeting of plant defense proteins such as chitinases.

### Comparison of RiSP and GrSP Expression Patterns in Different Hosts: Different AM Fungi, Different Invasive Strategies?

Comparison of RiSPs gene expression patterns in different hosts revealed that an important proportion of them is shared whatever the plant host. Even in *L. cruciata*, where the symbiosis occurs in a photosynthetic thallus and not in root tissues, the expression pattern presented a strong consensus with those obtained from roots of *Brachypodium cruciata* and *M. truncatula*. Due to the large phylogenetic diversity of these hosts, and the physiological difference in the colonized tissues, we propose that this set of genes represents the common mycorrhizal RiSP set. In addition to this common set of genes, *R. irregularis* encodes other RiSPs specifically expressed in the different hosts tested. As AM symbiosis is a continuous process (young and old colonization structures are concomitant in one root), it is more likely that these differences are due to specific expression in one host than an absence of expression due to different stage of development in another host. We speculate that these RiSPs may be specific effectors that could have a role in the fitness to certain hosts. Interestingly, we observed that these “host specific SPs” are mostly of small size and contain no PFAM domain. The three plant host species investigated in this study belong to highly phylogenetically divergent clades, so it can be proposed that different combinations of these “host specific” RiSPs would be expressed according to different hosts, in addition to the commonly expressed RiSP genes.

In *G. rosea*, a larger ratio of “host specific” GrSPs was found. When only looking at *M. truncatula* and *B. distachyon* IRM data, we observed that 74% of up-regulated *in planta* GrSPs are expressed in only one host, compared to 44% for RiSPs. “Host specific” GrSPs do not have orthologs among RiSPs and reciprocally, supporting the lineage specific origin of the “host specific” SPs. Genome size, gene repertoire and secreted gene set of *G. rosea* are larger than those of *R. irregularis*. This gene

inflation might be correlated to an increase of “host specific” GrSPs. However, this increase of putative host specific GrSPs is not linked to a higher efficiency of symbiotic ability as *G. rosea* and Gigasporaceae in general, are described as less aggressive than *R. irregularis* and Glomales (Jansa et al., 2002; Russell and Bulman, 2005; Sýkorová et al., 2007). As an illustration, we failed to obtain mycorrhizal association of *G. rosea* with *L. cruciata* despite numerous attempts, in accordance to diversity analyses and colonization assays performed on other liverworts (Ligrone et al., 2007). In the same line, mycorrhizal association of *G. rosea* DAOM 194757 with *M. truncatula* A17 is slower than with *R. irregularis* DAOM 197198 so that we used a nursery system in the 3 first weeks of interaction to obtain a high level of symbiotic structures in 5 weeks as for *R. irregularis*. The contrast between the symbiotic developmental strategies of these two fungi, coupled to our data on the numerous host-specific GrSPs, argue for a higher degree of “host preference” of *G. rosea* as observed for some pathogens (Poloni and Schirawski, 2015).

### Identification of a Set of Common SPs between *R. irregularis* and *G. rosea*

We identified several SP-coding genes that share similarities of sequence and expression pattern in different hosts, several of them being only expressed in host tissues. They code for proteases and SP of unknown function and represent a highly conserved AM symbiotic core secretome, predicted to play a conserved and presumably essential role for the establishment of AM symbiosis. This low number of highly conserved SPs was however expected since *R. irregularis* and *G. rosea* are phylogenetically distant AM fungi. Nevertheless, discovering the function of these SPs will definitely unravel key conserved molecular mechanisms that may be universal to an extremely large number of AMF—plant interactions. These SPs may also play a role beyond AMF, since some of them are conserved in other mutualistic fungi: The endophyte *P. indica* or the ectomycorrhizal fungi *L. bicolor* and *T. melanosporum*. In addition to their conserved SPs, *R. irregularis* and *G. rosea* secretomes share numerous common features. Both fungal species lack canonical cell wall degrading enzyme, protease inhibitors or known fungal effectors, suggesting that they colonize host roots by mechanisms far different from root pathogens. These two secretomes include an important set of diverse enzymes like P450 monooxygenases, aspartic and serine proteases. These last ones can act as factors of compatibility by targeting host chitinases, as proteases of plant fungal pathogens were described as virulence factors (reviewed by Jashni et al., 2015). They can also play a role in signaling pathways via activation or inactivation of host/fungal proteins through specific cleavage, thus turning on a pathway leading to root colonization. Besides, they may also fulfill a role in amino acid acquisition after cleavage of extracellular proteins or peptides. We also identified SPs both in *R. irregularis* and *G. rosea* that may target fungal or plant cell wall during the symbiosis, even though these proteins present very different PFAM domains between the two fungi. This observation suggests that same targets may be shared by the two fungi, even though the nature of the involved SPs are different.



To conclude, our study comparing SP gene sets and their expression from two phylogenetically distant AM fungi in different hosts shed light at the molecular level on the existence of different symbiotic strategies among glomeromycotan fungi (Smith et al., 2003). First, the ubiquitous species *R. irregularis* harbors an important core of symbiotic SPs whatever the host, corresponding to a lower host specialization than *G. rosea*. Secondly, SPs expressed while colonizing host plants were mostly fungal lineage specific. Third, a core set of symbiotic SPs shared by *R. irregularis* and *G. rosea* was identified, including putative effector proteins that could target conserved mechanisms in monocots and dicots. This work therefore paves the way to further functional analysis dedicated to proteins specifically or commonly expressed by different glomeromycotan fungi, underlying that data obtained from *R. irregularis* DAOM 197198 could not always be relevant for all AM fungi as often considered in litterature.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

CR and NFdF designed the experiments. NT and MM respectively realized the experiments with *G. rosea*. and *R. irregularis*. LK, NT, MM, and CR. analyzed the RNAseq data. HS developed the scripts for the *in silico* analyses. LK, MLM, CR, and NFdF analyzed and interpreted the secretome data. LK, CR, and NFdF wrote the manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work has been done in the Plant Science Research Laboratory (LRSV), part of the “Laboratoire d’Excellence” (LABEX) entitled TULIP (ANR-10-LABX-41). LK is granted by Agronutrition (Labège, France). We thanks S. Roy and J. Loubradou (Agronutrition, Labège) for fungal spore production, P. M. Delaux for providing the *L. cruciata* culture and J.M. Prospéri (Centre de Ressources Biologiques *M. truncatula*, UMR AGAP 1334, Montpellier, France) for *M. truncatula* A17 seeds. We are very thankful to P. M. Delaux and G. Bécard (LRSV, UMR 5546 CNRS Université Toulouse III, Castanet-Tolosan, France) for critical reading of the manuscript.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.00124/full#supplementary-material>

**Figure S1 | Overall presentation of the different biological conditions prepared for RNAseq comparisons.** *G. rosea* and *R. irregularis* were both cultivated alone or in symbiosis with different hosts. Germinated spores *in vitro* (asymbiotic stage) were used as reference for all comparisons. See material and methods for details. FC, fold change.

**Figure S2 | List of the motifs identified by the MEME discovery tool and presented in Figure 4.** Boxes indicate putative KEX2 clivage sites ([KR]R). A non-canonical clivage site is underlined in Motif 9.

**Figure S3 | Sequence alignment of SP7 with three RiSPs displaying strong similarity.** Alignment was made with MAFFT (v7.299b) and displayed with

CLUSTAL format. Signal peptide was removed from the protein sequences. Boxes indicate putative clivage sites ([KR]R) followed by conserved amino acids.

**Figure S4 | Protein structures (A) of GrSPs displaying motifs of unknown function (B).** A putative KEX2 cleavage site is underlined in motif « < > ».

**Figure S5 | GrSPs with a PFAM domain up-regulated in at least one comparison.** RE, root exudates; ERM, Extra-Radical Mycelium; NLS, Nuclear Localization Signal; SCR, Small Cysteine Rich.

**Table S1 | Sequences, structural features, and expression of *R. irregularis* gene-encoding secreted proteins.** (A) Overall quality of RNAseq libraries from *R. irregularis* in culture or in symbiotic tissues. Triplicate variability (figure) was analyzed by principal component analysis with CLC Genomic Workbench. For each replicates, the correlation matrix (“normalized” version of the covariance matrix) was calculated to define the orthogonal eigenvectors of the first and second major principal components, showing a simplified version of the variability of data. (B) RNAseq raw expression data of the 872 RiSPs obtained from Illumina HiSeq2000 sequencing (2 x 101 bp). Calculations were performed using CLC Genomics Workbench 9.0 software (see methods). Control = *in vitro* germinated spores (except for root exudates assays: control = spores produced in same condition but without root exudates). (C) List of the 872 RiSPs, their structural features and expression level in different comparisons. Column A refers to the best gene models that were identified by comparing Gln1 and Rir gene models by GMAP. GeneID listed in Column B refers to the non-selected SP sequences (if present in the other assembly) that have similarity with the best SP gene model in column A; GeneID in bold type in column B refer to sequences that are strictly similar (identity and length) to corresponding sequence in Column A. RiSP name in column C corresponds to the nomenclature used in the present manuscript. Columns D to R list the sequence features. MEME motifs are described by their number (Figure 4) and their occurrence (value within brackets). Expression data are listed in column T to Y. Only statistically validated fold change values (FDR ≤ 0.05) are presented (see S1B for global expression data). Best orthologs with sequence of *R. clarus* are listed in columns Z and AA, and with sequences of *G. rosea* in column AB. Gene id for *L. bicolor*, *T. melanosporum*, and *P. indica* are annotated with their JGI gene number, preceded by “Lb,” “Tm,” and “Pi” respectively. (D) List, expression and structural features of the 33 RiSPs overexpressed in the three tested hosts. Only statistically robust data are listed (fold discovery rate—FDR ≤ 0.05). (E) List, expression, and structural features of the 28 RiSPs up-regulated in a single host. Only statistically robust data (fold discovery rate—FDR ≤ 0.05) are listed. RE, Root Exudates; ERM, Extra-Radical Mycelium; FDR, False Discovery Rate; NLS, Nuclear Localization Signal; PFAM, Protein Family; SCR, Small Cysteine Rich; SP, Signal Peptide. (F) Expression level of 10 RiSPs genes in mycorrhized *M. truncatula* roots compared to germinating spores of *R. irregularis*, as defined by RNAseq and RT-qPCR. RNA was extracted with the Qiagen RNeasy mini kit and cDNA was synthesized using the Promega M-MLV RT enzyme, following the manufacturer instructions. RT-qPCR were performed on a Roche LightCycler 480. Total RNA were extracted from mycorrhized *M. truncatula* roots and germinating spores, in three independant replicates each. Average of the three experiments is depicted. Gene expression were normalized using *R. irregularis* PFK gene expression by the 2- $\Delta\Delta$ CT method.

**Table S2 | Enriched PFAM domains in *R. irregularis* secretome.** Domains present in at least 3 proteins are depicted. Enrichment was determined through frequency comparison against the whole proteome. *P*-value calculation for statistical enrichment was calculated with a Chi-square test and a Bonferroni correction.

**Table S3 | PFAM domains enriched in up-regulated RiSPs.** Only PFAM domains present in at least 3 proteins were selected. Enrichment was calculated against the whole proteome. *P*-value calculation for statistical enrichment was calculated with a Chi-square test and a Bonferroni correction.

**Table S4 | Known effector motifs search through *R. irregularis* secretome.** Occurrence of the different motifs is indicated, after allowing 0 or 1 amino acid mismatch. *P*-value calculation for statistical enrichment against non-secreted proteins was calculated with a Chi-square test and a Bonferroni correction. Reference for each motif is indicated in the text.

**Table S5 | Sequences, structural features, and expression of *G. rosea* gene-encoding secreted proteins.** (A) Overall quality of RNAseq libraires from *G. rosea* in culture or in symbiotic tissues. Triplicate variability (figure) was

analyzed by principal component analysis by using CLC Genomic Workbench. For each replicates, the correlation matrix ("normalized" version of the covariance matrix) was calculated to define the orthogonal eigenvectors of the first and second major principal components, showing a simplified version of the variability of data. **(B)** RNAseq raw expression data of the 2633 GrSPs obtained from Illumina Hiseq2000 sequencing (2 x 101 bp) and Miseq1000 sequencing (2 x 151 bp). Calculations were performed using CLC Genomics Workbench 9.0 software (Control = *in vitro* germinated spores, except root exudate assays: mock = spores produced in same condition but without root exudates). **(C)** List of the 2633 GrSPs, structural features and expression level in different comparisons. "Gr id" refers to number of contig as defined in Tang et al. (2016). Columns C to O list the sequence features. MEME motifs are described by their number (**Figure 4**) and their occurrence (value within

brackets). Expression data are listed in column P to T. Only fold change values statistically validated (fold discovery rate—FDR < 0.05) are presented (see **Table S5B** for global expression data). Best orthologs with sequence of RiSPs are listed in column V. Putative isoforms are depicted with superscripts number in "Gr id" column, see footnotes. **(D)** List, expression, and structural features of the 289 GrSPs up-regulated in at least one symbiotic condition. Only statistically robust data (FDR ≤ 0.05) are listed. **(E)** List, expression, and structural features of the 53 GrSPs up-regulated in the two tested hosts. Only statistically robust data (FDR ≤ 0.05) are listed. **(F)** List, expression, and structural features of the 150 GrSPs up-regulated in single host. Only statistically robust data (FDR ≤ 0.05) are listed. RE, Root Exudates; ERM, Extra-Radical Mycelium; FDR, False Discovery Rate; NLS, Nuclear Localization Signal; PFAM, Protein Family; SCR, Small Cysteine Rich; SP: Signal Peptide.

## REFERENCES


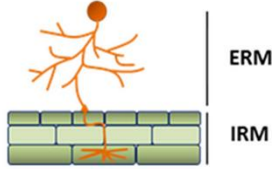
- Akiyama, K., Matsuzaki, K., and Hayashi, H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435, 824–827. doi: 10.1038/nature03608
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Alva, V., Nam, S.-Z., Söding, J., and Lupas, A. N. (2016). The MPI bioinformatics toolkit as an integrative platform for advanced protein sequence and structure analysis. *Nucleic Acids Res.* 44, W410–W415. doi: 10.1093/nar/gkw348
- Amoroso, G., Morell-Avrahov, L., Müller, D., Klug, K., and Sültemeyer, D. (2005). The gene NCE103 (YNL036w) from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a functional carbonic anhydrase and its transcription is regulated by the concentration of inorganic carbon in the medium. *Mol. Microbiol.* 56, 549–558. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04560.x
- Baggerly, K. A., Deng, L., Morris, J. S., and Aldaz, C. M. (2003). Differential expression in SAGE: accounting for normal between-library variation. *Bioinformatics* 19, 1477–1483. doi: 10.1093/bioinformatics/btg173
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., et al. (2009). MEME suite: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.* 37, 202–208. doi: 10.1093/nar/gkp335
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 215–242. doi: 10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x
- Bari, R., and Jones, J. D. G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* 69, 473–488. doi: 10.1007/s11103-008-9435-0
- Barrero, R., Umeda, M., and Yamamura, S. (2002). Arabidopsis CAP regulates the actin cytoskeleton necessary for plant cell elongation and division. *Plant Cell* 14, 149–163. doi: 10.1105/tpc.010301
- Bécard, G., and Fortin, J. A. (1988). Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108, 211–218. doi: 10.1111/j.1469-8137.1988.tb03698.x
- Bécard, G., and Pfeffer, P. E. (1993). Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during *in vitro* development. *Protoplasma* 174, 62–68. doi: 10.1007/BF01404043
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G., and Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: signalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340, 783–795. doi: 10.1016/j.jmb.2004.05.028
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate, a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. B* 57, 289–300.
- Besserer, A., Bécard, G., Jauneau, A., Roux, C., and 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 Physiol.* 148, 402–413. doi: 10.1104/pp.108.121400
- Besserer, A., Puech-Pagès, V., Kiefer, P., Gomez-Roldan, V., Jauneau, A., Roy, S., et al. (2006). Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol.* 4:e226. doi: 10.1371/journal.pbio.0040226
- Boller, T., and Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 379–406. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346
- Börstler, B., Raab, P. A., Thiéry, O., Morton, J. B., and Redecker, D. (2008). Genetic diversity of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as determined by mitochondrial large subunit rRNA gene sequences is considerably higher than previously expected. *New Phytol.* 180, 452–465. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02574.x
- Bouws, H., Wattenberg, A., and Zorn, H. (2008). Fungal secretomes—nature's toolbox for white biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 381–388. doi: 10.1007/s00253-008-1572-5
- Carr, P. D., and Ollis, D. L. (2009).  $\alpha/\beta$ Hydrolase fold: an update. *Protein Pept. Lett.* 16, 1137–1148. doi: 10.2174/092986609789071298
- Catanzariti, A.-M., Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Ayliffe, M. A., and Ellis, J. G. (2006). Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *Plant Cell* 18, 243–256. doi: 10.1105/tpc.105.035980
- Ceroni, A., Passerini, A., Vullo, A., and Frascioni, P. (2006). DISULFIND: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. *Nucleic Acids Res.* 34, W177–W181. doi: 10.1093/nar/gkl266
- Cheng, Q., Wang, H., Xu, B., Zhu, S., Hu, L., and Huang, M. (2014). Discovery of a novel small secreted protein family with conserved N-terminal IGY motif in Dikarya fungi. *BMC Genomics* 15:1151. doi: 10.1186/1471-2164-15-1151
- Choi, J., Park, J., Kim, D., Jung, K., Kang, S., and Lee, Y.-H. (2010). Fungal secretome database: integrated platform for annotation of fungal secretomes. *BMC Genomics* 11:105. doi: 10.1186/1471-2164-11-105
- de Jonge, R., Bolton, M. D., and Thomma, B. P. H. J. (2011). How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 400–406. doi: 10.1016/j.pbi.2011.03.005
- de Novais, C. B., Borges, W. L., Jesus, E. D. C., Júnior, O. J. S., and Siqueira, J. O. (2014). Inter- and intraspecific functional variability of tropical arbuscular mycorrhizal fungi isolates colonizing corn plants. *Appl. Soil Ecol.* 76, 78–86. doi: 10.1016/j.apsoil.2013.12.010
- Dutheil, J. Y., Mannhaupt, G., Schweizer, G., Sieber, C. M., Münsterkötter, M., Güldener, U., et al. (2016). A tale of genome compartmentalization: the evolution of virulence clusters in smut fungi. *Genome Biol. Evol.* 8, 681–704. doi: 10.1093/gbe/evw026
- Elleuche, S., and Poggeler, S. (2010). Carbonic anhydrases in fungi. *Microbiology* 156, 23–29. doi: 10.1099/mic.0.032581-0
- Ellis, J. G., Rafiqi, M., Gan, P., Chakrabarti, A., and Dodds, P. N. (2009). Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 399–405. doi: 10.1016/j.pbi.2009.05.004
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Protoc.* 2, 953–971. doi: 10.1038/nprot.2007.131
- Ene, I. V., Walker, L. A., Schiavone, M., Lee, K. K., Martin-yken, H., and Dague, E. (2015). Cell wall remodeling enzymes modulate fungal cell wall elasticity and osmotic stress resistance. *MBio* 6, 1–15. doi: 10.1128/mbio.00986-15
- Fernandez, J., Marroquin-Guzman, M., and Wilson, R. A. (2014). Mechanisms of nutrient acquisition and utilization during fungal infections of leaves. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 155–174. doi: 10.1146/annurev-phyto-102313-050135
- Finn, R. D., Miller, B. L., Clements, J., and Bateman, A. (2014). IPfam: a database of protein family and domain interactions found in the protein data bank. *Nucleic Acids Res.* 42, 364–373. doi: 10.1093/nar/gkt1210

- Fonseca, H. M., Berbara, R. L. L., and Pereira, M. L. (2006). *Lumularia cruciata*, a potential *in vitro* host for *Glomus proliferum* and *G intraradices*. *Mycorrhiza* 16, 503–508. doi: 10.1007/s00572-006-0061-x
- Galán, J. E., Lara-Tejero, M., Marlovits, T. C., and Wagner, S. (2014). Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 68, 415–438. doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155725
- Giovannetti, M., and Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84, 489–500. doi: 10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x
- Giraldo, M. C., and Valent, B. (2013). Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 800–814. doi: 10.1038/nrmicro3119
- Godfrey, D., Böhlenius, H., Pedersen, C., Zhang, Z., Emmersen, J., and Thordal-Christensen, H. (2010). Powdery mildew fungal effector candidates share N-terminal Y/F/WxC-motif. *BMC Genomics* 11:317. doi: 10.1186/1471-2164-11-317
- Götz, R., Gnann, A., and Zimmermann, F. K. (1999). Deletion of the carbonic anhydrase-like gene NCE103 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* causes an oxygen-sensitive growth defect. *Yeast* 15, 855–864. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199907)15:10A<855::AID-YEA425>3.0.CO;2-C
- Gouy, M., Guindon, S., and Gascuel, O. (2010). Seaview version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27, 221–224. doi: 10.1093/molbev/msp259
- Haas, B. J., Kamoun, S., Zody, M. C., Jiang, R. H., Handsaker, R. E., Cano, L. M., et al. (2009). Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* 461, 393–398. doi: 10.1038/nature08358
- Hara, M., Fujinaga, M., and Kuboi, T. (2005). Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. *J. Exp. Bot.* 56, 2695–2703. doi: 10.1093/jxb/eri262
- Heard, S., Brown, N. A., and Hammond-Kosack, K. (2015). An interspecies comparative analysis of the predicted secretomes of the necrotrophic plant pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS ONE* 10:e0130534. doi: 10.1371/journal.pone.0130534
- Hijazi, M., Roujol, D., Nguyen-Kim, H., Del Rocio Cisneros Castillo, L., Saland, E., Jamet, E., et al. (2014). Arabinogalactan protein 31 (AGP31), a putative network-forming protein in *Arabidopsis thaliana* cell walls? *Ann. Bot.* 31, 1087–1097. doi: 10.1093/aob/mcu038
- Hong, J. J., Park, Y.-S., Bravo, A., Bhattarai, K. K., Daniels, D. A., and Harrison, M. J. (2012). Diversity of morphology and function in arbuscular mycorrhizal symbioses in *Brachypodium distachyon*. *Planta* 236, 851–865. doi: 10.1007/s00425-012-1677-z
- Jansa, J., Mozafar, A., Anken, T., Ruh, R., Sanders, I. R., and Frossard, E. (2002). Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza* 12, 225–234. doi: 10.1007/s00572-002-0163-z
- Jashni, M. K., Mehrahi, R., Collemare, J., Mesarich, C. H., and de Wit, P. J. (2015). The battle in the apoplast: further insights into the roles of proteases and their inhibitors in plant-pathogen interactions. *Front. Plant Sci.* 6:584. doi: 10.3389/fpls.2015.00584
- Joneson, S., Stajich, J. E., Shiu, S. H., and Rosenblum, E. B. (2011). Genomic transition to pathogenicity in chytrid fungi. *PLoS Pathog.* 7:e1002338. doi: 10.1371/journal.ppat.1002338
- Jorda, J., and Kajava, A. V. (2009). T-REKS: identification of Tandem REpeats in sequences with a K-meanS based algorithm. *Bioinformatics* 25, 2632–2638. doi: 10.1093/bioinformatics/btp482
- Käll, L., Krogh, A., and Sonnhammer, E. L. (2004). A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J. Mol. Biol.* 338, 1027–1036. doi: 10.1016/j.jmb.2004.03.016
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., and Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30, 3059–3066. doi: 10.1093/nar/gkf436
- Kemen, E., Gardiner, A., Schultz-Larsen, T., Kemen, A. C., Balmuth, A. L., Robert-Seilaniantz, A., et al. (2011). Gene gain and loss during evolution of obligate parasitism in the white rust pathogen of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol.* 9:e1001094. doi: 10.1371/journal.pbio.1001094
- Kim, K.-T., Jeon, J., Choi, J., Cheong, K., Song, H., Choi, G., et al. (2016). Kingdom-Wide analysis of fungal Small Secreted Proteins (SSPs) reveals their potential role in host association. *Front. Plant Sci.* 7:186. doi: 10.3389/fpls.2016.00186
- Kloppholz, S., Kuhn, H., and Requena, N. (2011). A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Curr. Biol.* 21, 1204–1209. doi: 10.1016/j.cub.2011.06.044
- Koeck, M., Hardham, A. R., and Dodds, P. N. (2011). The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. *Cell. Microbiol.* 13, 1849–1857. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01665.x
- Krijger, J.-J., Thon, M. R., Deising, H. B., and Wiersel, S. G. R. (2014). Compositions of fungal secretomes indicate a greater impact of phylogenetic history than lifestyle adaptation. *BMC Genomics* 15:722. doi: 10.1186/1471-2164-15-722
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., and Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305, 567–580. doi: 10.1006/jmbi.2000.4315
- Lévesque, C. A., Brouwer, H., Cano, L., Hamilton, J. P., Holt, C., Huitema, E., et al. (2010). Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. *Genome Biol.* 11:R73. doi: 10.1186/gb-2010-11-7-r73
- Ligrone, R., Carafa, A., Lumini, E., Bianciotto, V., Bonfante, P., and Duckett, J. G. (2007). Glomeromycete associations in liverworts: a molecular, cellular, and taxonomic analysis. *Am. J. Bot.* 94, 1756–1777. doi: 10.3732/ajb.94.11.1756
- Lin, K., Limpens, E., Zhang, Z., Ivanov, S., Saunders, D. G. O., Mu, D., et al. (2014). Single nucleus genome sequencing reveals high similarity among nuclei of an endomycorrhizal fungus. *PLoS Genet.* 10:e1004078. doi: 10.1371/journal.pgen.1004078
- Louis, B., Waikhom, S. D., Roy, P., Bhardwaj, P. K., Singh, M. W., Goyari, S., et al. (2014). Secretome weaponries of *Cochliobolus lunatus* interacting with potato leaf at different temperature regimes reveal a CL[xxxx]LHM - motif. *BMC Genomics* 15:213. doi: 10.1186/1471-2164-15-213
- Lum, G., and Min, X. J. (2011). FunSecKB: the fungal secretome knowledgebase. *Database* 2011, 1–10. doi: 10.1093/database/bar001
- Marschner, H., and Dell, B. (1994). Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil* 159, 89–102. doi: 10.1007/BF00000098
- Martin, F., Aerts, A., Ahrén, D., Brun, A., Danchin, E. G. Jr., Duchaussoy, F., et al. (2008). The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* 452, 88–92. doi: 10.1038/nature06556
- Martin, F., Kohler, A., Murat, C., Balestrini, R., Coutinho, P. M., Jaillon, O., et al. (2010). Perigord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* 464, 1033–1038. doi: 10.1038/nature08867
- Meinken, J., Asch, D. K., Neizer-ashun, K. A., Chang, G., Cooper, C. R. Jr., and Min, J. (2014). FunSecKB2: a fungal protein subcellular location knowledgebase. *Comput. Mol. Biol.* 4, 1–17. doi: 10.5376/cmb.2014.04.0007
- Mensah, J. A., Koch, A. M., Antunes, P. M., Kiers, E. T., Hart, M., and Bücking, H. (2015). High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi is associated with differences in phosphate and nitrogen uptake and fungal phosphate metabolism. *Mycorrhiza* 25, 533–546. doi: 10.1007/s00572-015-0631-x
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., and Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* 5, 621–628. doi: 10.1038/nmeth.1226
- Mueller, O., Kahmann, R., Aguilar, G., Trejo-Aguilar, B., Wu, A., and de Vries, R. P. (2008). The secretome of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genet. Biol.* 45, S63–S70. doi: 10.1016/j.fgb.2008.03.012
- Nguyen Ba, A. N., Pogoutse, A., Provart, N., and Moses, A. M. (2009). NLStradamus: a simple hidden markov model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics* 10:202. doi: 10.1186/1471-2105-10-202
- Nicastro, G., Orsomando, G., Ferrari, E., Manconi, L., Desario, F., Amici, A., et al. (2009). Solution structure of the phytotoxic protein PcF: the first characterized member of the *Phytophthora* PcF toxin family. *Protein Sci.* 18, 1786–1791. doi: 10.1002/pro.168
- Okazaki, S., Kaneko, T., Sato, S., and Saeki, K. (2013). Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 17131–17136. doi: 10.1073/pnas.1302360110
- Öpik, M., Moora, M., Liira, J., and Zobel, M. (2006). Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *J. Ecol.* 94, 778–790. doi: 10.1111/j.1365-2745.2006.01136.x
- Öpik, M., Vanatoa, A., Vanatoa, E., Moora, M., Davison, J., Kalwij, J. M., et al. (2010). The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytol.* 188, 223–241. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03334.x

- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 763–775. doi: 10.1038/nrmicro1987
- Pellegrin, C., Morin, E., Martin, F. M., and Veneault-Fourrey, C. (2015). Comparative analysis of secretomes from ectomycorrhizal fungi with an emphasis on small-secreted proteins. *Front. Microbiol.* 6:1278. doi: 10.3389/fmicb.2015.01278
- Petre, B., Joly, D. L., and Duplessis, S. (2014). Effector proteins of rust fungi. *Front. Plant Sci.* 5:416. doi: 10.3389/fpls.2014.00416
- Plett, J. M., Kempainen, M., Kale, S. D., Kohler, A., Legué, V., Brun, A., et al. (2011). A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Curr. Biol.* 21, 1197–1203. doi: 10.1016/j.cub.2011.05.033
- Plett, J. M., and Martin, F. (2015). Reconsidering mutualistic plant–fungal interactions through the lens of effector biology. *Curr. Opin. Plant Biol.* 26, 45–50. doi: 10.1016/j.pbi.2015.06.001
- Poloni, A., and Schirawski, J. (2015). Host specificity in *Sporisorium reilianum* is determined by distinct mechanisms in maize and sorghum. *Mol. Plant Pathol.* 17, 741–754. doi: 10.1111/mpp.12326
- Reski, R., and Abel, W. O. (1985). Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. *Planta* 165, 354–358. doi: 10.1007/BF00392232
- Rovenich, H., Boshoven, J. C., and Thomma, B. P. (2014). Filamentous pathogen effector functions: of pathogens, hosts and microbiomes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 20, 96–103. doi: 10.1016/j.pbi.2014.05.001
- Russell, J., and Bulman, S. (2005). The liverwort *Marchantia foliacea* forms a specialized symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi in the genus *Glomus*. *New Phytol.* 165, 567–579. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01251.x
- Salvioli, A., Ghignone, S., Novero, M., Navazio, L., Venice, F., Bagnaresi, P., et al. (2015). Symbiosis with an endobacterium increases the fitness of a mycorrhizal fungus, raising its bioenergetic potential. *ISME J.* 10, 1–15. doi: 10.1038/ismej.2015.91
- Saunders, D. G., Win, J., Cano, L. M., Szabo, L. J., Kamoun, S., and Raffaele, S. (2012). Using hierarchical clustering of secreted protein families to classify and rank candidate effectors of rust fungi. *PLoS ONE* 7:e29847. doi: 10.1371/journal.pone.0029847
- Schirawski, J., Mannhaupt, G., Münch, K., Brefort, T., Schipper, K., Doehlemann, G., et al. (2010). Pathogenicity determinants in smut fungi revealed by genome comparison. *Science* 330, 1546–1548. doi: 10.1126/science.1195330
- Schneider, R., and Di Pietro, A. (2013). The CAP protein superfamily, function in sterol export and fungal virulence. *Biomol. Concepts* 4, 519–525. doi: 10.1515/bmc-2013-0021
- Schüßler, A., Schwarzott, D., and Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* 105, 1413–1421. doi: 10.1017/S0953756201005196
- Sędziewska Toro, K., and Brachmann, A. (2016). The effector candidate repertoire of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus*. *BMC Genomics* 17:101. doi: 10.1186/s12864-016-2422-y
- Smith, S. E., and Read, D. J. (2010). *Mycorrhizal Symbiosis*. New York, NY: Academic press.
- Smith, S. E., Smith, F. A., and Jakobsen, I. (2003). Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiol.* 133, 16–20. doi: 10.1104/pp.103.024380
- Sperschneider, J., Gardiner, D. M., Taylor, J. M., Hane, J. K., Singh, K. B., and Manners, J. M. (2013). A comparative hidden Markov model analysis pipeline identifies proteins characteristic of cereal-infecting fungi. *BMC Genomics* 14:807. doi: 10.1186/1471-2164-14-807
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M., and Fortin, J. A. (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. *Mycol. Res.* 100, 328–332. doi: 10.1016/S0953-7562(96)80164-X
- Sýkorová, Z., Ineichen, K., Wiemken, A., and Redecker, D. (2007). The cultivation bias: different communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in roots from the field, from bait plants transplanted to the field, and from a greenhouse trap experiment. *Mycorrhiza* 18, 1–14. doi: 10.1007/s00572-007-0147-0
- Tang, N., San Clemente, H., Roy, S., Bécard, G., Zhao, B., and Roux, C. (2016). A survey of the gene repertoire of *Gigaspora rosea* unravels conserved features among Glomeromycota for obligate biotrophy. *Front. Microbiol.* 7:233. doi: 10.3389/fmicb.2016.00233
- Teertstra, W. R., van der Velden, G. J., de Jong, J. F., Kruijtzter, J. A., Liskamp, R. M., Kroon-Batenburg, L. M., et al. (2009). The filament-specific Rep1-1 repellent of the phytopathogen *Ustilago maydis* forms functional surface-active amyloid-like fibrils. *J. Biol. Chem.* 284, 9153–9159. doi: 10.1074/jbc.M900095200
- Thorley, R. M. S., Taylor, L. L., Banwart, S. A., Leake, J. R., and Beerling, D. J. (2015). The role of forest trees and their mycorrhizal fungi in carbonate rock weathering and its significance for global carbon cycling. *Plant Cell Environ.* 38, 1947–1961. doi: 10.1111/pce.12444
- Thorner, J. (1981). Pheromonal regulation of development in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harb. Monogr. Arch.* 11, 143–180.
- Tisserant, E., Kohler, A., Dozolme-Seddas, P., Balestrini, R., Benabdellah, K., Colard, A., et al. (2012). The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytol.* 193, 755–769. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03948.x
- Tisserant, E., Malbreil, M., Kuo, A., Kohler, A., Symeonidi, A., Balestrini, R., et al. (2013). Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 20117–20122. doi: 10.1073/pnas.1313452110
- Tsuzuki, S., Handa, Y., Takeda, N., and Kawaguchi, M. (2016). Strigolactone-induced putative secreted protein 1 is required for the establishment of symbiosis by the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 29, 1–59. doi: 10.1094/MPMI-10-15-0234-R
- Wang, B., and Qiu, Y. L. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16, 299–363. doi: 10.1007/s00572-005-0033-6
- Whisson, S. C., Boevink, P. C., Moleleki, L., Avrova, A. O., Morales, J. G., Gilroy, E. M., et al. (2007). A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* 450, 115–118. doi: 10.1038/nature06203
- Whittaker, M. M., Kersten, P. J., Cullen, D., and Whittaker, J. W. (1999). Identification of catalytic residues in glyoxal oxidase by targeted mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 274, 36226–36232. doi: 10.1074/jbc.274.51.36226
- Wright, D. P., Read, D. J., and Scholes, J. D. (1998). Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant Cell Environ.* 21, 881–891. doi: 10.1046/j.1365-3040.1998.00351.x
- Wu, T. D., and Watanabe, C. K. (2005). GMAP: a genomic mapping and alignment program for mRNA and EST sequences. *Bioinformatics* 21, 1859–1875. doi: 10.1093/bioinformatics/bti310
- Wu, Y., and Zhou, J. M. (2013). Receptor-like kinases in plant innate immunity. *J. Integr. Plant Biol.* 55, 1271–1286. doi: 10.1111/jipb.12123
- Yasuda, M., Miwa, H., Masuda, S., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., and Okazaki, S. (2016). Effector-triggered immunity determines host genotype-specific incompatibility in legume–rhizobium symbiosis. *Plant Cell Physiol.* 57, 1791–1800. doi: 10.1093/pcp/pcw104
- Yoshida, K., Saitoh, H., Fujisawa, S., Kanzaki, H., Matsumura, H., Yoshida, K., et al. (2009). Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell* 21, 1573–1591. doi: 10.1105/tpc.109.066324
- Yu, Y., Xiao, J., Zhu, W., Yang, Y., Mei, J., and Bi, C. (2016). Ss-Rhs1, a secretory Rhs repeat-containing protein, is required for the virulence of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mol. Plant Pathol.* 4–41. doi: 10.1111/mpp.12459
- Zuccaro, A., Lahrmann, U., Güldener, U., Langen, G., Pfiff, S., Biedenkopf, D., et al. (2011). Endophytic life strategies decoded by genome and transcriptome analyses of the mutualistic root symbiont *Piriformospora indica*. *PLoS Pathog* 7:e1002290. doi: 10.1371/journal.ppat.1002290

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Kamel, Tang, Malbreil, San Clemente, Le Marquer, Roux and Freidit Frey. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

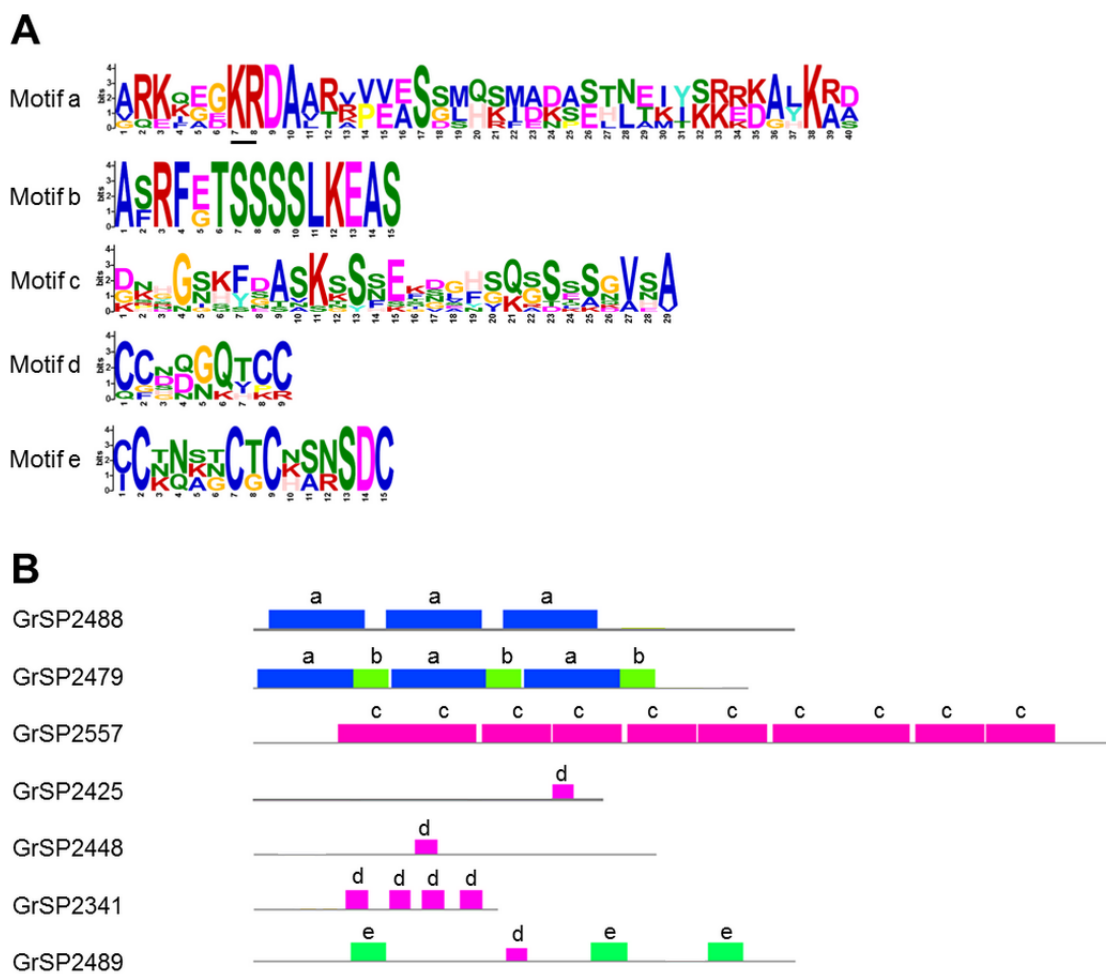
Stage	 Pre-symbiotic stage		 Symbiotic stage				
Fungal sample	Germinating spores		Intraradical mycelium (IRM)			Extraradical mycelium (ERM)	
Treatment or host	<i>in vitro</i> germinated spores + GR24	Germinating hyphae exposed to <i>Daucus carota</i> exudates	<i>Lunularia cruciata</i> mycorrhized thalus	<i>Brachypodium distachyon</i> mycorrhized roots	<i>Medicago truncatula</i> mycorrhized roots	<i>Daucus carota</i> extraradical mycelium	
Control for Fold Change calculation	<i>in vitro</i> germinated spores	Germinating hyphae exposed to mock treatment	<i>in vitro</i> germinated spores				
<i>Rhizophagus irregularis</i>	Upregulated genes	10	22	60	59	52	56
	Downregulated genes	5	8	157	250	235	131
<i>Gigaspora rosea</i>	Upregulated genes	18	78	not performed	134	122	11
	Downregulated genes	33	73		388	329	178

**Figure S1: Overall presentation of the different biological conditions prepared for RNAseq comparisons.** *G. rosea* and *R. irregularis* were both cultivated alone or in symbiosis with different hosts. Germinated spores *in vitro* (asymbiotic stage) were used as reference for all comparisons. See material and methods for details. FC: fold change.

Motif representation	Motif number	Motif sequence
	1	A P T P N T G I E L N <u>K R D E S P S S Y Y Y D D K K K E</u>
	2	<u>P K D D Y Y</u>
	3	<u>K K D D Y Y P K</u>
	4	<u>K Y T R R D A L A S P D D T Y N D D Y Y K D D Y K N E Y Y Y E K D D K D D Y</u>
	5	<u>K D D Y Y G G K D D K D D D K K K S S K R S A L A S</u>
	6	<u>P E A Y G</u>
	7	<u>K R D A E</u>
	8	<u>K R Q E E</u>
	9	<u>N W K R G P I S R V E S X</u>
	10	<u>S R Q A N K C P Y G Y W C Y D Y G G C C</u>
	11	<u>D P E K E</u>
	12	<u>V E K P S S</u>
	13	<u>R S Y P I A</u>
	14	<u>D D Y D M K</u>
	15	<u>G N N G N N</u>
	16	<u>P E P S G K</u>
	17	<u>S A V A E E K D Y K D E K D S Y D Y Y P D S Y D G K D K Y D D E Y G Y D D K K R D</u>
	18	<u>V R L K K Y F V N L C</u>
	19	<u>V N L S D N Y L C N H</u>
	20	<u>F D C N T L Y E G Q V P Y T R Y D N Y D P N F S P G E Y G L E M T V Y A C F Y L Q D E T Y C</u>
	21	<u>A N P Y L T A K V M G S L R K T K Y R G</u>
	22	<u>E G F N S T C E N N G G T Y L M W Q</u>

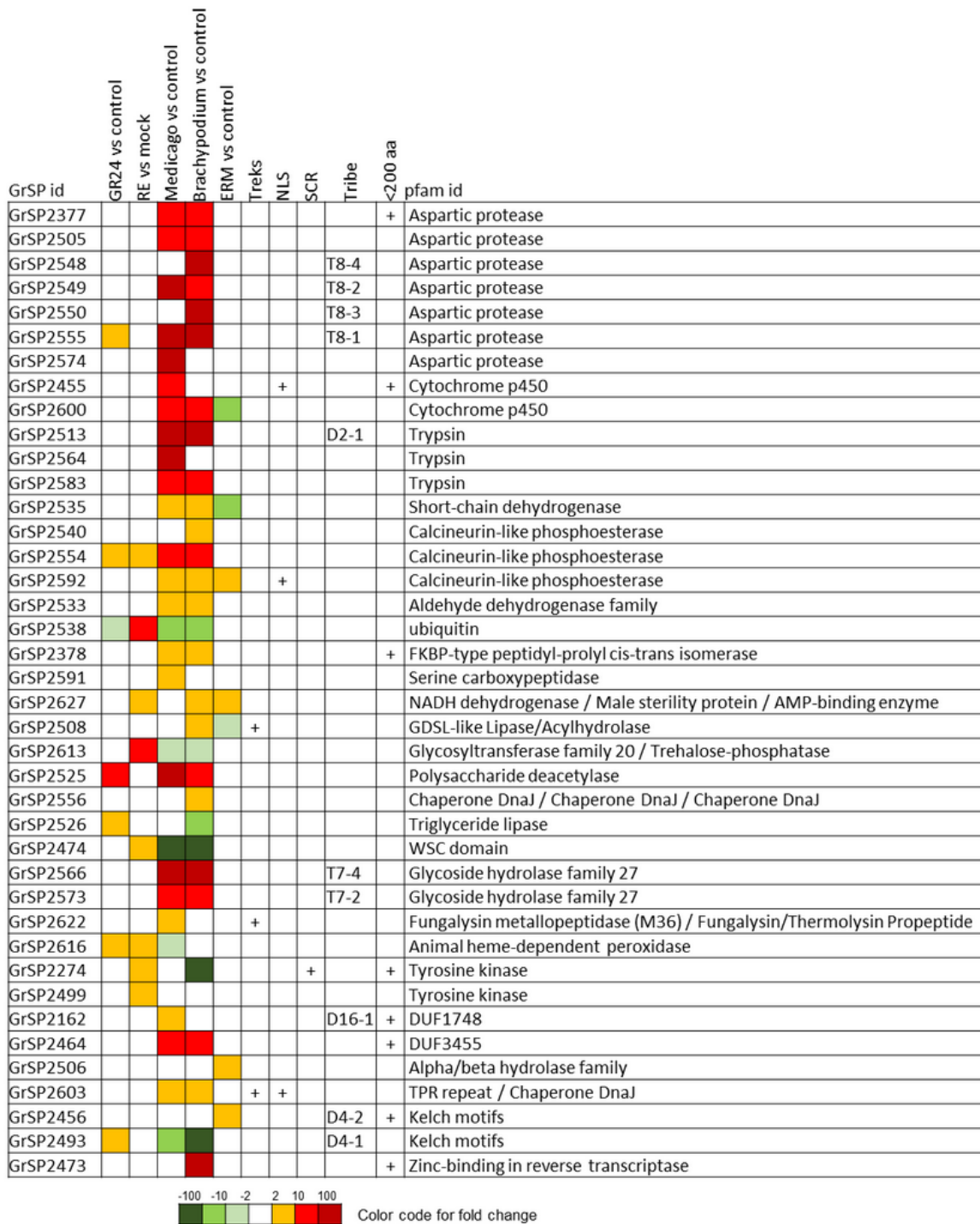
**Figure S2:** List of the motifs identified by the MEME discovery tool and presented in **Figure 4**. Boxes indicate putative KEX2 cleavage sites ([KR]R). A non canonical cleavage site is underlined in Motif 9.





**Figure S4: Protein structures (A) of GrSPs displaying motifs of unknown function (B). A putative KEX2 cleavage site is underlined in motif « a ».**





**Figure S5: GrSPs with a PFAM domain up-regulated in at least one comparison.** RE: root exudates, ERM: Extra-Radical Mycelium, NLS: Nuclear Localization Signal, SCR: Small Cysteine Rich.

**Table S1: Sequences, structural features and expression of *R. irregularis* gene-encoding secreted proteins.** **A:** Overall quality of RNAseq libraries from *R. irregularis* in culture or in symbiotic tissues. Triplicate variability (figure) was analysed by principal component analysis with CLC Genomic Workbench. For each replicates, the correlation matrix ('normalized' version of the covariance matrix) was calculated to define the orthogonal eigenvectors of the first and second major principal components, showing a simplified version of the variability of data. **B:** RNAseq raw expression data of the 872 RiSPs obtained from Illumina Hiseq2000 sequencing (2 x 101 bp). Calculations were performed using CLC Genomics Workbench 9.0 software (see methods). Control = *in vitro* germinated spores (except for root exudates assays: control = spores produced in same condition but without root exudates). **C:** List of the 872 RiSPs, their structural features and expression level in different comparisons. Column A refers to the best gene models that were identified by comparing Gloin1 and Rir gene models by GMAP. GeneID listed in Column B refers to the non-selected SP sequences (if present in the other assembly) that have similarity with the best SP gene model in column A; GeneID in bold type in column B refer to sequences that are strictly similar (identity and length) to corresponding sequence in Column A. RiSP name in column C corresponds to the nomenclature used in the present manuscript. Columns D to R list the sequence features. MEME motifs are described by their number (Figure 4) and their occurrence (value within brackets). Expression data are listed in column T to Y. Only statistically validated fold change values ( $FDR \leq 0.05$ ) are presented (see S1B for global expression data). Best orthologs with sequence of *R. clarus* are listed in columns Z and AA, and with sequences of *G. rosea* in column AB. Gene id for *L. bicolor*, *T. melanosporum* and *P. indica* are annotated with their JGI gene number, preceded by "Lb", "Tm" and "Pi" respectively. **D:** List, expression and structural features of the 33 RiSPs overexpressed in the three tested hosts. Only statistically robust data are listed (fold discovery rate -  $FDR \leq 0.05$ ). **E:** List, expression and structural features of the 28 RiSPs up-regulated in a single host. Only statistically robust data (fold discovery rate -  $FDR \leq 0.05$ ) are listed. RE: Root Exudates, ERM: Extra-Radical Mycelium, FDR: False Discovery Rate; NLS: Nuclear Localization Signal, PFAM: Protein Family, SCR: Small Cysteine Rich, SP: Signal Peptide.

**Table S2: Enriched PFAM domains in *R. irregularis* secretome.** Domains present in at least 3 proteins are depicted. Enrichment was determined through frequency comparison against the whole proteome. *P*-value calculation for statistical enrichment was calculated with a Chi-square test and a Bonferroni correction.

**Table S3: PFAM domains enriched in up-regulated RiSPs.** Only PFAM domains present in at least 3 proteins were selected. Enrichment was calculated against the whole proteome. *P*-value calculation for statistical enrichment was calculated with a Chi-square test and a Bonferroni correction.

**Table S4: Known effector motifs search through *R. irregularis* secretome.** Occurrence of the different motifs is indicated, after allowing 0 or 1 amino acid mismatch. *P* value calculation for statistical enrichment against non secreted proteins was calculated with a Chi-square test and a Bonferroni correction. Reference for each motif is indicated in the text.

**Table S5: Sequences, structural features and expression of *G. rosea* gene-encoding secreted proteins.** **A:** Overall quality of RNAseq libraires from *G. rosea* in culture or in symbiotic tissues. Triplicate variability (figure) was analysed by principal component analysis by using CLC Genomic Workbench. For each replicates, the correlation matrix ('normalized' version of the covariance matrix) was calculated to define the orthogonal eigenvectors of the first and second major principal components, showing a simplified version of the variability of data. **B:** RNAseq raw expression data of the 2633 GrSPs obtained from Illumina Hiseq2000

sequencing (2 x 101 bp) and Miseq1000 sequencing (2 x 151 bp). Calculations were performed using CLC Genomics Workbench 9.0 software (Control = *in vitro* germinated spores, except root exudate assays: mock = spores produced in same condition but without root exudates). **C:** List of the 2633 GrSPs, structural features and expression level in different comparisons. “Gr id” refers to number of contig as defined in Tang *et al.*, (2016). Columns C to O list the sequence features. MEME motifs are described by their number (Figure 4) and their occurrence (value within brackets). Expression data are listed in column P to T. Only fold change values statistically validated (fold discovery rate - FDR < 0.05) are presented (see Table S5B for global expression data). Best orthologs with sequence of RiSPs are listed in column V. Putative isoforms are depicted with superscripts number in "Gr id" column, see footnotes. **D:** List, expression and structural features of the 289 GrSPs up-regulated in at least one symbiotic condition. Only statistically robust data (FDR  $\leq$  0.05) are listed. **E:** List, expression and structural features of the 53 GrSPs up-regulated in the two tested hosts. Only statistically robust data (FDR  $\leq$  0.05) are listed. **F:** List, expression and structural features of the 150 GrSPs up-regulated in single host. Only statistically robust data (FDR  $\leq$  0.05) are listed. RE: Root Exudates, ERM: Extra-Radical Mycelium, FDR: False Discovery Rate, NLS: Nuclear Localization Signal, PFAM: Protein Family, SCR: Small Cysteine Rich, SP: Signal Peptide.

## 5.1-Pour aller plus loin

Notre étude a porté sur les répertoires de gènes et les patrons d'expression des secrétomes de deux espèces de champignons MA phylogénétiquement éloignés. Ces analyses soulignent que les effectifs de SP sont de même ordre de grandeur que ceux trouvés chez d'autres champignons interagissant avec un hôte. En effet, la moyenne de la part représentative du secrétome est de 7,4% en ce qui concerne les pathogènes de plantes, 4,7% pour les pathogènes d'animaux et 5,3% pour les organismes non pathogènes (Lin *et al.*, 2014). A titre de comparaison et au niveau du simple effectif, ce sont entre 815 et 854 SPs qui sont retrouvés chez le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor* (Vincent *et al.*, 2012; Pellegrin *et al.*, 2015), et 248 et 1184 respectivement chez les champignons pathogènes biotrophes *Blumeria graminis* et *Melampsora larici-populina* (Spanu *et al.*, 2010; Duplessis *et al.*, 2011), ce dernier ayant 2 plantes hôtes durant son cycle (le mélèze et le peuplier)

Les champignons MA étant considérés comme n'ayant pas de spectre d'hôte, il aurait pu être supposé que ces espèces présentent une très grande batterie de SPs. Nous nous sommes aussi demandés si parmi cet arsenal somme toute restreint de SPs, ces champignons ne possèderaient pas des « clés universelles » leur permettant d'interagir avec 80% des espèces de plantes, clefs qui auraient pu être partagées par l'ensemble des Gloméromycètes en raison de leur longue coévolution avec la lignée verte d'une part et de la conservation des processus d'infection et de colonisation.

Ce travail a permis de mettre en évidence que les Gloméromycètes n'ont pas de secrétome plus important que d'autres champignons, qu'il n'existerait pas d'effecteurs universels conservés, du moins du point de vue de la séquence primaire des petits effecteurs. On peut donc se demander quels seraient les déterminants pouvant justifier le spectre d'hôte très large des CMAs, bien qu'il y ait des différences entre Glomérales et Diversisporales observées dans cette étude. Une explication serait à chercher dans le fait qu'outre des effecteurs pouvant être important dans les processus symbiotiques, d'autres acteurs pourraient être impliqués. Les champignons MA présentent de nombreux traits communs pouvant expliquer ce spectre d'hôte très large : une quasi absence de glycosyl hydrolases, une limitation des polycétide synthase impliquées dans la synthèse de phytotoxines (aucune retrouvée chez *R. irregularis* et 3 retrouvées chez *G. rosea*) et autres processus limitant les MAMPs/DAMPs

pouvant intervenir dans l'adaptation aux différentes plantes hôtes en limitant l'induction de réactions de défenses (Tisserant *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2016). Pour simplifier, la capacité à coloniser plusieurs hôtes pourrait être la résultante à la fois d'une perte de caractères apparentés à des pathogènes, et de la présence de protéines spécialisées favorisant l'interaction avec l'hôte.

## 6-Génération d'une liste restreinte de candidats pour étude

Au vu des effectifs des SPs et de la grande diversité existante tant au niveau de la taille de ces protéines que de leurs fonctions prédites, il était nécessaire d'affiner la liste des candidats à analyser sur le plan fonctionnel. Un premier crible a été de ne cibler que les SPs fortement surexprimées *in planta*. Il s'agit en effet d'un angle d'étude, car il est tout à fait envisageable que des protéines fortement exprimées dans le mycelium extra-racinaire aient un rôle important dans l'établissement des processus symbiotiques précoces avec l'hôte. Le deuxième crible a été de ne choisir que des candidats surexprimés dans les 3 hôtes testés. Ces travaux de thèse s'effectuant dans le cadre d'une convention CIFRE, ce critère avait pour motivation de cibler des candidats pouvant être appliqués au champ quelles que soient les espèces végétales cultivées. Outre cet objectif d'expression, une utilisation agronomique implique de favoriser tant que possible les SPs de petite taille (plus facile et moins onéreux à produire), même si nous n'avons pas limité notre choix à ce seul critère.

**Ainsi, nous avons cherché des gènes codant pour des SPs présentant les meilleures inductions d'expression en condition symbiotique dans la plupart des hôtes, si possible de petite taille, et dont certains pourraient coder pour des effecteurs de la symbiose** tels que précédemment décrits (Kloppholz *et al.*, 2011; Plett *et al.*, 2011).

La constitution de cette liste est intervenue en début de thèse, courant 2014, date à laquelle seul l'assemblage Gloin1 était publié. Je disposais aussi à cette époque d'un assemblage transcriptomique propre à l'équipe (UnigeneV3), qui m'a permis de compléter ma liste par des candidats non répertoriés dans les données publiques.

## 6.1-UnigeneV3 : un assemblage transcriptomique « maison »

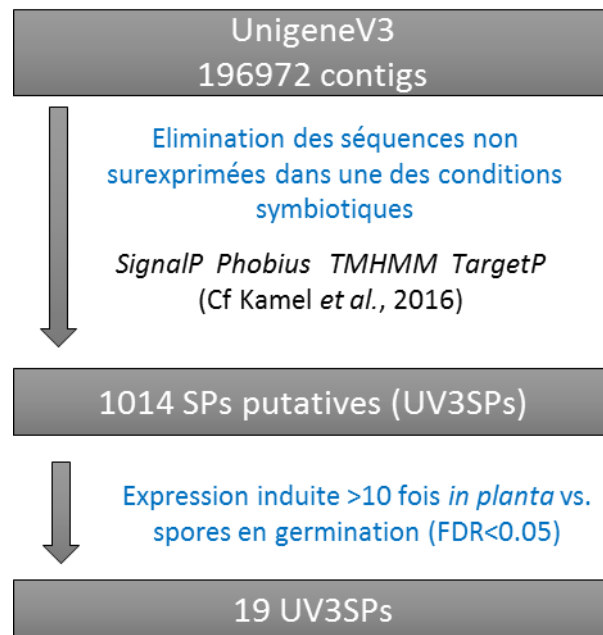
Cet assemblage a été généré sans seuil limite de taille à partir de banques RNAseq provenant du champignon dans différentes conditions biologiques. Ces conditions, au nombre de cinq sont : des spores en germination en condition témoin, des spores en réponse à deux signaux végétaux (GR24 ou exsudats racinaires), le champignon en condition symbiotique *in planta* dans les trois hôtes décrits précédemment, et les hyphes extraracinaires (ERM). L'assemblage transcriptomique (nommé UnigeneV3) généré par Hélène San Clemente du service Bioinformatique du LRSV comporte donc un nombre bien plus important de contigs (196 972 contigs) que les assemblages publics et permet la recherche de petits peptides aussi petits que 10-15 acides aminés sans peptide signal, probablement absents des données publiques du fait de l'exclusion de ces séquences courtes lors de la génération des assemblages (**Table 2**). Cependant, cet enrichissement en séquences nouvelles n'est pas sans contrepartie, et du fait de sa fragmentation, il est également riche en transcrits incomplètement assemblés, en gènes chimériques et en divers isoformes d'un même gène comme souvent répertoriés dans les assemblages transcriptomiques issus de données Illumina Hiseq. A noter que l'utilisation de données RNAseq, certes moins abondantes mais de taille supérieure, a permis d'obtenir une qualité d'assemblage très intéressante. Par ailleurs, les gènes candidats de l'assemblage UnigeneV3 ont un caractère exclusif qui en fait un outil précieux pour définir des bons candidats pour une étude fonctionnelle dans un contexte d'étude concurrentiel.

<b>UnigeneV3</b>	
Assembleur	CLC/GICL
# modèles de gènes	196 972
longueur moyenne (pb)	520
N50 (pb)	1177
longueur minimale (pb)	51
longueur maximale (pb)	22 327
longueur totale (pb)	102 461 490

**Table 2:** Caractéristique de l'assemblage transcriptomique UnigeneV3

Du fait du nombre très important de séquences (196972) présentes dans cet assemblage, il a été préalablement décidé d'éliminer les séquences ne présentant pas une surexpression dans

au moins une des conditions symbiotique ( $FC < 2$ ) avant passage dans le même pipeline bio-informatique décrit dans la publication (cf Figure 1 dans Kamel *et al.*, 2017). Ceci a permis l'obtention de 1014 protéines sécrétées putatives (ci-après nommées UV3SPs pour les différencier de celles provenant d'autres assemblages). Ce nombre étant encore trop conséquent pour une étude fonctionnelle de candidats, il fut décidé de ne conserver que les UV3SPs les plus fortement exprimés, réduisant l'effectif à 19 UV3SPs (**Figure 13**).

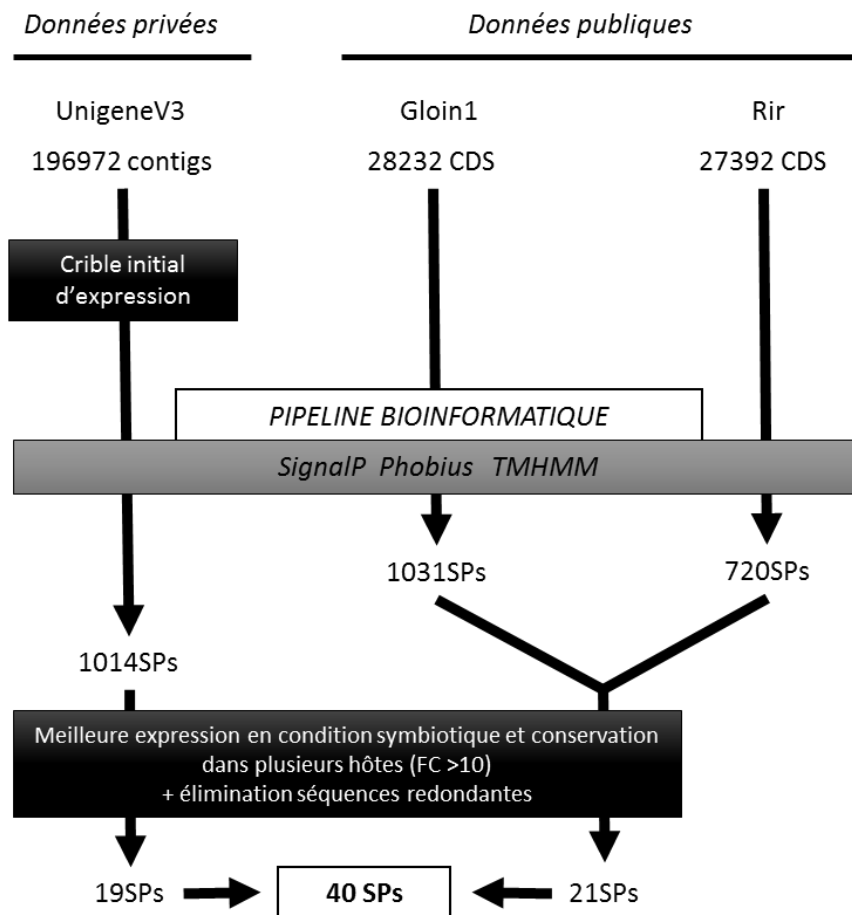


**Figure 13: Pipeline bioinformatique ayant mené à l'identification des gènes les plus exprimés dans la plupart des hôtes à partir de l'assemblage UnigeneV3.** Du fait du nombre important de contigs, un premier crible basé sur l'expression a permis d'éliminer des séquences non surexprimées dans l'une des conditions symbiotiques (*in planta* dans un des 3 hôtes, ERM). Les séquences restantes sont ensuite passées dans notre pipeline bio-informatique afin d'identifier les SPs putatives. Les SPs présentant les meilleures surexpressions ( $FC > 10$ ,  $FDR < 0,05$ ) dans au moins deux des 3 hôtes sont conservées.

## 6.2-Vers une liste plus complète

L'assemblage UnigeneV3 a principalement été utilisé pour l'identification de gènes codant pour des petites protéines sécrétées. Cependant, cet assemblage n'est pas idéal pour caractériser des protéines plus longues du fait qu'il est possible d'y trouver de nombreux gènes chimériques. Ainsi, afin d'étoffer notre liste, nous avons également utilisé les assemblages génomiques Gloin1 et Rir à notre disposition dont les modèles de gènes ont été bien caractérisés. Bien que 377 et 566 SPs furent identifiées lors de l'analyse des assemblages Gloin1 et Rir respectivement (Tisserant *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014), une analyse *de novo*

utilisant la même procédure opérée pour UnigeneV3 a été effectuée dans un souci d'uniformisation. Cette fois, ce sont 1031 SPs putatives pour Gloin1, et 720 pour Rir qui sont issus de l'analyse. Les gènes codant pour les SPs présentant la meilleure surexpression ( $FC > 10$ ,  $FDR < 0,05$ ) en condition symbiotique *in planta* dans au moins 2 hôtes ont été conservés et les séquences redondantes ont été éliminées. Ainsi, aux 19 UV3SPs ont été rajoutées 21 SPs provenant des assemblages Gloin1 et Rir (**Figure 14**).



**Figure 14: Description du processus ayant mené à l'identification de 40 SPs d'intérêt à partir des différents assemblages.** Aux 19SPs d'intérêt caractérisées à partir de l'assemblage UnigeneV3 ont été rajoutées des séquences non redondantes déterminées à partir des données publiques Gloin1 et Rir et présentant les meilleures surexpressions en condition *in planta* dans au moins 2 des 3 hôtes. Parmi ces 40 SPs, 5 sont spécifiques de l'assemblage UnigeneV3 et 2 de l'assemblage Gloin1, et 33 séquences présentent un hit (pas forcément à 100%) entre les deux ou les 3 assemblages.

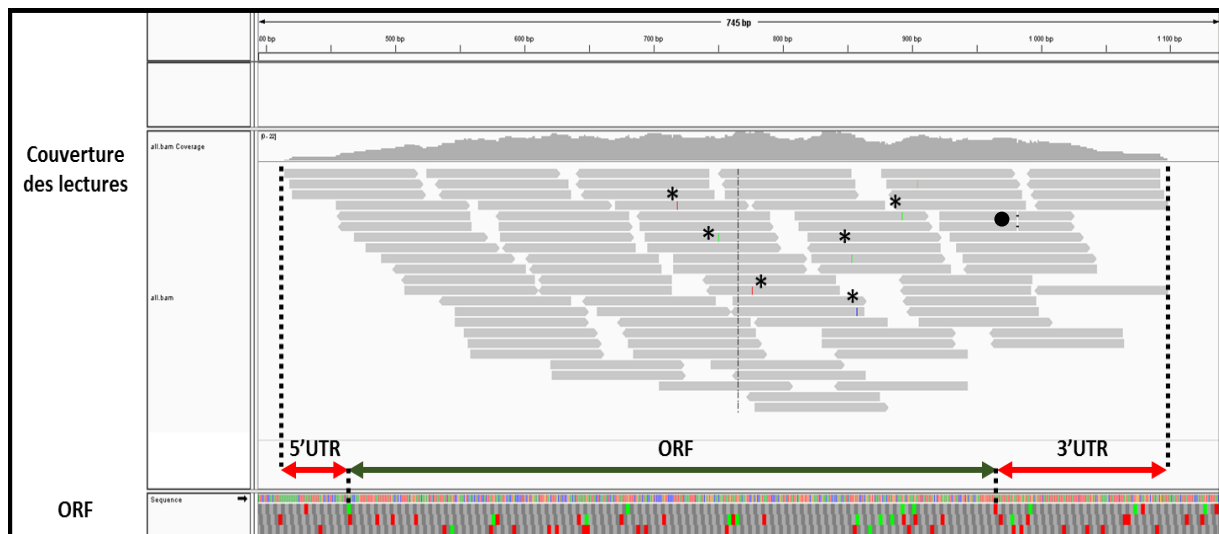
Nous disposons donc d'une liste de 40 SPs candidats provenant de 3 assemblages et dont la surexpression en condition symbiotique tend à indiquer un rôle important lors de l'établissement du processus.



Des cribles complémentaires ont été réalisés pour affiner encore cette liste :

1- Ces séquences sont-elles bien définies ?

Pour cela, les lectures des différentes banques RNAseq ont été positionnées sur l'ensemble des 40 régions génomiques correspondantes à la position des séquences codantes des RiSPs (**Figure 15**). Le recouvrement des lectures a ainsi permis de « baliser » les régions comportant les gènes exprimés et permet de valider la définition du cadre ouvert de lecture (ORF) déterminé par le pipeline informatique. De plus, la superposition des lectures sur les séquences génomiques peut également révéler des problèmes de séquençage à travers des insertions ou délétions de nucléotide au niveau de la séquence cible. Selon ces critères, j'ai choisi d'éliminer 5 candidats dont la région cible n'était pas strictement validée par les lectures RNAseq.



**Figure 15: Validation des cadres ouverts de lectures (ORF) déterminés par notre pipeline informatique à partir des séquences génomiques correspondantes (logiciel IGV).** La couverture des lectures RNAseq permet la détermination de l'ORF la plus adéquate à partir des 6 cadres de lecture. Les séquences de part et d'autres de l'ORF soutenues par les données d'expressions permettent de déterminer les régions non traduites (5' et 3'UTR). La cartographie des lectures permet de mettre en valeur d'éventuels polymorphismes nucléotidiques (SNPs) (\*) ainsi que des événements d'insertion ou délétion (●) au niveau du génome.

## 2- Nos séquences sont-elles réellement d'origine fongique?

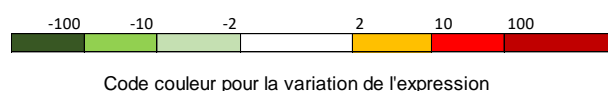
Comme expliqué plus haut, UnigeneV3 est un assemblage réalisé à partir de banques fongiques mais aussi de tissus symbiotiques, donc potentiellement contaminé malgré les filtres réalisés par des séquences ne correspondant pas à *R. irregularis* mais aux plantes hôtes. Afin de diminuer le risque d'étudier de telles séquences, j'ai cartographié les lectures de banques RNAseq issues de racines de *M. truncatula* et *B. distachyon* non inoculées (Malbreil, 2013) pour nos 40 séquences quelles que soient leurs origines (UV3, Gloin1 ou Rir). Deux séquences présentant au moins un hit pour 2 banques parmi les triplicats ont été éliminées.

## 3- Toutes ces séquences sont-elles prédites pour coder pour des protéines sécrétées ?

Au-delà de la prévision d'un peptide signal, d'autres caractéristiques peuvent inhiber la sécrétion comme la présence de domaines transmembranaires ou encore la présence d'ancres GPI. Notre pipeline bio-informatique nous a préalablement permis d'éliminer les domaines transmembranaires mais pas des séquences arborant des ancres GPI. Les logiciels de prédiction PredGPI (Pierleoni *et al.*, 2008) et FragAnchor (Poisson *et al.*, 2007) ont ainsi été utilisés dans cet objectif d'écarter de telles séquences. Une dernière vérification afin de confirmer l'adressage de ces protéines prédites dans les voies de sécrétions a été entreprise grâce à TargetP V1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2007). Ces analyses n'ont pas entraîné l'élimination de SPs.

Au final 7 séquences ont été éliminées et nous nous retrouvons ainsi avec une liste définitive de 33 candidats (**Table 3**). Les prédictions des caractéristiques et fonctions de ces protéines sont présentées en table 3 selon la même mise en forme que celle utilisée en tableau S1 de la publication (Kamel *et al.*, 2017). Dans un souci de confidentialité, ne sont pas mentionnées les provenances, ni les séquences de ces candidats.

#SP	< 200 aa (protéine active)	Domaine Pfam	T-reks	NLS	SCR	GR24 vs contrôle	RE vs témoin	Medicago truncatula vs contrôle	Brachypodium distachyon vs contrôle	Lunularia cruciata vs contrôle	ERM vs contrôle	Meilleur orthologue G. rosea (blast evalue < 10 <sup>-5</sup> )
1	+											
2	+											
3	+				+							+
4	+											
5	+				+							
6	+				+							
7	+				+							
8	+				+							
9	+			+								
10	+				+							
11	+			+	+							
12	+				+							
13	+				+							
14	+				+							
15	+				+							+
16	+				+							+
17	+				+							+
18	+				+							+
19	+				+							
20	+											
21	+		+									
22	+											+
23			+	+								+
24												
25		SMP-30/Gluconolactonase/LRE-like region										
26		Polysaccharide deacetylase	+									+
27		Aspartate protease										+
28		Polysaccharide deacetylase	+									+
29												+
30		Protease inhibitor / Subtilase family										+
31		Subtilase family										+
32												
33		Multicopper oxidase										



**Table 3:** liste des 33 SPs candidates avec leurs caractéristiques structurales et leurs niveaux d'expression associés à chacune des conditions testées.

## 7-Comparaison à de nouvelles données génomiques

Après l'établissement de cette liste, une nouvelle version d'assemblage génomique de *R. irregularis* DAOM197198 et le séquençage d'autres souches de *R. irregularis* au JGI sont venus ponctuer ma fin de thèse. Nous avons confronté les séquences des sécrétomes à ces nouveaux jeux de données.

## 7.1-Rhiir2.1

Les séquences génomiques de l'assemblage Gloin1 étant grandement fragmentées (28,371 scaffolds), de nouvelles données génomiques ont été générées (banques mate-pair 3 kb et 5 kb séquencées par chimie Illumina Hiseq2500) puis assemblées. Ce travail a été réalisé en collaboration entre le laboratoire IAM, INRA-UHP Nancy / JGI (Dr Francis Martin, Dr Claude Murat, Emmanuelle Morin) et le LRSV (Christophe Roux et Hélène San Clemente) (Données encore non publiques au stade de rédaction de cette thèse). Ce nouvel assemblage est formé de 1123 scaffolds et le pipeline d'annotation du JGI y prédit 25,930 gènes (**Table 4**).

Rhiir2.1	
taille de l'assemblage	136,81 Mbp
Profondeur de couverture par les lectures de séquençage	x50
Nombre de scaffold	1123
scaffold N50	129 kb
# contigs	5810
Répertoire de gènes	25930
# SPs prédites par notre pipeline	814

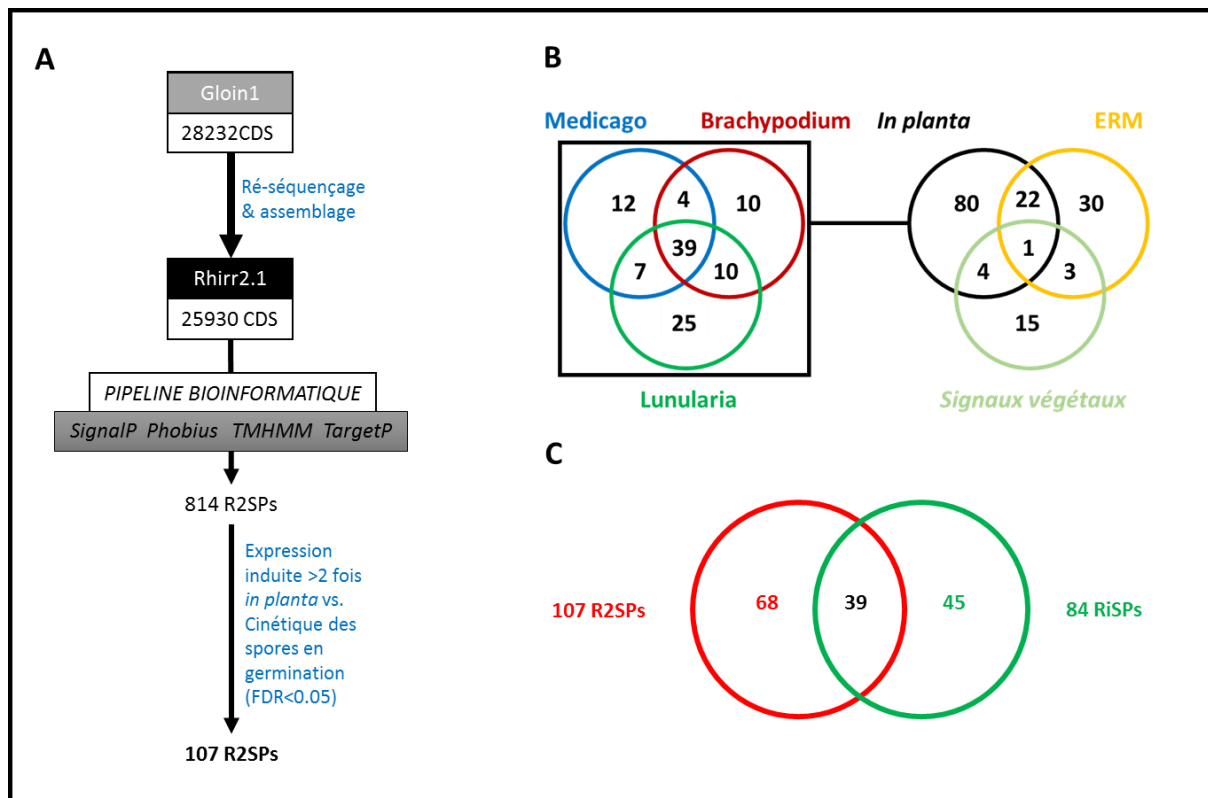
**Table 4:** Caractéristiques de l'assemblage Rhiir2.1

### 7.1.1-Comparaisons aux 872 RiSPs

Une analyse *de novo* du sécrétome à partir de cet assemblage a permis l'identification de 814 gènes codant pour des SPs (que nous nommerons R2SP par la suite) (**Figure 16-A**). Cet effectif est sensiblement proche de nos 872 RiSPs précédemment identifiées et tendrait à confirmer que notre approche utilisée en réunissant les deux jeux de données Gloin1 et Rir était pertinente. Rappelons que plusieurs petits peptides ne sont pas définis par les outils de définition des modèles de gènes. Afin d'observer le degré de redondance entre ces deux jeux de données, une analyse comparative des 814 R2SPs et 872 RiSPs a été effectuée par Blast en usant de critères d'homologie très stringents (couverture de la requête > 90% ; identité >

90%) : 197 RiSPs parmi les 872 (soit 22.6%) ont été montrés comme étant rigoureusement conservées parmi les 814 R2SPs par Blastp, contre 216 (24,8%) par Blastn. S'agissant de 2 jeux de gènes définis sur le même génotype (DAOM197198), il est surprenant que près des ¾ des 872 RiSPs ne soient pas retrouvés à l'identique dans la version Rhiir2.1 des modèles de gène. Une raison en est la définition de ces modèles: un critère de blastn moins stringent (similarité avec  $E\text{-value} > 1.e^{-170}$  mais sans critère de couverture de la requête) génère 544 hits. Confortant cette explication, le blastn des 872 RiSPs sur l'assemblage génomique permet de définir que la plupart ont un hit robuste sur le génome : 820 RiSPs ont un hit avec une  $E\text{-value} > 1.e^{-50}$  sur l'assemblage génomique Rhiir2.1, 699 avec une  $E\text{-value} > 1.e^{-170}$ . Ainsi, il apparaît que la comparaison avec les modèles de gène tels que définis au JGI ne donne qu'une vision partielle de la richesse en SPs chez ces champignons, notamment en limitant le nombre de gènes codants pour des protéines de petite taille.

Parallèlement, j'ai également analysé plus en détail l'expression des 814 modèles de gènes codant pour des R2SPs définis à partir de l'assemblage Rhiir2.1, 107 (13,14%) présentent une surexpression ( $FC > 2$   $FDR < 0.05$ ) dans au moins un des hôtes testés comparativement à leur expression dans les spores en germination, dont 27 montrent une expression induite par les signaux végétaux (GR24 ou exsudats racinaire) et/ou dans les ERM (**Figure 16-B**). Sur ces 107 R2SPs, 39 (36,4%) présentent une conservation de la surexpression dans les 3 hôtes testés, ce qui est similaire à ce que nous avons préalablement observés avec notre set de gènes issus du recouvrement des données Gloin1 et Rir (où ce taux était de 39%) et appuie nos précédentes observations. Là encore, est retrouvée dans ce jeu une grande part de SPs dont aucune fonction n'a pu être prédite (17). Pour le reste, sont retrouvées notamment des SPs impliquées dans divers processus cellulaires (aspartyl-protéases, subtilisines, alpha/beta hydrolases) ou encore des protéines du métabolisme (cytochromes P450, laccases). La comparaison des 2 sets de protéines (dont les gènes montrent une surexpression dans au moins un des hôtes) par Blastp (Blast : couverture de la requête  $> 90\%$  ; identité  $> 90\%$ ) montre que plus d'un tiers de ces 107 R2SPs (39) est retrouvé parmi les 84 RiSPs précédemment déterminées de manière équivalente (**Figure 16-C**).



**Figure 16: Analyse du sécrétome à partir de l'assemblage Rhiir2.1.** **A.** Détail du processus ayant mené à l'identification des 107 R2SPs dont les gènes présentent une surexpression dans au moins un des 3 hôtes ( $FC > 2$  ;  $FDR < 0,05$ ) à partir de l'assemblage Rhiir2.1. **B. gauche.** Répartition des 107 gènes codant pour les R2SPs surexprimées lors de l'interaction de *R. irregularis* avec chacun des hôtes. **droite.** Les gènes surexprimés dans au moins un des hôtes ont été regroupés et comparés aux gènes dont l'expression est induite dans les ERM ou dans les spores traitées par des signaux végétaux (GR24 ou exsudats racinaires). **C.** Analogie entre les 107 R2SPs et les 84 RiSPs caractérisés selon la même approche issues des données génomiques Gloin1 et Rir (Blastp couverture de la requête > 90% ; identité > 90%).

## 7.2-De nouveaux génomes de 5 isolats de *R. irregularis*

En 2016, Ropars *et al.* étudiaient la diversité génétique au sein d'isolats de *R. irregularis* afin de mettre de lumière une organisation homo-dicaryotique et l'existence de sexualité chez les CMAs. Pour cela, 5 souches de *R. irregularis* (nommées A1, A4, A5, B3 et C2) furent isolées puis séquencées (technologie de séquençage illumina HiSeq2500). Les caractéristiques des différents assemblages génomiques sont résumées **Table 5**.

	<i>R. irregularis</i> A1	<i>R. irregularis</i> A4	<i>R. irregularis</i> A5	<i>R. irregularis</i> B3	<i>R. irregularis</i> C2
Assemblage génomique	125.87Mb	138.3Mb	131.46Mb	124.89Mb	122.97Mb
# contigs	18 943	21 308	22 262	16 875	16 871
# scaffolds	11 301	11 380	14 626	10 461	10 857
Scaffold N50	682	909	920	732	866
Modèles de gènes	26 659	25 760	26 585	25 164	26 756
#SPs prédites par notre pipeline	895	859	866	830	847

**Table 5:** Caractéristiques des assemblages génomiques des 5 isolats de *R. irregularis* (Ropars *et al.*, 2016).

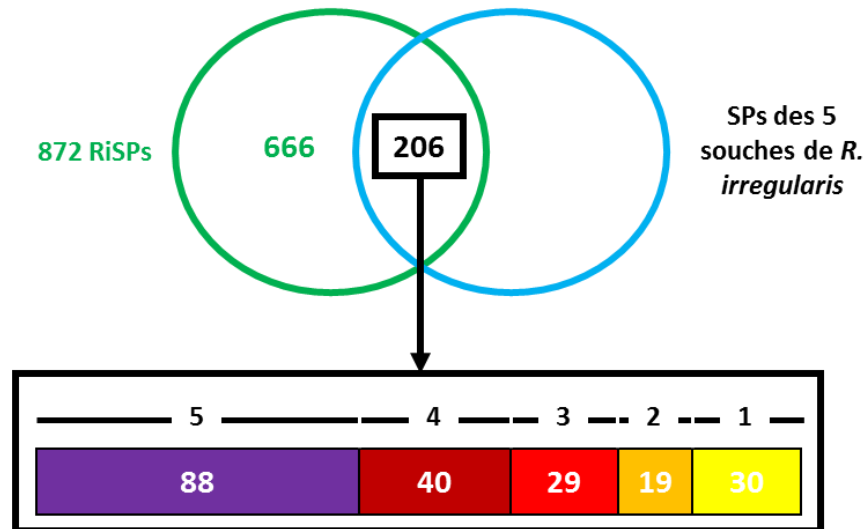
Nous avons cherché à vérifier si nos SPs sont conservées au sein de ces souches. Une conservation irait dans le sens d'un rôle important de ces protéines pour *R. irregularis*. Nous avons donc déterminé de la même manière que précédemment le sécrétome putatif de ces 5 souches. Les effectifs vont de 830 à 895 SPs et confirment la tendance du nombre de SPs observées précédemment (814 R2SPs et 872 RiSPs). Nous avons vu précédemment le biais que consistait à analyser les répertoires de gènes entre eux, sans se référer aux données génomiques en amont. Il s'agit donc ici de faire une analyse comparative indicative.

### 7.2.1-Comparaisons aux 872 RiSPs

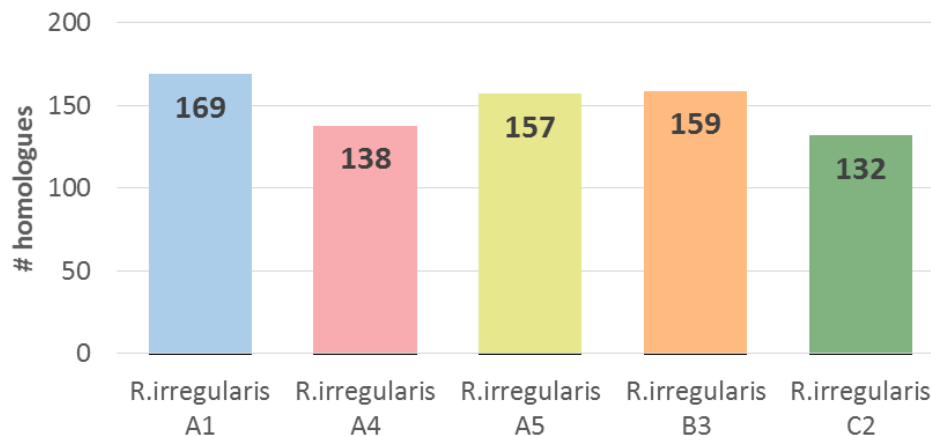
En prenant nos 872 RiSPs comme référence, une analyse Blast sur les SPs des 5 souches (Blastp : couverture de la requête > 90% ; identité > 90%) a déterminé que 23,6% d'entre elles (soit 206) sont conservées de manière robuste dans au moins une des 5 souches (**Figure 17-A**) et 88 dans les 5 souches. La recherche individuelle (souche à souche) des homologues aux 872 RiSPs montre des effectifs de 169, 138, 157, 159 et 132 SPs homologues chez les souches A1, A4, A5, B3 et C2 respectivement (**Figure 17-B**). Si on regarde plus attentivement quelles RiSPs sont les mieux conservées dans les 5 souches (88 sur 206), on remarque que la plupart (59%) possèdent une annotation PFAM parmi lesquelles un nombre conséquent de protéases (10 SPs). Enfin, on retrouve une trentaine (31) de protéines de petites tailles (< 200 aa) dont 7 sont des SCRs et pourraient prétendre à un rôle d'effecteur.

Parmi les 666 RiSPs non conservées de manière robuste, 324 ne présentent aucune homologie de séquences dont essentiellement des protéines de petites tailles (89% d'entre elles, soit 289 sur 324).

**A**



**B**



**Figure 17: Etat de conservation des 872 RiSPs au sein des modèles de gènes définis sur 5 isolats de *R. irregularis* (A1, A4, A5, B3 et C2). A. Répartition des 206 RiSPs dans 1, 2, 3, 4 ou les 5 souches. B. Détail du nombre de RiSPs ayant un homologue dans chacune des souches.**

### 7.2.2-Recherche de nos 33 candidats élités parmi les répertoires de gènes

Si l'on compare maintenant les répertoires de gènes nouvellement définis à nos 33 SPs candidates (Blastp, identité > 90%, couverture query et hit > 90%), ce sont 18 SPs qui sont présentes de manière robuste dans au moins un des 5 isolats, et 4 SPs qui sont retrouvées



dans les 5 (SP8, SP10, SP24 et SP30) (**Table 6**). Parmi ces 4, il est à noter que deux d'entre elles (SP8 et SP10) sont des SCRs et pourraient correspondre à des effecteurs potentiellement important pour l'établissement symbiotique du fait de leur grande conservation chez les 5 souches. Pour ce qui est des deux autres, SP24 n'a pour rappel pas de fonction prédite, et SP30 est une subtilisine possédant également un orthologue chez *G. rosea* et semble donc conservé quel que soit le genre.

	Blastp (identité>90%; couverture query et hit >90%)				
	A1	A4	A5	B3	C2
SP1					
SP2					
SP3					
SP4					
SP5					
SP6					
SP7		+			
SP8	+	+	+	+	+
SP9					
SP10	+	+	+	+	+
SP11	+		+	+	
SP12					
SP13	+				+
SP14	+	+		+	
SP15	+		+	+	
SP16	+		+	+	
SP17					
SP18	+				+
SP19					
SP20			+		+
SP21					
SP22					
SP23					
SP24	+	+	+	+	+
SP25					+
SP26	+		+	+	+
SP27		+			+
SP28	+		+	+	+
SP29					
SP30	+	+	+	+	+
SP31	+		+	+	+
SP32	+	+	+	+	
SP33		+	+		+

**Table 6: Etat de conservation de nos 33 SPs candidates au sein des répertoires de gènes de 5 souches de *R. irregularis* (A1, A4, A5, B3 et C2).** Sont surlignés en jaune les SPs se retrouvant conservées dans la totalité des souches

### 7.2.3-Présences des 33 candidats au niveau génomique

Les approches précédentes ont été réalisées en s'appuyant sur les modèles de gènes tels que définis au JGI. Nous avons cherché à vérifier si nos 33 séquences pouvaient avoir une correspondance sur l'assemblage génomique Rhiir2.1 et ceux des 5 souches de *R. irregularis* (Table 7).

	Rhiir2.1	A1	A4	A5	B3	C2
SP1	+	+	+	+	+	+
SP2	+	+	+	+	+	+
SP3	++_a	++_a	++_a	++_a	++_a	++_a
SP4	++_a	++_a	+	++_a	++_a	++_a
SP5	++_a	++_a	+	++_a	++_a	++_a
SP6	++_a	++_a	++_a	++_a	++_a	++_a
SP7	++_a	++_a	++_a	++_a	++_a	++_a
SP8	++_a	++_a	++_a	++_a	++_a	++_a
SP9	++	++	++_a	++	++	++
SP10	++	++	++	++	++	++
SP11	++	++	++	++_a	++	++
SP12	++	++	++	+	++	++
SP13	++	++	++	++	++	++
SP14	++_a	++	++	++_a	++	++_a
SP15	++_a	++_a	0	++	++	++_a
SP16	++	++	0	++	++	0
SP17	++	++	++_a	++	++	++
SP18	++	++	++	++	++	++
SP19	++_a	+	++_a	++_a	+	++
SP20	++	++	++_a	++	++_a	++_a
SP21	+	+	+	+	++_a	+
SP22	++	++	++	++	++	++
SP23	+	+	++_a	++_a	++_a	++_a
SP24	++	++	++	++	++	++
SP25	++	++	++	++	++	++
SP26	++	++	++_a	++_a	++_a	++
SP27	++	++	++_a	++_a	++_a	++
SP28	++	++_a	++_a	++_a	++_a	++_a
SP29	++	++	++	++_a	++	++
SP30	++	++	++_a	++	++	++_a
SP31	++	++_a	++_a	++	++_a	++_a
SP32	+	++_a	++_a	++_a	++_a	++_a
SP33	++	++_a	++_a	++_a	++_a	++_a

**Table 7: Etat de conservation des 33 gènes candidats sur l'assemblage Rhiir2.1 et au sein des 5 souches de *R. irregularis* (A1, A4, A5, B3 et C2).** Codification : ++=séquences identiques aux données génomiques disponibles (les variants de séquence sont notés par l'index \_a) ; +=hit sur le génome (partiellement identique) ; 0= absence de données génomiques.

Il ressort de cette analyse que seules deux séquences, correspondant aux SPs de plus petites tailles (SP1 et SP2), n'ont pas d'homologie très forte avec les différentes séquences génomiques. SP1 et SP2 sont toutes deux issues de l'assemblage UnigeneV3, et pourraient soit être artéfactuelles, soit être présentes à des zones du génome difficiles à assembler. Les autres SPs montrent une bonne conservation sur les différents génomes. Ainsi, 28 candidats ont une présence forte sur la nouvelle version du génome Rhiir2.1 et 30 sur au moins un des 5 génomes des différentes souches. Ces données génomiques additionnelles soutiennent donc *a posteriori* la robustesse de nos candidats issus des 3 assemblages Gloin1, Rir et UV3.

Ces résultats soulignent que la comparaison de répertoires de gènes entraîne de multiples biais, notamment pour les séquences de taille réduite, et qu'il est plus efficace de se référer aux données génomiques.

# Chapitre II - A la recherche de protéines sécrétées de *Rhizophagus irregularis* DAOM197198 exploitables en agriculture

---

## 1-Avant-propos

*Même si nous avons réduit par les travaux présentés au chapitre précédent le nombre de SPs à une liste de 33 candidats, il n'en demeure pas moins qu'il est impossible de faire une analyse fonctionnelle complète sur un tel effectif dans le cadre d'un travail de thèse. En tant qu'initiateur de cette thématique dans l'équipe (projet de recherche de Nicolas Frei dit Frey initié en 2013), mon travail a consisté à réaliser un crible de candidats par des analyses de cytologie et d'activité sur l'établissement de la symbiose MA pour tenter l'identification d'acteurs exploitables en agriculture, conformément au cadre de cette thèse CIFRE.*

## 2-Objectifs

Dans le chapitre précédent, 33 gènes codant pour des protéines sécrétées (SPs) ont été identifiés sur la base des caractéristiques des séquences nucléotidiques (présence d'un peptide signal, taille, prédiction de domaines et fonctions protéiques) et des profils d'expression dans différents hôtes (RNAseq). Le présupposé est que parmi les SPs les plus fortement surexprimées lors de l'établissement de la symbiose figurent des candidats effecteurs majeurs impliqués dans les processus de colonisation par *Rhizophagus irregularis*. Notre but est donc d'identifier parmi les 33 candidats précédemment identifiés, ceux qui pourraient avoir des rôles clés pour la mise en place de tels mécanismes et être exploités par l'entreprise Agronutrition pour favoriser la mise en place de la symbiose en champ.

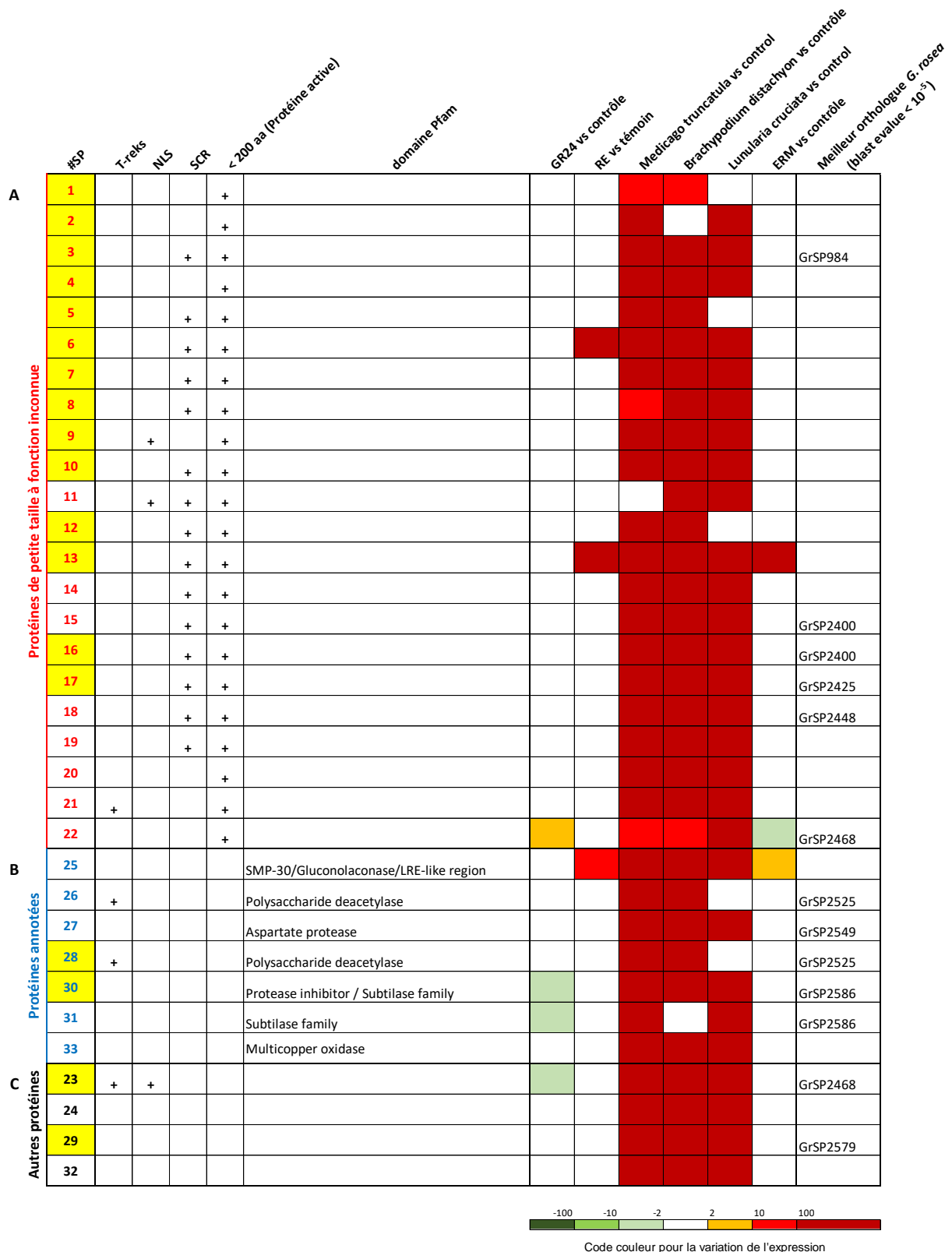
Pour cela, une première analyse basée sur la bibliographie a permis de porter notre attention sur un nombre de candidats plus restreint dont nous avons ensuite confirmé l'expression en condition symbiotique par RT-qPCR. Après clonage, des études de surexpression de ces gènes

en système hétérologue ont ensuite été conduites dans le but d'observer une activité de ces protéines mais également analyser leur sécrétion puis translocation dans les cellules végétales par des approches cytologiques. Enfin, certaines protéines de petite taille ont été synthétisées pour un apport exogène sur plantes en coculture avec des spores de *R. irregularis*, dans le but d'évaluer leur impact sur la mise en place de la mycorhization et de se rapprocher d'un système pouvant être transposé à un usage agricole.

## 3-Résultats et discussion

### 3.1-Analyse de la séquence et des profils d'expression des candidats

Les protéines effectrices ont été montrées comme jouant un rôle clé dans la mise en place de relations mutualistes, que ce soit chez les bactéries fixatrices d'azote (Okazaki *et al.*, 2010, 2013; Yasuda *et al.*, 2016), chez les champignons ectomycorhiziens avec la découverte de MiSSP7 pour *Laccaria bicolor* (Plett *et al.*, 2011, 2014; Plett & Martin, 2012) et chez le champignon mycorhizien à arbuscules *R. irregularis* avec SP7 (Kloppholz *et al.*, 2011). La recherche d'effecteurs symbiotiques est donc en plein essor. Différents travaux ayant mené à la caractérisation de certains d'entre eux ont permis de mettre en lumière des caractéristiques partagées pour la plupart de ces protéines. Chez les champignons, il ressort que les effecteurs ont le plus souvent une expression positivement régulée lors de la colonisation *in planta*, une petite taille, ne possèdent pas de fonction prédite et peuvent être riches en cystéines (Martin *et al.*, 2008a; Stergiopoulos & de Wit, 2009; Doehlemann *et al.*, 2009; Zuccaro *et al.*, 2011; Pellegrin *et al.*, 2015). Cependant, comme toute définition généraliste, des exceptions existent. On peut notamment citer : AvrM de *Melampsora lini* qui est de grande taille (343 aa) (Catanzariti *et al.*, 2006), ainsi que Ecp6 de *Cladosporium fulvum* et Slp1 de *Magnaporthe oryzae* qui sont définis comme des protéines à domaines LysM (Jonge *et al.*, 2010; Mentlak *et al.*, 2012). Par ailleurs, des effecteurs présentant des tailles conséquentes et des fonctions conservées ont été plus fréquemment caractérisés à la fois chez les bactéries et les oomycètes (Dean, 2011; Raffaele & Kamoun, 2012), rendant difficile l'identification de ces protéines sur ces seuls critères. Les 33 SPs constituant notre liste peuvent ainsi être classées en différentes catégories (**Tableau 8**).



**Tableau 8 : Caractéristique des 33 protéines sécrétées (SP) identifiées (Chapitre I). A :** Les 22 SPs de petites tailles à fonction inconnue **B :** Les 7 SPs dont une fonction a pu être prédite **C :** Les 4 autres SPs n'appartenant à aucune des deux précédentes catégories. Sont surlignés en jaunes les SPs qui ont été sélectionnés pour analyse.

### 3.1.1-Les protéines de petite taille à fonction inconnue

Elles sont au nombre de 22 dans notre liste et présentent une taille inférieure de 200 acides aminés. Sur ces 22 SPs, 15 sont également des protéines riches en cystéines (Small Cystein Rich proteins – SCRs proteins) (**Table 8-A**). Dans notre étude, **14 ont pu être analysées dont 10 sont des SCRs.**

### 3.1.2-Les protéines annotées

Sur les 11 protéines restantes de taille plus grande (>200 aa), 7 ont une fonction prédite (**Table 8-B**) parmi lesquelles :

Deux polysaccharides déacétylases. Ces protéines, qui appartiennent à la famille 4 des estérases carbohydrates, ont été montrées comme intervenant dans le maintien de la forme cellulaire en stabilisant les parois des cellules (Balomenou *et al.*, 2013; Arnaouteli *et al.*, 2015). Chez les champignons, elles permettent de dé-acétyler la chitine fongique, polymère cristallin et rigide de *N*-acétyl-glucosamine liés en  $\beta$  synthétisé par des chitine-synthases, en chitosane (Davis & Bartnicki-Garcia, 1984). L'organisme fongique pourrait tirer plusieurs bénéfices de cette modification. En effet, les fragments de chitine sont des MAMPs puissants activant des réactions de défense des plantes (Shinya *et al.*, 2015), et la dé-acétylation serait une solution directe afin de masquer ce motif (El Gueddari *et al.*, 2002). Autre action, à un niveau développemental cette fois, les déacétylases ont été montrées comme étant impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire (Baker *et al.*, 2007). On peut donc suspecter que lors de la pénétration des hyphes de CMA *in planta*, le microorganisme soit l'objet de réorganisations de structure pariétale incessantes lui permettant de s'immiscer entre les cellules épidermiques et corticales ou bien encore de participer à la formation des arbuscules. Ainsi ces polysaccharides déacétylases pourraient jouer un rôle clé dans les processus d'infection. **Parmi les deux SPs (SP26 et SP28), l'étude de SP28 a été privilégiée** du fait d'une surexpression 10 fois supérieure à son homologue SP26 lors de la colonisation de *M. truncatula*.

Trois protéases (deux subtilisines et une aspartyl protease). Les protéases sécrétées ont été décrites pour leur rôle dans le recrutement de nutriments dans l'environnement des champignons saprotrophes (St Leger *et al.*, 1997) mais ce n'est pas leur seul rôle décrit.

Certaines peuvent par exemple intervenir dans des processus de maturation d'autres protéines. Ainsi, SphB1, une protéase exportée contenant entre autre un domaine de type subtilisine, est responsable de la maturation du précurseur de la FHA (filamentous haemagglutinin adhesin) chez l'agent de la coqueluche *Bordetella pertussis* (Coutte *et al.*, 2001). On distingue également des endoprotéases sécrétées de type Kexin telles que Kex2 chez la levure ou KexB chez *Aspergillus niger* (Fuller *et al.*, 1989; Calmels *et al.*, 1991; Jalving *et al.*, 2000). Ces enzymes protéolytiques interviennent dans le golgi et cliveraient les protéines arborant un motif protéique de reconnaissance par ces enzymes, permettant de générer des peptides actifs avant leur excrétion. Dans le cadre des interactions plantes champignons pathogènes, des protéases sécrétées ont été montrées comme jouant un rôle clé dans la colonisation d'un hôte. Ainsi, une métalloprotéase ainsi qu'une protéase à sérine chez le pathogène de la tomate *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*, ont été montrées comme réduisant l'activité antifongique déclenchée par le végétal en dégradant les chitinases sécrétées (Karimi Jashni *et al.*, 2015).

Les subtilisines, qui sont des protéases à sérine non spécifiques, peuvent aussi contribuer à la pathogénicité. Chez *Cryphonectria parasitica*, agent du chancre du châtaignier, une approche par mutant délétère pour une protéase de type subtilisine, Prb1, a montré l'implication de cette dernière dans la virulence mais également dans la propagation des hyphes et dans la sporulation (Shi *et al.*, 2014). Enfin, pour le champignon endophyte *Epichloë festucae*, une étude s'est particulièrement intéressée à identifier des membres de cette famille et leur distribution au sein des Hypocreales dont cet organisme est issu, leur suspectant un rôle dans le maintien de l'interaction (Bryant *et al.*, 2009). De manière très intéressante, au niveau de la symbiose MA, une étude de 2009 a montré que deux subtilisines du lotier (*Lotus japonicus*) sont requises pour l'établissement symbiotique avec *R. irregularis*. Elles seraient notamment impliquées dans la propagation des hyphes *in planta* et plus particulièrement dans le développement des arbuscules (Takeda *et al.*, 2009). Il serait donc particulièrement intéressant de savoir si les subtilisines identifiées chez *R. irregularis* pourraient également intervenir dans ces processus. **Le candidat SP30 a été analysé dans cet objectif.**

Concernant les aspartyl protéases, leur contribution à la pathogénicité a également été démontrée par de nombreuses études portant sur *Candida spp.* (Naglik *et al.*, 2003), mais également chez des champignons phytopathogènes tel que *Sclerotinia sclerotiorum* où l'une



d'entre elles, *AspS*, serait exprimée lors des étapes précoces d'infection et promouvrait en concert avec une endopolygalacturonase la propagation des hyphes infectieux (Poussereau *et al.*, 2001; Hegedus & Rimmer, 2005).

Une Multicopper oxydase ou laccase. Ces enzymes d'oxydo-réduction sont impliquées dans des processus variés sur des polymères cycliques tels la synthèse des mélanines et autres pigments fongiques, la sporulation et la pathogenèse mais également dans la dégradation de la lignine (Mayer & Staples, 2002; Lundell *et al.*, 2010). Elles pourraient intervenir dans le remodelage de la paroi végétale pour l'accueil des hyphes fongiques et la formation des arbuscules.

Une SMP-30/Gluconolactonase/LRE-like region (SGL) dont peu d'études sont disponibles pour pouvoir leur prédire un rôle.

### 3.1.3-Autres protéines

Enfin, sur les 4 SPs restantes (**Table 8-C**), deux (SP23 et SP29) ont été montrées comme présentant un orthologue chez *G. rosea*. SP23 est, de plus, prédite pour avoir des répétitions de séquences et posséder une NLS. **Il a donc été décidé d'inclure ces deux SPs dans notre analyse**, portant à un total de 18, le nombre de gènes candidats sélectionnés.

## 3.2-Validation de l'expression par RT-qPCR

Les analyses RNAseq ayant été effectuées sur des échantillons en triplicat et sur 3 plantes différentes (voir chapitre précédent), elles peuvent être considérées comme robustes. Par ailleurs, différentes études ont montré d'excellentes corrélations entre les résultats RNAseq et les données obtenues par qPCR (Asmann *et al.*, 2009; Griffith *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2013; Shi & He, 2014). Nous avons néanmoins effectué des validations d'expression par RT-qPCR afin de confirmer les profils d'induction observés (**Table 9**).

Il est important de noter ici que les séquences codantes (CDS) des effecteurs putatifs SP6 et SP7 sont très similaires (94% d'identité nucléotidique). De ce fait, nous avons cherché à définir si les séquences non traduites (UTR) divergeaient afin de pouvoir distinguer leurs expressions respectives. Pour cela, les cadres de lecture correspondants à ces deux gènes ont été validés en cartographiant les lectures RNAseq sur les régions génomiques correspondantes (**Figure 15**

chapitre I). La comparaison des séquences balisant ces deux ORFs en 5' et 3' indique que ces deux régions, qui sont sur des scaffolds différents, sont quasi identiques. Bien que nos critères stringents de mapping nous permettent d'évaluer les expressions relatives de ces deux gènes, les variations de séquences sont trop faibles pour désigner des amorces permettant des amplifications spécifiques. C'est pourquoi leur expression n'est pas mentionnée ici.

#SP	Données RNAseq				RT-qPCR
	Spores en germination (Témoin) - moyenne des RPKM	Racines de <i>M. truncatula</i> mycorhizées - moyenne des RPKM	Comparaison condition symbiotique vs Témoin - moyenne d'accroissement (Fold change)	FDR	Comparaison condition symbiotique vs témoin - moyenne d'accroissement (Fold change)
1	49.94	1399.81	27.12	4.03E-10	1.34
2	0	478.39	>999999	2.64E-04	2325.93
3	0	443.99	>999999	5.24E-10	10.13
4	0	4293.24	>999999	7.53E-06	397.82
5	0	3748.13	>999999	1.36E-12	439.27
6	0	3473.99	>999999	2,26E-07	
7	0	750.27	>999999	2.39E-04	
8	11.43	191.18	16.14	3.88E-05	6.48
9	0	102.64	>999999	1.15E-02	4.59
10	0	458.59	>999999	1.20E-02	462.70
12	0	22983.09	>999999	1.81E-03	209.73
13	5.27	9248.69	1698.56	0	163.46
16	0	10235.41	>999999	1.09E-11	2833.57
17	0	8051.99	>999999	7.42E-12	1214.43
23	84.04	22400.98	257.69	0	498.20
28	0.66	1187.35	1742.01	2.32E-02	
29	1.76	3560.79	1952.64	0	107.24
30	0	343.97	>999999	4.59E-02	0.85

**Table 9: Niveau d'expression des gènes candidats dans des racines de *M. truncatula* mycorhizées comparé à une condition témoin de spores de *R. irregularis* en germination, déterminé par RNAseq et RT-qPCR.** Les expressions par RT-qPCR de SP6 et SP7 ne sont pas mentionnées pour des raisons de similarité de séquence. Les données sont à ce jour encore manquantes pour SP28.

Sur les 15 gènes testés, seules SP1 et SP30 ne montrent pas de dérégulation. Quant à SP8 et SP9, elles montrent une induction de l'expression mais plus mesurée que celle déterminée par les données RNAseq. Même si le logiciel d'analyse (CLC Genomic WorkBench) est censé gérer les redondances en calculant le niveau d'expression pour chaque variant d'une famille multigénique par pondération de leur expression respective sur la base des reads mappés sur les régions spécifiques (les reads communs pouvant être ré-utilisés 10 fois selon nos

paramètres), il n'est pas à exclure que les défauts d'assemblage (donc de définition des modèles de gène utilisés en référence) perturbent ces ajustements. Une autre explication pourrait être un problème d'ordre technique en qPCR, lié à un défaut lors de l'amplification de certaines régions sur l'ADNc, un seul couple d'oligonucléotides par gène ayant été testé. Enfin, il ne faut pas sous-estimer la variabilité de la réponse biologique, les expérimentations qPCR et RNAseq n'ayant pas été réalisées sur le même matériel biologique.

### **3.3-Etude en système hétérologue du caractère sécrétoire des SPs sélectionnées et de la cytolocalisation dans les cellules végétales**

#### **3.3.1-Etude par surexpression *in planta* et analyse histologique**

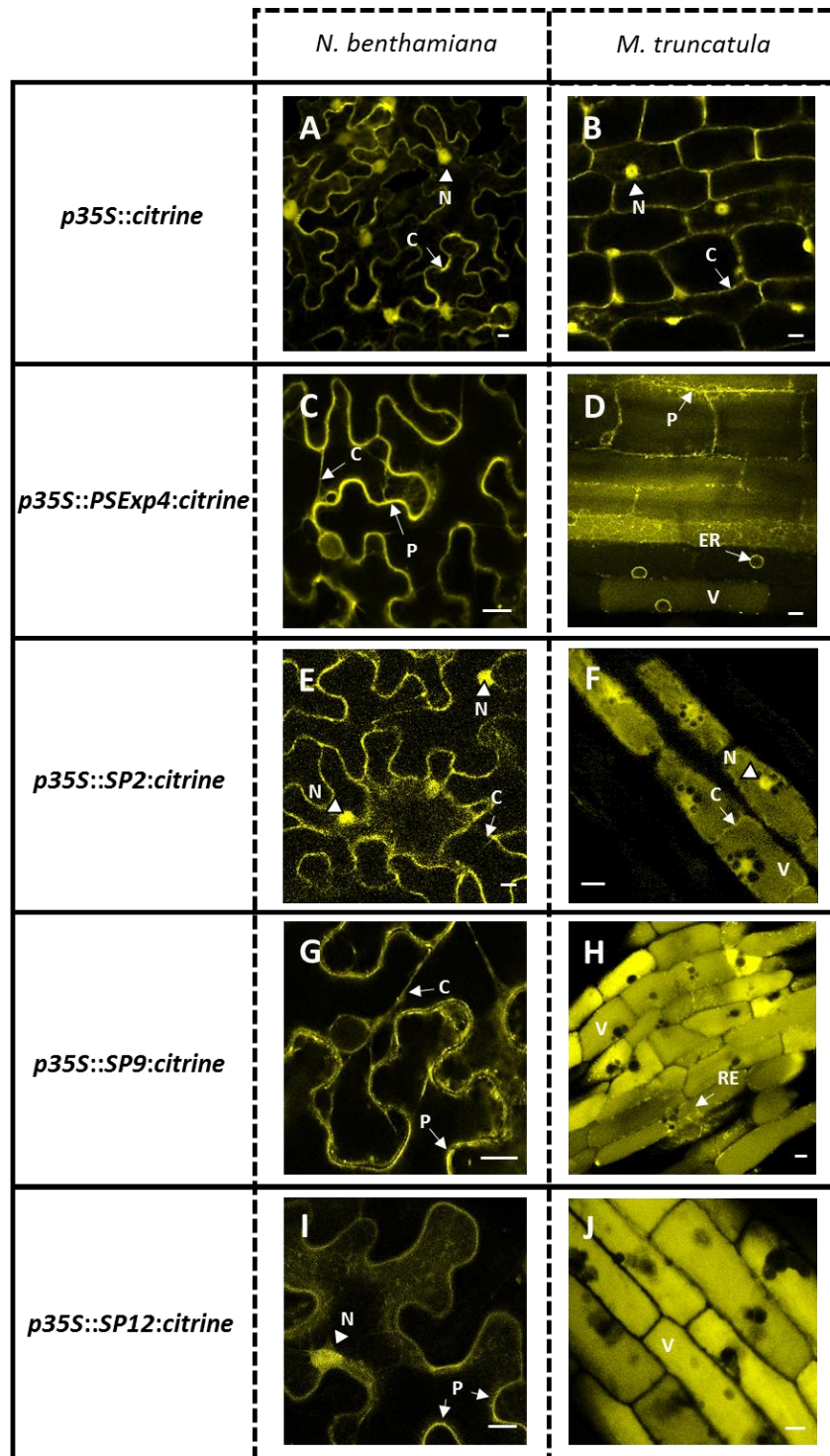
##### **3.3.1.1- Recherche d'un système d'étude approprié**

La première étape de ce travail a consisté à investiguer la localisation subcellulaire des SPs sélectionnées pour premièrement valider leur sécrétion (et éventuellement leur translocation) et ainsi envisager un rôle possible. Les CMAs ne se prêtant pas aux approches de modification génétique stables (pas de système de transformation disponible, pas de phase mononucléée permettant la sélection de transformants), nos approches reposent essentiellement sur la transformation de plantes pour faire exprimer les protéines fongiques d'intérêt. Pour cela, des clonages par Golden Gate ont permis de générer des constructions où les gènes candidats sont sous contrôle d'un promoteur fort 35S (p35S) fusionnés à un gène codant pour la citrine, une protéine fluorescente. Le choix de l'utilisation de la citrine au détriment de la GFP (Green Fluorescent Protein) habituellement utilisée pour ce type d'approche repose sur une différence de propriété physico-chimique entre ces deux protéines. En effet la citrine, qui a été générée à partir de la YFP (Yellow Fluorescent Protein) par mutation (Q69M), a un pKa plus faible que la GFP, ce qui lui confère une meilleure stabilité aux pH acides (Griesbeck *et al.*, 2001). Les SPs que nous avons testées pouvant soit transiter ou être localisées dans l'apoplasme (compartiment acide) comme de nombreux effecteurs précédemment caractérisés (Doehle *et al.*, 2009; Jashni *et al.*, 2015; de Wit, 2016), il a donc été préférable de porter notre choix sur cette protéine rapportrice. Ces constructions

ont ensuite été insérées dans un vecteur binaire pCambia 2200 Gold modifié pour faire de l'expression hétérologue (construction *p35S::SP:Citrine*). Ce vecteur a été modifié afin de ne plus exprimer de manière constitutive la protéine rapportrice DsRed (*pCambiaΔDsRed*) dont le gène est présent sur l'ADN de transfert (ADN-t). En effet, l'expression de cette dernière pourrait parasiter le signal de la citrine du fait d'un chevauchement partiel des spectres d'émission des deux protéines.

La cytolocalisation des protéines de fusion (SP:citrine) a été réalisée après transformation par agrobactéries de tissus foliaires de tabac et de racines de *Medicago* pour comparer le comportement dans ces deux systèmes (**Figure 18**). Les essais d'expression réalisés dans le tabac (*Nicotiana benthamiana*), outre leur facilité de mise en œuvre, sont communs pour ce type de validation fonctionnelle car le tabac est une espèce sensible à une très grande diversité d'agents pathogènes (virus, champignons, bactéries ou encore oomycètes) ce qui en fait un bon modèle pour l'étude des interactants microbiens de cibles végétales (Goodin *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2009). Des souches C58C1 d'*Agrobacterium tumefaciens* ont donc été transformées pour faire exprimer les protéines d'intérêt fusionnées à la citrine dans les tissus foliaires après agroinfiltration.

En parallèle, les mêmes constructions ont été incorporées dans des souches A4 d'*A. rhizogenes* afin de pouvoir faire exprimer les gènes candidats dans des racines de *M. truncatula*. Ces essais - décrits plus en détail par la suite - ont par ailleurs permis d'observer si l'expression des SPs dans les racines a une incidence sur l'établissement de la symbiose endomycorhizienne.



**Figure 18 : Comparaison des localisations des différentes SPs (construction *p35S::SP:citrine*) dans les épidermes foliaires de *N. benthamiana* (partie gauche) et dans des racines transformées de *M. truncatula* (partie droite). Les observations ont été effectuées entre 2 et 4 jours dans les feuilles de tabac et entre 3 et 4 semaines après transformation dans les racines de *M. truncatula*. La fluorescence des constructions est visible en jaune. Les images A à D représentent la localisation des constructions témoins. Les images A et B correspondent à la surexpression de la citrine seule et les images C et D à la citrine fusionnée au peptide signal de l'Expansine 4 (PSExp4), protéine sécrétée localisée dans la paroi cellulaire. Les différentes localisations sont mentionnées directement sur les images : C : cytoplasme ; N : noyau ; RE : Réticulum Endoplasmique ; V : vacuole ; P : paroi. Barre d'échelle : 10  $\mu$ m.**

La **figure 18** illustre des différences de localisation subcellulaire rencontrées selon les systèmes biologiques. SP2 montre une présence nucléaire et cytoplasmique chez le tabac, mais également vacuolaire chez *M. truncatula*. Des différences majeures interviennent pour SP9 et SP12. La localisation de SP9 chez le tabac apparaît cytoplasmique et partiellement pariétale, ce que confirme la colocalisation avec une protéine marquée dirigée dans la paroi (**Annexe 1**). Or aucune de ces localisations ne sont retrouvées dans les racines de medicago où SP9 est observée dans les vacuoles et le RE. Pour SP12, une présence nucléaire et pariétale est présente dans les feuilles de tabac (**Annexe 1**), là encore non confirmée dans les tissus racinaires de luzerne où seule une présence vacuolaire est détectée.

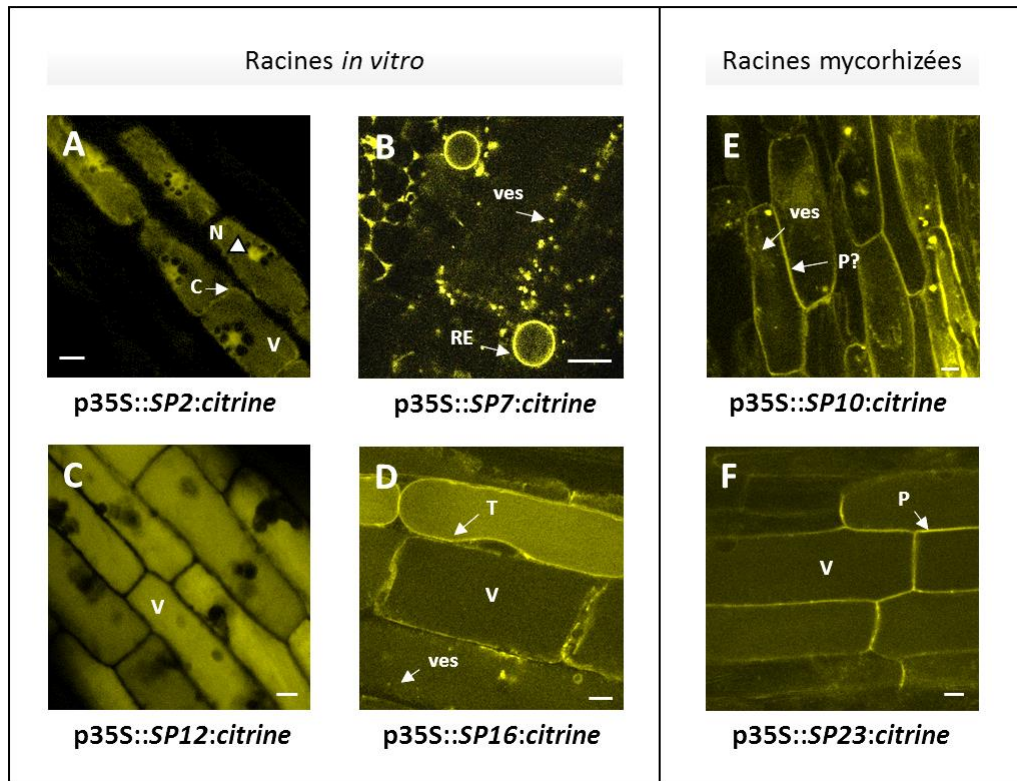
Ces observations démontrent que selon le système choisi, les localisations subcellulaires pouvaient différer pour une même protéine, même produite à partir d'un plasmide binaire identique. Cette observation nous a donc fait privilégier les racines transformées au détriment des feuilles de tabac. Ce choix est d'autant plus approprié que ces SPs ont vocation à se retrouver dans des racines du partenaire végétal et non dans les tissus aériens.

### **3.3.1.2-Expression dans les racines de *Medicago truncatula***

La localisation subcellulaire des candidats clonés s'est donc effectuée exclusivement dans les racines de *M. truncatula*. Afin de se rapprocher des conditions naturelles, des observations complémentaires ont également été conduites sur des racines mycorhizées issues de culture en pot afin de voir si la présence du champignon combiné à différents facteurs environnementaux (biotiques et abiotiques) pouvait influencer la relocalisation de SP.

Bien que notre volonté fût d'étudier l'ensemble des SPs pour lesquelles nous possédions des constructions disponibles (16 sur les 18 sélectionnées), nous avons obtenu des données robustes (dans 3 racines indépendantes) pour 7 d'entre elles (SP3, SP5, SP13, SP17, SP28, SP29 et 30). Une première raison est que pour 4 constructions (SP17, SP28, SP29 et SP30), le signal émis était trop faible pour permettre de confirmer la localisation des SPs. Pour 2 autres (SP5 et SP13), ce problème a été accentué par la difficulté d'obtenir des racines transformées par manque de régénération. Une explication pourrait être qu'une surexpression de ces gènes dans les tissus inhiberait le développement racinaire. Ainsi, des données de localisation n'ont pu être obtenues que sur 9 SPs (**Figure 19**).

**A**



**B**

Constructions	Localisation du marquage													
	Racines <i>in vitro</i>							Racines mycorrhizées						
	N	C	RE	ves	P	V	T	N	C	RE	ves	P	V	T
p35S::citrine	+	+						n.d.						
p35S::PSExp4:citrine			+	+	+			n.d.						
p35S::SP1:citrine			+			+		n.c.						
p35S::SP2:citrine	+	+				+		n.c.						
p35S::SP6:citrine			+			+				+			+	
p35S::SP7:citrine			+	+		+				+			+	
p35S::SP9:citrine			+			+							+	
p35S::SP10:citrine				+		+		(+)		+	(+)	+		
p35S::SP12:citrine						+		(+)			(+)	+		
p35S::SP16:citrine				+		+	+	(+)		+	(+)	+		
p35S::SP23:citrine				+		+						+	+	

**Figure 19 : Localisation subcellulaire des différentes SPs exprimées dans les racines de *M. truncatula* (construction *p35S::SP:citrine*).** **A** : exemples de différentes compartimentations cellulaires rencontrées au cours de l'étude. La fluorescence des constructions est visible en jaune. Les images A à D représentent la localisation des SPs en racines *in vitro* tandis que les images E et F montrent des localisations dans des racines mycorhizées. Les localisations de chacune des SPs sont figurées directement sur les images par des flèches. **B** : Tableau de résumé de la localisation des différentes SPs effectuées dans les racines de *M. truncatula in vitro* (partie gauche) et dans des racines mycorhizées (partie droite). Les observations ont toutes été effectuées entre 3 et 4 semaines pour les racines *in vitro* et entre 8 et 12 semaines pour des racines mycorhizées. N : noyau ; C : cytoplasme ; RE : Réticulum Endoplasmique ; Ves : vésicules ; P : paroi ; V : vacuole ; T : tonoplaste ; (+) : localisation suspectée mais à confirmer ; n.d. : non déterminé ; n.c. : localisation difficile à déterminer. Barre d'échelle : 10  $\mu$ m.

Les constructions contrôles (**Figure 18** – images A-D) permettent, par analogie avec les candidats testés, de mettre en évidence l'action d'un peptide signal actif sur la localisation d'une protéine. Il a été choisi ici de fusionner la citrine au peptide signal de l'Expansine 4, protéine extracellulaire localisée dans la paroi (Cosgrove *et al.*, 2002). Sans peptide signal attaché, la citrine reste dans la cellule et diffuse dans le noyau et le cytoplasme (**Figure 18** – images A et B). L'ajout du peptide signal entraîne son transit dans les voies de sécrétion et sa localisation finale dans la paroi (**Figure 18** – images C et D). Ces voies sont dites « classique » si la protéine emprunte le RE, transite par le Golgi et est exportée à la paroi par un transport vésiculaire, et « non conventionnelle » si ce trajet se fait indépendamment du Golgi (Lee *et al.*, 2004; Nickel & Rabouille, 2008). La localisation de candidats dans ces compartiments serait donc une première étape dans la validation d'un peptide signal actif de sécrétion. Sur les candidats testés, 7 (SP1, SP6, SP7, SP9, SP10, SP16, et SP23) montrent une présence dans au moins un des éléments clés de cette voie (Vésicule, RE, ou localisation apoplastique). Concernant SP2 et SP12, ces derniers y semblent absents. Pour ces deux cas, une possibilité serait que le peptide signal prédit *in silico* soit un faux positif. La protéine serait donc produite mais resterait au sein de la cellule. Mais on peut aussi penser que le peptide signal de ces protéines fongiques pourrait également ne pas être reconnu par la machinerie cellulaire de la plante, empêchant leur sécrétion. Une autre hypothèse serait que ces protéines soient exportées dans la paroi puis re-transloquées dans la cellule végétale sans que leur transit par les voies de sécrétion ne soit visible.

En comparant la localisation des SPs sur racines mycorhizées avec les précédentes (non mycorhizées), des différences notoires sont apparues. En effet, le marquage pour les protéines SP10, SP12, SP16 et SP23 se retrouve plus vers la périphérie cellulaire, pouvant correspondre



à une présence cytoplasmique, membranaire ou pariétale. Pour SP23, seule une présence pariétale a été observée, confirmée après plasmolyse des cellules (voir **Annexe 2**). Cette nouvelle localisation pourrait être la conséquence de deux facteurs. **1)** La présence de *R. irregularis* dans les racines. En effet, une approche par microdissection laser couplée à de la transcriptomique a montré une reprogrammation des cellules de *M. truncatula*, aussi bien celles accueillant les arbuscules que celles non colonisées (Gaude *et al.*, 2012). De plus, nous avons contribué à montrer (Chapitre I) que ce champignon, en pénétrant dans les tissus végétaux, sécréterait une batterie de SPs. Il n'est donc pas exclu que certains SPs interagissent entre elles, leur permettant de cibler d'autres compartiments cellulaires. **2)** Les conditions de culture. Les racines non mycorhizées ont été transférées d'un milieu gélosé stérile très humide à un milieu plus sec non stérile. Or, il a été décrit que de telles variations environnementales pouvaient induire des réponses cellulaires d'ordre biotiques (Okubara & Paulitz, 2005; Erb *et al.*, 2009) et abiotiques (Kreps *et al.*, 2002; Kosová *et al.*, 2011; Peleg & Blumwald, 2011). Ces variations sont donc susceptibles d'avoir un impact sur la relocalisation d'un SPs suite à un changement des comportements cellulaires.

Si l'accumulation pariétale de SP10, SP12 et SP16 se confirme, comme démontrée pour SP23, il est intéressant de remarquer que ces candidats ont les tailles les plus importantes parmi les SPs testées. Une hypothèse pourrait alors être que les stress générés pourraient entraîner des renforcements pariétaux de nature à piéger certaines SPs dans la paroi ou limiter leur possible retranslocation dans la cellule. En effet, la séquence peptide signal étant conservée dans les constructions, les protéines sont donc potentiellement adressées vers l'apoplasme avant de pouvoir être transloquées *in cellulo*. Ceci pourrait expliquer le fait que nous n'observons plus SP16 dans le tonoplaste et aucun changement pour les candidats de plus petite taille (SP6, SP7 et SP9).

Nous aurons remarqué que, en plus des sites de localisation décrits, toutes les SPs sont adressées vers la vacuole cellulaire végétale, quelle que soit la condition testée. Pour SP16, le signal a souvent été observé préférentiellement au niveau du tonoplaste.

Pourquoi la vacuole serait-elle ciblée par les SPs ? Une première explication est d'ordre technique. D'une part les signaux d'adressage extracellulaires des constructions pourraient être responsables de cette localisation, renforcée par ailleurs par la surexpression de ces gènes. En effet, le fait que ces cellules expriment potentiellement en grande quantité des

protéines d'origine étrangère peut déclencher des systèmes vacuolaires de dégradations protéiques. La vacuole jouerait ainsi un rôle de protection, dans le but d'isoler du reste de la cellule des éléments pouvant être considérés comme nocifs (Müntz, 2007). Toutefois, il ne peut être exclu que ces SPs ciblent réellement une localisation dans ce compartiment cellulaire. Pumplin *et al.*, (2012) ont ainsi montré des variations de localisation du transporteur de phosphate MtPT4 fusionné à la GFP, selon que ce dernier soit exprimé à partir du promoteur natif d'un autre transporteur, MtPT1 ou du promoteur 35S. En effet, la première construction citée présente un signal dans la membrane périarbusculaire alors que la présence du promoteur 35S envoie la protéine dans la vacuole. De plus, il semble que le promoteur 35S pourrait être négativement régulé dans les cellules infectées par *Glomus versiforme* comme en témoigne le faible signal GFP émis dans les cellules accueillant un arbuscule (Pumplin *et al.*, 2012). Cette régulation négative a également été observée lors de précédentes études s'intéressant aux interactions plantes-microorganismes (Auriac & Timmers, 2007; Wang *et al.*, 2009); elle pourrait expliquer le fait que lors de l'investigation des marquages des SPs d'intérêt dans des racines mycorhizées, aucun signal n'a permis de mettre en évidence une cellule infectée en dépit de la présence constatée du champignon dans ces racines après coloration.

Dans la littérature, la vacuole des cellules végétales est présentée comme un organe important dans la croissance et le développement des plantes (voir Martinoia *et al.*, 2007 pour revue). Lors du développement des arbuscules dans les cellules corticales, des réorganisations drastiques intracellulaires sont nécessaires. Ainsi, précédant la pénétration des hyphes fongiques, des marquages de protéines internes du tonoplaste (protéines TIP) ont mis en évidence que la vacuole entourait des travées cytoplasmiques qui se formaient à travers la cellule (Pumplin & Harrison, 2009). Avec le développement des arbuscules, le tonoplaste semble se fragmenter, s'immiscer entre les ramifications de l'arbuscule, tout en enveloppant le noyau et le cytoplasme qui sont opprimés par la structure fongique. Ce phénomène est observé jusqu'à la dégénération de cette structure ramifiée où la vacuole retrouve pleinement sa forme et sa taille. Une étude sur le lotier (*Lotus japonicus*) portant sur deux aquaporines a montré qu'une d'entre elles, LjNIP1, avait son expression induite en condition symbiotique et était localisée en abondance dans le tonoplaste dans des régions proches de la membrane périarbusculaire, présentant parfois des zones de jonctions entre ces deux membranes

(Giovannetti *et al.*, 2012). Cette possibilité de rapprochement et de jonction entre plasmalemme et tonoplaste interviendrait lors de la défense contre les agents pathogènes. La vacuole est en effet un organe impliqué dans les réactions de défense, accumulant divers composés antimicrobiens pouvant être relargués dans l'apoplasme en cas d'attaque (Hara-Nishimura & Hatsugai, 2011). Il ne serait donc pas surprenant de trouver des effecteurs ciblant le tonoplaste afin de limiter ces mécanismes (Caillaud *et al.*, 2012). La localisation de SP16 au niveau du tonoplaste pourrait donc augurer d'un rôle dans la réduction des mécanismes de défense impliquant la vacuole, ou sinon d'une action visant à préparer la vacuole au développement d'un arbuscule (par exemple en modifiant la pression de turgescence au sein de celle-ci).

Concernant les autres candidats, la localisation de SP2 a été observée dans le noyau. Une possibilité est que premièrement cette localisation soit passive, pouvant s'expliquer par la très petite taille de cette protéine et le fait que la citrine seule diffuse librement dans la cellule car étant plus petite que la taille requise pour franchir les pores nucléaires. Mais le fait que nous ne voyons pas cette présence pour SP1 qui est de plus petite taille encore peut être un argument en faveur d'une translocation active. Notons qu'aucune NLS n'a été prédite pour SP2 contrairement à SP9 et SP23 dont la prédiction d'une localisation nucléaire n'a pas été confirmée (toutes les deux sont exclues du noyau). Une localisation cytoplasmique pour SP2 étant également marquée (bien que faible), il peut être proposé un mécanisme dans lequel cette SP s'accumulerait dans le cytoplasme, et pourrait se lier à une protéine végétale qui serait transportée à travers les pores nucléaires. Dans ce compartiment, ce peptide pourrait jouer un rôle dans la modification du transcriptome cellulaire végétal nécessaire pour la mise en place d'une relation étroite avec le champignon, comme montré pour MiSSP7 et SP7 (Kloppholz *et al.*, 2011; Plett *et al.*, 2011).

Enfin, de manière générale, l'apoplaste est présenté comme une zone clé pouvant être ciblée par de nombreux effecteurs (Rovenich *et al.*, 2014; Jashni *et al.*, 2015; de Wit, 2016). Les champignons et oomycètes, lors de la colonisation de leurs hôtes respectifs, doivent nécessairement être armés pour pénétrer et diffuser au sein des cellules végétales. La progression entre les parois des cellules rend ces microorganismes sensibles aux réactions de défense de l'hôte. Ils doivent donc à la fois réaliser leur propagation entre les cellules tout en se défendant. Ainsi l'effecteur Pit2 d'*U. maydis*, a été montré comme étant important dans la

pathogénie car inhibant chez le maïs des protéases à cystéine dont l'activité est directement liée aux défenses associées à l'acide salicyllique (Mueller *et al.*, 2013). On peut également citer la protéine d'avirulence Avr2 de *Cladosporium flavum*, qui inhiberait les protéases apoplastique PIP1 et Rcr3 (Rooney *et al.*, 2005; Shabab *et al.*, 2008). Des rôles similaires pourraient s'appliquer à SP23 mais également à SP10, SP12 et SP16 si leur localisation était confirmée.

Ces observations ont donc mis en évidence des différences de localisation subcellulaire pour des SPs dont certaines pourraient être des protéines effectrices impliquées dans l'établissement symbiotique. Le fait que certaines emprunteraient les voies de sécrétions est un premier pas dans la validation de l'activité de leur peptide signal. Il faut garder à l'esprit que ces observations sont les résultats d'approches hétérologues dans lesquelles les SPs fongiques sont exprimées par la cellule végétale et qu'il n'est pas possible de définir si les localisations observées sont la résultante d'une rétention (si peptide signal non détecté ou absent) ou d'une sécrétion suivie d'une translocation dans la cellule végétale (avec l'exemple pris de SP2 qui est nucléaire). Pour mieux s'assurer de la sécrétion des SPs candidates, il aurait été possible de réaliser des approches d'immunodétection (pour des exemples, voir Doehlemann *et al.*, 2009; Plett *et al.*, 2011). De telles approches auraient également permis de préciser la cytolocalisation de ces protéines (apoplastiques ou dans la cellule hôte). Mais étant donné le nombre de candidats sans pouvoir préjuger de l'intérêt prioritaire de l'un d'entre eux, nous avons opté pour une approche d'expression hétérologue dans un organisme fongique pour cribler le caractère sécrétoire des différents SPs.

### **3.3.1.3-Essai de validation de la sécrétion par expression hétérologue dans le champignon *Colletotrichum higginsianum***

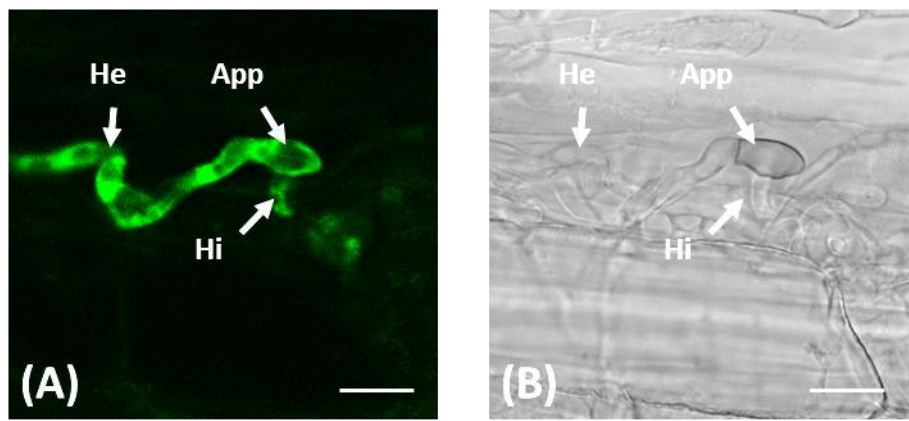
*Colletotrichum higginsianum* est un champignon ascomycète hémibiotrophe pathogène de l'arabette. Ce champignon peut être génétiquement transformé par agrobactéries (*A. tumefaciens*). Bien que *C. higginsianum* soit préférentiellement un pathogène foliaire, sa capacité à infecter les racines de *A. thaliana* (écotype col-0) a été exploitée (O'Connell *et al.*, 2004) afin d'observer la sécrétion et la translocation des différentes SPs au niveau racinaire (Takahara *et al.*, 2016). Nous disposons de différentes souches de *C. higginsianum* (souches 305970, 305635 et 063A) et de deux plasmides binaires, pBHT2-TEF-eGFP (fourni par le Pr.

Franco Nigro, Université de Bari, Italie), dérivé du plasmide pBHt2 (Mullins *et al.*, 2001; Mascia *et al.*, 2014) et pDht-MUT4-GFP (fourni par le Dr B. Dumas, LRSV, Toulouse), dérivé du plasmide pDht (Mullins *et al.*, 2001), ayant déjà été employé pour l'expression du facteur de transcription STE12 de *R. irregularis* chez *Colletotrichum lindemuthianum* (Tollot *et al.*, 2009). L'ADN-t de chaque vecteur comporte un gène rapporteur : la GFP pour le plasmide pDht-MUT4-GFP, et la eGFP (enhanced green fluorescent protein) pour le vecteur pBHt2-TEF-eGFP qui est une version dérivée améliorée de son homologue (Zhang *et al.*, 1996). Ces deux gènes sont sous le contrôle d'un promoteur fongique constitutif.

La première étape a été de déterminer parmi l'ensemble des combinaisons possibles « vecteur – souches », celle permettant d'obtenir le plus de transformants. Nous avons donc utilisé la capacité de chaque construction d'exprimer une protéine fluorescente pour cribler les transformants (**Figure 20-A**). Sur ce critère, le plasmide pDht-Mut4-GFP a été écarté au profit du plasmide pBHt2-TEF-eGFP qui a montré une meilleure capacité de transfection combinée à une meilleure expression de la GFP. De même, la souche 063A pour laquelle aucun transfectant n'a été observé quel que soit le plasmide utilisé a été abandonnée. Les conidies des champignons fluorescents ont ensuite été récupérées pour infecter des racines d'*A. thaliana* en condition *in vitro* (**Figure 20-B**).

**A**

<i>C. Higginsianum</i> (# souche)	Plasmides	
	pDht-Mut4-GFP	pBht2-TEF-eGFP
305970	+	+++
305635	+	++
063A	-	-

**B**

*C. higginsianum* souche 305970 / pBht2-TEF-eGFP

**Figure 20 : Test de transfection du champignon pathogène *Colletotrichum higginsianum* par différentes constructions plasmidiques exprimant la GFP. A :** Détermination de l'efficacité de transfection et du meilleur couple « souche-vecteur ». **B :** Observation de l'infection par microscopie confocale de racines d'*Arabidopsis thaliana* col-0 par *C. higginsianum* souche 305970 transfectée exprimant de manière constitutive l'eGFP. He : hyphes externes ; Hi : hyphes internes ; App : appressorium. Les barres d'échelle représentent 10  $\mu$ m.

Ces essais concluants nous ont donc encouragés à poursuivre la caractérisation des SPs dans ce système. Pour cela nous avons entrepris de modifier le plasmide pBht2-TEF-eGFP afin d'y insérer les gènes candidats fusionnés cette fois à l'eGFP. Malheureusement, des aléas techniques ne nous ont pas permis d'aboutir à temps : la carte de restriction associée au plasmide ne correspondait pas aux digestions enzymatiques contrôles réalisées. De plus, l'insertion des fragments ne pouvait s'effectuer que dans un site de restriction non unique du plasmide (présent deux fois). Bien qu'il fût essayé de procéder à insérer des mutations afin de rendre notre site d'intérêt unique, le temps a manqué pour mener à bien ces approches.

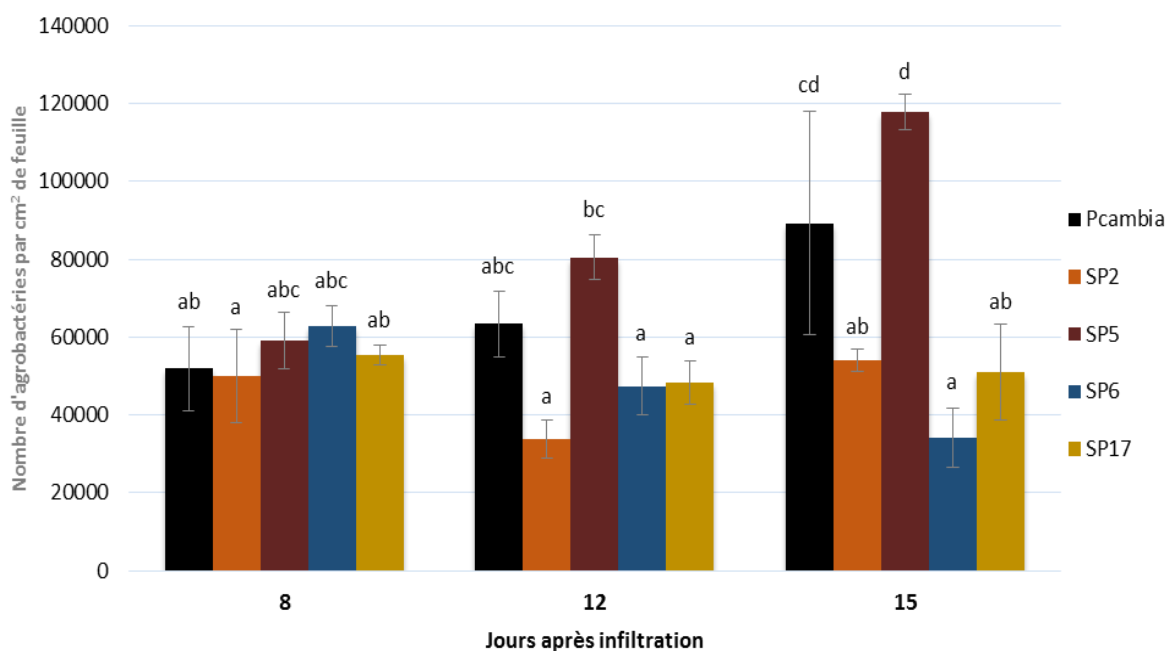
Notons enfin que la communauté scientifique émet de plus en plus de doute sur le fait que des SPs fusionnées à une protéine rapportrice de la taille de la GFP puissent être efficacement sécrétées par les champignons et éventuellement transloquées dans les cellules végétales, ou encore conserver un comportement naturel (Kleemann *et al.*, 2012; Tanaka *et al.*, 2014; Lo Presti *et al.*, 2016).

### **3.3.2-Phénotypage de l'action des SPs candidates sur l'établissement de la symbiose MA**

Différentes stratégies ont été déployées pour phénotyper l'incidence des SPs sur la symbiose MA. J'ai en premier lieu mis à profit les essais de transformation du tabac par agrobactéries pour définir une éventuelle inhibition du développement de ces mêmes agrobactéries, pouvant être indicatrice d'un effet sur la défense cellulaire végétale. Puis j'ai analysé l'aptitude mycorhizienne des différents transformants de *M. truncatula*. Enfin j'ai testé l'effet de l'apport exogène de certaines SPs synthétiques à la mise en place de la symbiose MA.

#### **3.3.2.1-Prolifération d'agrobactéries transformées dans le tabac**

De manière concomitante à la localisation subcellulaire des SPs dans les feuilles de tabac, j'ai analysé le comportement des agrobactéries ayant servi à infiltrer les tissus foliaires. En effet, dans l'hypothèse où certaines SPs auraient un rôle d'effecteur, il nous a semblé intéressant de définir si leur expression dans des tissus infiltrés par les agrobactéries pouvait avoir une incidence sur le développement de ces dernières. L'hypothèse de travail est que l'expression de ces effecteurs dans les tissus foliaires pourrait réprimer les mécanismes de défense de la plante et ainsi favoriser la prolifération des agrobactéries. Pour tester cela, des agrobactéries transformées avec le vecteur pCambia vide (témoin) ou avec les constructions d'intérêt dans le vecteur pCambia $\Delta$ DsRed, (SP2, SP5, SP6 et SP17) ont été infiltrées dans des feuilles de *N. benthamiana*, puis des disques foliaires de la zone infiltrée ont été prélevés à différents temps (8, 12 et 15 jours après infiltration) pour dénombrement. Une expérience représentative est représentée **Figure 21**.



**Figure 21 : Cinétique de croissance d'*Agrobacterium tumefaciens* transformées avec les constructions d'intérêt (*p35S::SP:citrine*) dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana* récoltées à 8, 12 et 15 jours après agroinfiltration.** Les histogrammes représentent les moyennes de chaque réplicat (n=3), les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne. Une ANOVA suivie d'une comparaison Post Hoc par le test de Tukey ont été utilisés ( $P < 0.05$ ).

Globalement, aucune différence n'a été observée entre chacune des constructions à 8 jours après infiltration. Des tendances apparaissent vers 12 jours où l'on distingue deux catégories. La première est composée des agrobactéries témoins (Pcambia vide) et comportant la construction SP5, qui montrent une prolifération des bactéries ayant servi à l'insertion du transgène dans ces feuilles. La seconde montre un fléchissement de cette croissance pour les constructions SP2, SP6 et SP17. Une différence significative est d'ailleurs visible avec la construction SP6. A 15 jours, cette tendance se confirme. La stagnation de croissance se poursuit pour les 3 constructions SP2, SP6 et SP17 alors qu'elle se poursuit de la même manière pour les agrobactéries témoins et SP5 là encore de manière significative. D'après ces profils, les bactéries où les feuilles de tabac expriment SP2, SP6 ou SP17 n'arriveraient pas à proliférer contrairement à celles où les feuilles expriment les constructions témoins et SP6, confirmant un effet négatif de ces SPs sur la prolifération bactérienne. Plusieurs hypothèses peuvent être faites. La première serait que ces SPs pourraient induire des mécanismes de défense chez le tabac qui interrompraient la croissance bactérienne. En effet, diverses études ont déjà montré l'effet positif des CMA sur la résistance des plantes à des pathogènes par



induction de la résistance systémique (Liu *et al.*, 2007; Campos-soriano & Segundo, 2012; Jung *et al.*, 2012; Zhang & Franken, 2014). Ces effecteurs putatifs fongiques pourraient également être la cible de protéines de résistance (R proteins) de l'hôte. Celles-ci reconnaîtraient la protéine effectrice ciblée et induiraient des mécanismes de défense comme cela est observé lors de l'immunité déclenchée par les effecteurs (ou Effector triggered immunity – ETI) (Gassmann & Bhattacharjee, 2012). Cette ETI s'accompagne généralement d'une réponse dite hypersensible (ou HR) qui prévient l'invasion par les pathogènes et le déclenchement de la maladie (Jones & Dangl, 2006; Kazan & Lyons, 2014). Cependant cette seconde hypothèse ne semble pas se vérifier car aucun évènement lié à une HR n'a été observé lors des différentes récoltes des disques foliaires.

Bien que cette approche ait fourni des résultats encourageant, nous n'avons cependant pas souhaité la poursuivre pour les autres candidats. En effet, à 12 et 15 jours où des différences apparaissent et se creusent, les feuilles infiltrées commencent à être en senescence générant un matériel biologique très hétérogène.

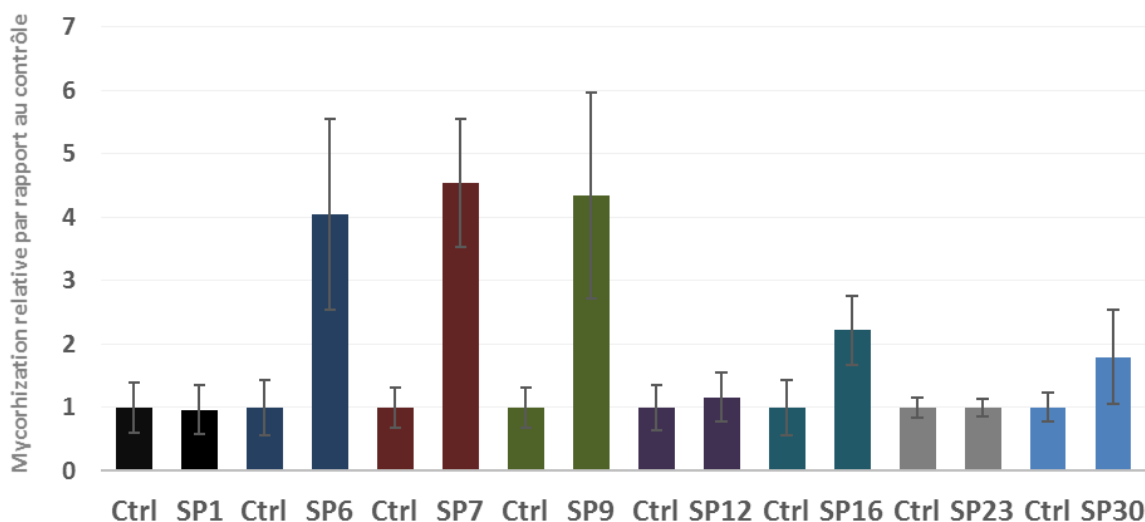
### **3.3.2.2-Implication de SPs dans la mycorhization**

Nous avons ensuite évalué l'impact des SPs sélectionnées dans l'établissement de la symbiose. Pour cela, nous avons récupéré et coloré les racines transformées des plantes chimériques ayant servi à déterminer la localisation subcellulaire des candidats pour pouvoir quantifier la présence du champignon dans les racines. Des résultats ont pu être ainsi obtenus pour SP1, SP6, SP7, SP9, SP12, SP16 et SP23 mais également pour SP29 et SP30 qui ont pu être analysées malgré la faible fluorescence observée dans les racines. A l'inverse, les racines exprimant SP2 et SP10, malgré une forte expression de la citrine, n'ont pu être obtenues en quantité suffisante pour pouvoir observer un effet de ces protéines sur la mycorhization. L'obtention d'un nombre optimum de réplicats biologiques est cruciale pour la réussite de ce type d'expérience. Au-delà de la difficulté d'obtenir des plantes composites en nombre pour certaines constructions, s'ajoute le problème de l'acclimatation des plantes lorsque ces dernières sont transférées d'un milieu gélosé stérile à un milieu plus sec confronté à des stress abiotiques et biotiques. De plus, le fait d'éliminer avant transfert les racines non transformées rajoute un stress supplémentaire, parfois fatal à la plante, et accentue également la variabilité existante entre les échantillons en termes de croissance (parties aériennes et racinaires). Pour

limiter cela, seules les plantes dont le développement apparaissait relativement homogène ont été analysées. Ceci explique pourquoi seuls 9 candidats ont pu être finalement analysés (Figure 22).

Influence de la surexpression de protéines sécrétées candidates (SPs) sur la mycorhization des racines chimériques

Contrôle	SP1	SP6	SP7	SP9	SP12	SP16	SP23	SP29	SP30
1±0,37		0,61±0,11							
1±0,23			0,91±0,29	1,50±0,66					1,79±0,75
1±0,36					1,16±0,39				
1±0,37		7,88±3,00	5,27±1,30	7,96±2,30		7,84±2,29			
1±0,16		1,65±0,44	0,71±0,40	0,48±0,14		0,56±0,25	1±0,14		
1±0,40	0,97±0,39						0,64±0,27		1,51±0,71
1±0,67	3,72±1,83								
1±0,31	0,87±0,71							0,12±0,07	
1±0,44		4,04±1,50				2,22±0,54		2,20±1,10	
1±0,41					0,97±0,38		0,07±0,03		
1±0,32			4,54±1	4,34±1,62					
Tendance	= (2/3)	+ (3/4)	+ (2/4)	+ (2/4)	= (2/2)	+ (2/3)	= (2/3)	=	= (2/2)



**Figure 22 : Variation du taux de mycorhization de racines de *M. truncatula* transformées par les constructions d'intérêt (*p35S::SP:citrine*) par rapport au témoin (vecteur vide).** Dans le tableau figurent les taux de mycorhization pour chaque construction ( $\pm$  Erreur standard à la moyenne), normalisés par rapport au témoin correspondant à chaque expérience. En rouge sont mentionnées les expériences représentatives utilisées pour générer la représentation graphique en dessous du tableau récapitulatif. Du fait de la forte variabilité observée, aucune représentation n'a pu être établie pour SP29. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne. Ctrl : témoin, représente le vecteur pCambia2200 Gold vide exprimant la DsRed. p35S : promoteur 35S.

Sur les 9 constructions présentées, quatre (SP6, SP7, SP9 et SP16) ont un effet globalement stimulateur de la mycorhization des racines chimériques, avec une tendance plus marquée pour SP6 malgré une variabilité importante au sein des échantillons. De manière intéressante,

trois d'entre elles sont des SCRs (SP6 et SP7 et SP16), avec SP6 et SP7 très proches en termes de séquence protéique (90% d'identité protéique). La dernière SP, (SP9) est une protéine courte (<200 aa) prédite comme possédant une NLS. Ces observations laissent penser que ces quatre SPs pourraient correspondre à des effecteurs putatifs.

Concernant les autres SPs, elles ne semblent pas avoir d'impact sur la croissance fongique au sein des racines. Pour rappel, SP12 est une SCR ; SP23 est une longue protéine avec une NLS prédite et contenant des motifs internes répétés ; SP29 est une longue protéine sans annotation, et enfin SP30 est une subtilisine. L'absence d'effet sur l'établissement de la symbiose n'est toutefois pas rédhibitoire pour la suite de leur caractérisation. En effet, ces expérimentations visent à dégager des candidats dont la surexpression impacterait le développement symbiotique. On ne peut exclure l'action d'une régulation post transcriptionnelle ou traductionnelle dans les racines limitant les effets des constructions. Mais avant tout, ces SPs étant elles-mêmes synthétisées par le champignon présent dans les racines, il est fort probable que leur action optimale est déjà atteinte par le champignon seul. Dans ce cas, seules des approches de « silencing » via l'hôte (mentionnées en fin de chapitre) pourraient révéler l'importance d'une SP dans l'établissement et le maintien du système, mais la difficulté de ces approches à mettre en œuvre sur certains gènes (Casacuberta *et al.*, 2015) combinée à un nombre important de candidats nous a fait privilégier des approches préalables.

A ce stade, deux approches différentes confirment une activité de l'effecteur putatif SP6 : une surexpression dans les racines de *M. truncatula* stimule la mycorhization et l'expression dans les feuilles de tabac inhibe la croissance des agrobactéries. De par cette double activité, cette protéine pourrait donc jouer un rôle effecteur dans la symbiose MA.

### **3.4- Apport exogène de peptides**

Une des grandes difficultés rencontrée dans les expérimentations précédentes aura été la variabilité importante du taux de mycorhization sur des plantes chimériques. Or, au cours de mes travaux de thèse, des membres de l'équipe ont mis en évidence l'efficacité d'application exogène à des plantes de petits peptides synthétiques, montrant l'aptitude de tissus racinaires

à absorber des peptides (Lauressergues *et al.*, 2015). Ainsi l'ajout exogène de SPs (sans leur peptide signal) a été envisagé comme un moyen de limiter la variabilité des systèmes chimériques. Il est en effet plus facile de synchroniser des plantes ayant poussé directement à partir de graines germées. De plus, l'ajout de peptide synthétique dans leur forme native évite les biais déjà discutés sur les SPs fusionnées avec la citrine. Enfin, la validation d'un effet par apport exogène ouvrirait la possibilité d'une exploitation de ces peptides en agriculture. Les SPs produits pourraient être incorporées à des bio-engrais à base de mycorhize pour un épandage en champ, afin de stimuler l'établissement de la symbiose.

### **3.4.1-Choix des candidats**

Etant donné le coût de synthèse lié au degré de pureté (>97% ici) et à la longueur de la séquence, 6 SPs de petite taille ont été sélectionnées : SP1, SP2, SP3, SP4, SP5 et SP8. SP4 et SP8 n'ont jamais été mentionnées encore dans cette étude du fait qu'elles n'ont pas été clonées jusqu'à présent. Leur séquence présente un site de clivage putatif de type KRXA (Lysine puis Arginine suivie de n'importe quel acide aminé, puis Alanine) pour SP4 et KR pour SP8 (Mueller *et al.*, 2008). Ainsi, deux versions ont été commandées : une version pleine longueur des peptides ainsi que leur version potentiellement tronquée en aval des sites de clivage respectifs (notées SP4S et SP8S). Parmi ces SPs, seule SP1 a été étudiée en surexpression racinaire. Pour suivre leur absorption par les racines, ces SPs ont également été commandés sous une forme fluorescente par couplage avec la 5(6)-carboxyfluoresceine (**FAM**).

### **3.4.2-Essais des peptides sur l'établissement de la symbiose MA.**

La quantité commandée pour chaque peptide étant limitée (4 mg), il nous a fallu imaginer une procédure d'essai 1) consommant peu de peptides 2) où la plante en condition de mycorhization pourrait facilement avoir accès à ces peptides. Nous avons donc privilégié une culture des plantes dans un système dit en « falcon coupé ». Des plantules de *M. truncatula* sont mises en culture avec ce système dans du milieu de culture inoculé avec des spores de *R. irregularis* pour 3 ou 4 semaines. Durant cette période, les plantules sont arrosées tous les deux jours avec une solution peptidique à 100 nM. Les plantes mycorhizées sont ensuite récupérées pour observation de l'établissement symbiotique. Contrairement à l'expérience 1

où le taux de mycorhization global a été évalué, nous avons voulu dénombrer ici le nombre de point d'infection ainsi que les événements arbusculaires associés à chaque hyphes pénétrant, cela étant rendu possible du fait d'une culture de plus faible durée (analysé à partir de la seconde expérience). Nous pouvons ainsi évaluer si les peptides ajoutés dans le milieu pouvaient favoriser la pénétration fongique ainsi que la mise en place de l'interface symbiotique (**Table 10**).

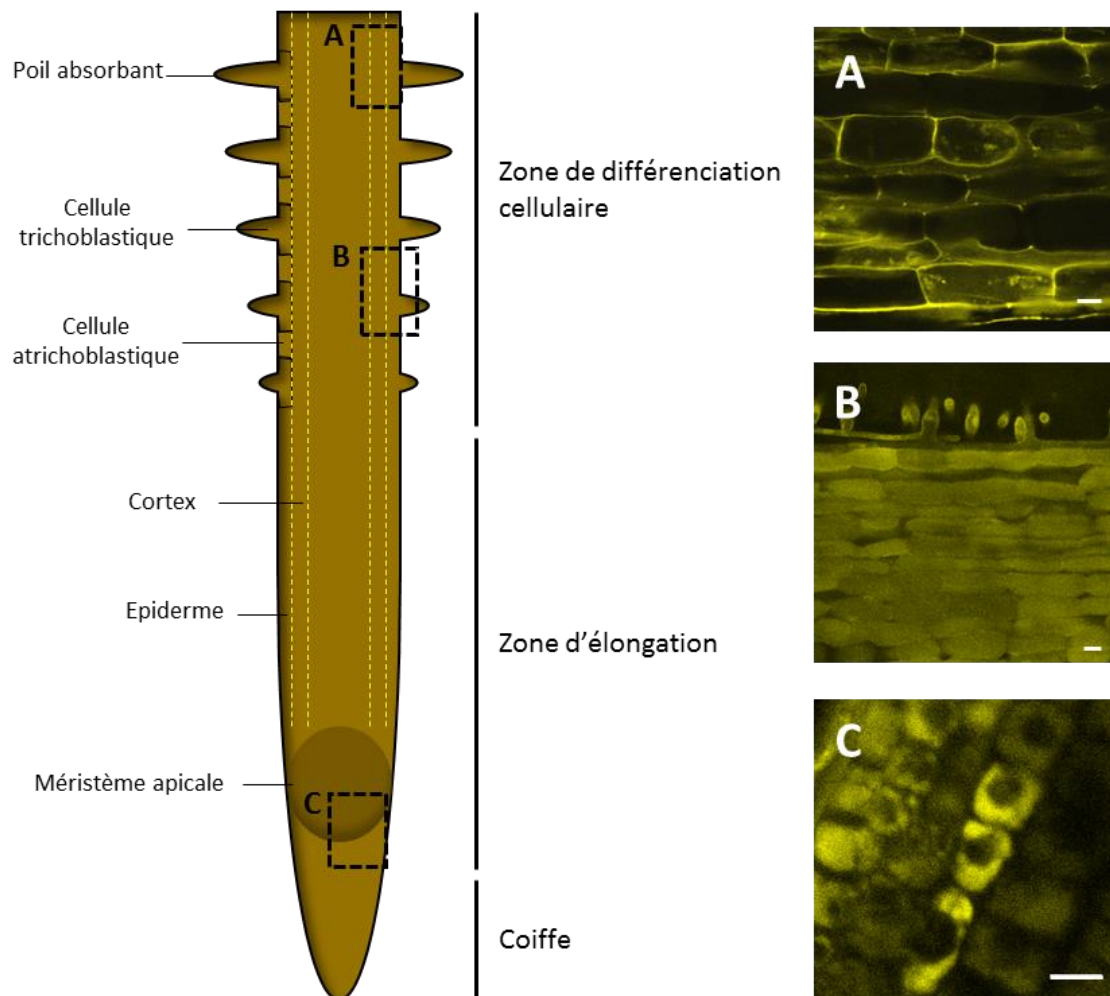
	Contrôle		SP1		SP2		SP3		SP4S		SP4		SP5	
	Pts Inf.	Arb.	Pts Inf.	Arb.	Pts Inf.	Arb.	Pts Inf.	Arb.	Pts Inf.	Arb.	Pts Inf.	Arb.	Pts Inf.	Arb.
Expérience 1	19,62 ±6,66	n.d	21,44 ±5,29	n.d	42 ±13,59	n.d	n.d	n.d	15,55 ±6,03	n.d	12 ±2,69	n.d	n.d	n.d
Expérience 2	42 ±7,01	35,1 ±6,40	51,5 ±9,36	45,5 ±8,88	42,6 ±8,54	34,80 ±7,3	39,1 ±11	32,40 ±9,19	n.d	n.d	n.d	n.d	44 ±12,61	38,6 ±12,22
Expérience 3	39,10 ±4,11	35,27 ±3,71	29,75 ±4,04	27,55 ±3,76	35,68 ±3,68	32,53 ±3,43	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

**Table 10 : Estimation de l'impact d'un ajout de peptide en solution exogène sur la mise en place des processus symbiotiques.** Les données représentent les dénombrements des point d'infections (Pts inf.) ainsi que les événements arbusculaires qui leurs sont associés (Arb.) sur l'ensemble du système racinaire ( $\pm$  Erreur standard à la moyenne). S : signifie que cette version du peptide est tronquée et que seule la partie aminée en aval du site de clivage potentiel a été synthétisée. Le contrôle correspond à une solution d'arrosage sans présence de peptides. Une ANOVA n'a pas permis d'observer des différences significatives (n=8-10 pour les expériences 1 et 2 ; n=20 pour l'expérience 3).

Ces essais concluant ma période de thèse, 3 expériences ont pu être traitées jusqu'à présent. Les deux versions SP8 et SP8S n'ont pu être testées encore. La première expérience a montré un effet de SP2 qui induit une colonisation doublée par rapport au témoin et aux autres SPs (mais non significativement  $P=0,057$ ). L'ajout de peptides SP1 et des deux versions SP4S et SP4 ne semble pas favoriser la pénétration par *R. irregularis*. Concernant ces deux derniers, rien ne semble différencier ces deux versions. Les seconds essais n'ont pas permis de confirmer l'effet bénéfique de SP2, ni de dégager un effet des SPs nouvellement testées (SP3 et SP5) tant sur les étapes de pénétration que sur le développement des interfaces symbiotiques. Enfin, la dernière expérience traitée dans le but de confirmer une tendance pour SP1 et SP2 n'ont malheureusement pas montré de différences par rapport au témoin.

### 3.4.3-Confirmation de l'absorption par les racines

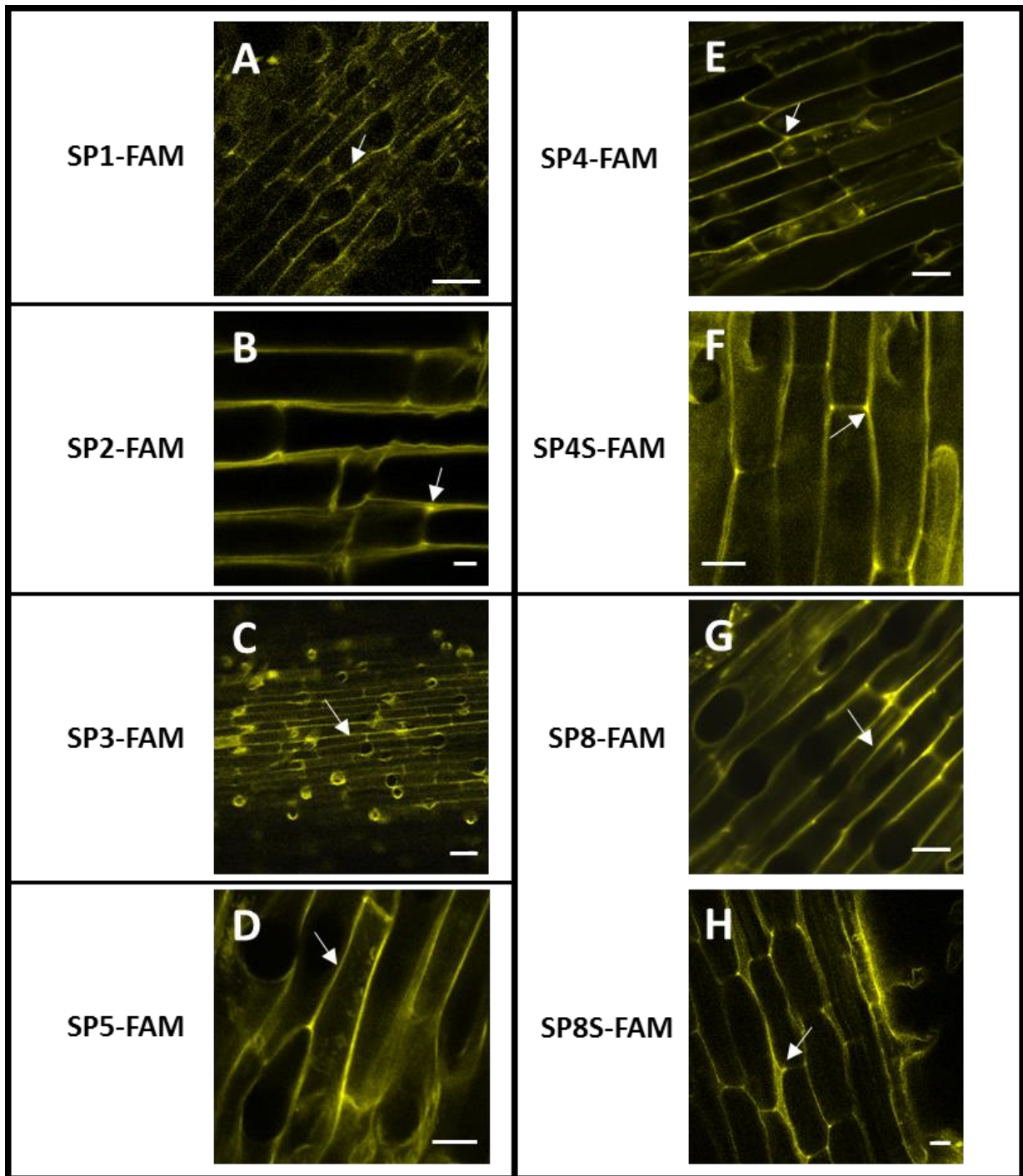
Pour vérifier l'aptitude des SPs précédentes à diffuser dans les cellules végétales, nous avons exploité les peptides couplés à la FAM. Pour cela, des racines de plantules de *M. truncatula* ont été incubées 2h dans une solution témoin (FAM seule) ou peptidique à 20  $\mu\text{M}$  puis observés au microscope confocal (**Figure 23**).



**Figure 23 : Variabilité de localisation de la FAM dans les différentes zones cellulaires d'une racine latérale de *M. truncatula*.** Les images A, B et C correspondent aux localisations A, B et C respectives figurant sur le schéma (zone en pointillée). La FAM est visualisée en jaune. Les localisations ont été analysées dans les cellules de surface racinaire. Les barres d'échelle représentent 10  $\mu\text{m}$ .

Les localisations ont été essentiellement recherchées au niveau des cellules épidermiques - les cellules corticales n'étant que faiblement marquées - dans les racines latérales, lieu préférentiel de pénétration des CMA (Fusconi, 2014). Les essais de contrôle avec la FAM seule ont mis en évidence trois zones racinaires présentant des marquages variés. La FAM a été

observée majoritairement dans la vacuole depuis la coiffe jusqu'à la fin de la zone d'élongation cellulaire. Lors du début de la zone de différenciation cellulaire avec apparition des premières cellules atrichoblastiques, le signal est aussi retrouvé dans les poils absorbant, dans les vacuoles, mais également avec un marquage au niveau péricellulaire. Enfin, dans la zone pilifère plus développée, on observe un estompement du signal vacuolaire au profit d'un marquage intercellulaire bien plus marqué, validé comme étant pariétale par plasmolyse (**Annexe 3**). Pour l'étude des peptides d'intérêt, nous avons décidé de privilégier les observations dans la zone de différenciation, qui correspond à la zone de pénétration fongique (**Figure 24**).



**Figure 24 : Localisation subcellulaire des différentes constructions SP-FAM dans les cellules épidermiques de la zone pilifère.** Les peptides marqués avec la FAM figurent en jaune. Les flèches représentent un marquage pariétal. Barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$  pour les images B et H ; 20  $\mu\text{m}$  pour les images D, E, F et G ; 50  $\mu\text{m}$  pour les images A et C.

Nos observations ont montré pour l'ensemble des candidats analysés une présence pariétale quasi exclusive dans la zone pilifère confirmée par plasmolyse (**Annexe 4**). Par ailleurs, quelques rares marquages de noyaux ont été observés pour SP2. Une rétention des SPs dans



l'apoplasme pourrait révéler une zone préférentielle d'action ou signifier une absence de capacité à se transloquer de manière autonome dans les cellules. Pour vérifier cela, des observations complémentaires pourraient être menées sur des racines mycorhizées traitées avec les SPs, afin d'évaluer si la présence fongique pourrait permettre leur relocalisation dans les cellules de l'hôte. Enfin, les cellules corticales sont faiblement marquées après 2h d'incubation en présence des peptides. Nous avons essayé d'allonger ce temps à 24h pour quelques candidats (SP1 et SP2). Nous avons ainsi pu observer un signal plus conséquent dans les cellules corticales, démontrant la capacité de ces peptides à diffuser en profondeur dans les tissus racinaires.

Pour SP1 et SP2 dont nous avons préalablement analysé la localisation après sur-expression racinaire dans des racines non mycorhizées (**Figure 19**), nous pouvons confronter leurs différentes observations dans ces deux conditions. En omettant les localisations dans les voies de sécrétion du fait d'un apport exogène, le marquage vacuolaire de SP1 n'est pas retrouvé ici. Pour SP2, cette dernière a été montrée comme étant essentiellement nucléocytoplasmique (**Figure 19**). Cette observation a certes été observée avec les peptides SP2-FAM mais de manière moins fréquente. Le fait que certaines différences puissent exister entre ces deux approches n'est en rien surprenant. En effet, dans un cas, la synthèse de la protéine est dépendante de l'expression du promoteur 35S (pouvant engendrer des différences de localisation comme expliqué plus haut), et peut être également soumise à des modifications post-transcriptionnelles puis traductionnelles pouvant différer entre plantes et champignons (Faye *et al.*, 2005) et modifier l'action et/ou la localisation de candidats. Concernant une relocalisation, une étude a ainsi démontré dans des cellules animales que des mutations engendrant une absence de modifications post-transcriptionnelles sur la protéine Ral entraînent sa relocalisation de la membrane cellulaire au cytosol (Matsubara *et al.*, 1997). Une autre étude, s'intéressant à des protéines des champignons pathogènes biotrophes *Uromyces fabae* et *Uromyces striatus*, respectivement *Uf-RTP1p* et *Us-RTP1p*, a montré par Western-blot que ces protéines étaient transloquées dans les cellules végétales sous forme N-glycosylées (Kemen *et al.*, 2005). Les peptides synthétiques étant quant à eux vierges de ces modifications, ceci pourrait expliquer certaines différences.

En conclusion et malgré le fait qu'aucun candidat d'intérêt ne puisse être ressorti des premières analyses, nous pouvons dire de cette approche nous aura permis 1) de montrer que

les peptides sont bien capable de diffuser dans les couches cellulaires racinaires et 2) que la variabilité des réponses mycorhiziennes semble être plus limitée du fait d'une plus grande homogénéité du matériel biologique et d'un apport contrôlé en peptide, ce qui est prometteur pour une éventuelle application en agriculture.

## 4-Travaux à venir

### 4.1-Diminuer l'expression de gènes fongiques cibles

Les différentes approches testées visant à favoriser la mycorhization par augmentation de la concentration de protéines d'intérêt n'ont pas permis de mettre en évidence un phénotype mycorhizien suffisamment fort. Des approches de « silencing » permettraient de mieux juger de l'importance de ces protéines pour la mise en place de processus biologiques. Ces approches consistent à faire exprimer par l'intermédiaire de la plante hôte des constructions visant à cibler les transcrits d'origine fongique pour dégradation. Deux approches sont développées dans l'équipe : la diminution de l'expression d'un gène soit induit par l'hôte (Host-induced gene silencing ou HIGS) soit par un virus inoculé dans l'hôte (Virus host-induced gene silencing ou VHIGS).

#### 4.1.1-Application du HIGS

La première application de cette approche chez les CMAs date de 2011. Helber *et al.* y ont eu recours afin de démontrer l'importance du gène *MST2* de *R. irregularis*, codant pour un transporteur de sucre simple à haute affinité, dans la mise en place de la symbiose. En effet, une diminution de l'expression de ce gène affecte la capacité de *R. irregularis* à pénétrer dans la racine et de former des arbuscules. Bien que très utile, peu d'études appliquant le HIGS aux CMAs ont été publiées à ce jour (Tsuzuki *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2016).

Dans les derniers mois de thèse, nous avons cependant décidé d'appliquer le HIGS à l'étude d'un candidat (SP6) ayant montré une tendance à favoriser la propagation fongique dans les racines et limitant le développement des agrobactéries dans les feuilles. Pour cela, une construction de l'ORF correspondante en antisens-sens a été générée par Golden gate dans *Pcambia* exprimant la *DsRed* et sous contrôle d'un promoteur 35S (notée SP6-HIGS). Les

plantes chimériques témoins (pCambia) ou exprimant notre vecteur comportant la construction HIGS (SP6-HIGS) ont ensuite été mycorhizées et prélevées à deux temps après inoculation (30 et 62 jours) Ces deux temps permettraient d'observer respectivement des différences sur la capacité du champignon à pénétrer l'hôte et ensuite de se propager dans les racines. Des analyses par RT-qPCR nécessaires pour juger de l'activité des constructions sur l'extinction des transcrits cibles sont en cours.

#### **4.1.2-Application du VHIGS**

Le VIGS a été montré comme étant plus rapide que le HIGS pour observer un phénotype et permet désormais de cibler un gène de CMA (Sahu *et al.*, 2012; Kikuchi *et al.*, 2016). Nous avons donc entrepris une campagne de clonage afin d'obtenir des constructions virales exprimant l'ensemble des fragments d'intérêt. Les ADNc viraux indispensables à la réplication et la propagation du virus *in planta* ont été insérés dans deux vecteurs binaires afin d'inoculer la plante hôte par *Agrobacterium*, et modifiés pour pouvoir y cloner les fragments d'intérêts (Ratcliff *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002a,b). Deux vecteurs sont ainsi générés, TRV1 qui comporte les éléments nécessaires au mouvement viral et TRV2 qui comporte des gènes codant des protéines de capsid ainsi qu'un site de clonage pour insérer les fragments de gènes d'intérêt (Senthil-Kumar & Mysore, 2014). A ce jour, nous disposons des constructions pour les candidates SP1 et SP2, (construction TRV2-SP). Les constructions pour les autres SPs candidates sont actuellement en cours. Ces constructions TRV1 et TRV2-SP serviront ensuite à transformer *A. tumefaciens* avant inoculation de feuilles de *N. benthamiana* avec les deux plasmides. A ce stade, deux approches sont possibles. Le virus se propageant de manière systémique dans l'ensemble de la plante des feuilles aux racines, nous pouvons 1) soit inoculer le tabac avec *R. irregularis* une fois le virus présent dans les racines ou 2) attendre que la mycorhization s'établisse avant d'inoculer le virus. La première approche viserait à voir si une SP pourrait intervenir dans un stade précoce de pénétration du champignon une fois en contact avec les tissus exprimant les siRNAs. La deuxième approche permettrait d'observer le comportement du champignon si une des SPs était ciblée. La mycorhization étant régie par une dynamique de dégénération et de développement successif des structures fongiques, il pourrait ainsi être caractérisé un stade où une SP agirait.

# Conclusion générale et perspectives

Mes travaux de thèse ont eu pour objectifs 1) de définir de façon précise selon les données génomiques et transcriptomiques disponibles le répertoire de SPs de *R. irregularis* DAOM197198, 2) d'analyser la cytolocalisation de plusieurs de ces SPs, 3) de tester l'efficacité de candidats effecteurs sur l'établissement de la symbiose, notamment en vue d'applications industrielles. Il s'agit de travaux précurseurs de sélection de candidats, travail long et fastidieux d'analyse et de criblage. Le temps imparti à un travail de thèse n'a pas permis de poursuivre les pistes prometteuses de travaux listées en perspectives dans le bref bilan conclusif.

L'analyse du sécrétome à partir de données génomiques existantes couplées à des données d'expression RNAseq a permis de mettre en évidence l'expression de gènes codant pour des SPs à différents stades de la biologie du champignon. De ces analyses, il en ressort qu'il existe une proportion importante de SPs exprimées quel que soit l'hôte, alors que certaines SPs pourraient n'être exprimées que dans certaines interactions, ou durant des étapes à trop faible durée non incluses dans nos données transcriptomiques. Parmi ces SPs, plusieurs peuvent être proposées comme des effecteurs putatifs de la symbiose. Celles surexprimées de manière non spécifique pourraient avoir une action générique alors que celles spécifiques à un/certains hôtes interviendraient dans le fitness à l'hôte.

Une analyse comparative avec un Glomeromycète phylogénétiquement distant, *G. rosea*, a permis de mettre en lumière un faible recouvrement des SPs entre les deux espèces. A la différence de *R. irregularis*, *G. rosea* posséderait davantage de protéines spécifiques d'un hôte, ce qui est à mettre en lien avec le fait que ce champignon possède un spectre d'hôte plus limité. Nous avons identifié un groupe restreint de SPs similaires dans les deux CMAs et communément surexprimées dans les différents hôtes testés. Ces SPs pourraient être des clés d'entrée partagées par l'ensemble des CMAs pour la colonisation d'hôtes variés. La définition des répertoires de gènes chez des Glomérromycètes représentatifs de la diversité des clades phylogénétiques permettra de confirmer ou non la présence d'un sécrétome cœur nécessaire pour l'invasion de la plupart des espèces végétales. Il faut noter toutefois que le critère de similarité de séquence se prête peu à l'analyse comparative d'effecteurs. Il est remarquable

de constater que les séquences primaires des effecteurs sont peu conservées dans la phylogénie des champignons, bien qu'ils puissent agir sur des cibles identiques : la simple conservation de séquence ne tient pas compte du fait que les interactions peptides-ligand mises en jeu dans ces perturbations de cibles par les effecteurs font intervenir des liaisons électrostatiques qui dépendent des profils d'hydrophobicité et autres paramètres physico-chimiques dépendant des structures 3D de ces peptides, mais pas strictement d'acides aminés spécifiques. Or, il n'existe pas encore d'outils informatiques permettant de prédire les comportements *in cellulo* de peptides.

Durant mes travaux, notre choix s'est porté sur l'analyse de SPs de *R. irregularis* non spécifiques montrant une forte sur-expression lors de la colonisation de la plupart des hôtes. Un groupe de 33 SPs a ainsi été identifié sur la base des données transcriptomiques, parmi lesquelles un nombre important de petites SPs qui pourraient correspondre à des protéines effectrices putatives. Ce critère de sélection *a priori* – forte surexpression dans différents hôtes – est supposé permettre de révéler les acteurs majeurs intervenant dans l'établissement de la symbiose. Il est toutefois raisonnable de noter que ce critère n'est pas une preuve absolue : comme discuté en introduction les rôles des SPs sont multiples, et les SPs conservées pourraient ne pas avoir d'effet sur l'hôte mais une autre fonction d'importance pour les CMA. On ne peut donc écarter la présence de SPs qui n'ont aucun effet sur l'hôte dans ce jeu de 33 SPs.

Les analyses fonctionnelles portant sur un nombre plus restreint de candidats ont permis de caractériser SP6 comme étant une protéine effectrice potentielle de la symbiose de par son rôle d'inhibition de la prolifération des agrobactéries mais favorisant l'établissement de la symbiose MA. Sur ce dernier point, trois autres SPs (SP7, SP9, SP16) ont également montré des aptitudes intéressantes. Ainsi, la poursuite de ce travail consistera à évaluer l'importance de ces protéines pour la mise en place des processus symbiotiques. Pour cela, des approches d'extinction de l'expression des gènes correspondants, pour lesquels nous possédons déjà les constructions seront employées. De même, la synthèse des peptides correspondant pour une application exogène pourra être également testée. Sur ce point, il sera pertinent de tester l'effet de l'ajout de ces peptides non seulement sur la mycorhization de plantes en culture en

pot, mais également dans des systèmes *in vitro* pour observer les effets sur 1) la mise en place de la symbiose et 2) la production d'inoculum *in vitro*.

Des SPs n'appartenant pas à notre liste de candidats ont également attiré notre attention. La découverte de lipases fongiques potentiellement sécrétées dans le génome de *R. irregularis*, et dont certaines présentent une forte induction d'expression *in planta*, pourrait être une piste pour expliquer l'absence d'enzyme de synthèse des acides gras (FAS) chez ces champignons. Une hypothèse pourrait être que le produit de cette FAS, le palmitate (C16:0) pourrait être recruté chez l'hôte après sécrétion de ces SPs dans les cellules végétales mettant ainsi en évidence des effecteurs impliqués dans le détournement trophique. Il serait intéressant de tester l'action stimulatrice du métabolisme lipidique de l'hôte sur la production *in vitro* du champignon.

Bien que nous nous soyons intéressés ici exclusivement à des SPs dont l'expression est fortement induite *in planta*, il en est d'autres qui ont été montrées comme étant fortement exprimées dans les ERMs. Or, ces ERMs forment un compartiment fongique spécifique, par les étapes développementales ou les fonctions qu'ils accomplissent comme la formation de nouvelles spores, le recrutement de nutriments ou la colonisation de nouveaux hôtes. En effet, les ERMs ont pour particularité d'être plus agressifs que les hyphes issus de spores germées pour la colonisation de nouveaux hôtes. Des SPs préférentiellement exprimées dans ces hyphes pourraient ainsi participer à cette pénétration facilitée, et pourraient être exploitées pour faciliter la mise en place de la symbiose et/ou accentuer le développement du réseau mycélien et l'interconnection des plantes entre elles.

Pour terminer, l'existence de SPs spécifiques d'hôte est également une piste d'intérêt pour développer des stimulants sélectifs de symbiose MA. En effet, la surexpression de certains SPs dans *Brachypodium distachyon* et non dans les autres plantes étudiées laisse entrevoir le développement de bio engrais adaptés aux cultures céréalières, à base de spores de CMA enrichi avec une ou des SPs sélectives « Monocot », favorisant cette interaction durant la levée plutôt que sur les dicotylédones adventices. Le développement de tels produits nécessitera de valider la spécificité d'action non seulement sur l'hôte, mais aussi sur les microorganismes afin de vérifier qu'un apport exogène ne favoriserait pas l'interaction avec des microorganismes pathogènes biotrophes des cultures.



# Matériels et Méthodes

## 1-Matériel biologique

Les graines de *Medicago truncatula* (Jemalong A17) ont été fournies par le Dr Jean-Marie Prosperi (Cirad, Montpellier, France). Leur stérilisation comprend une étape de scarification des graines dans une solution d'acide sulfurique concentrée, puis 5 rinçages dans de l'eau osmosée. Les graines sont ensuite stérilisées par passage dans de l'hypochlorite de sodium à 2,4 % durant 3 min puis rincées en condition stérile dans de l'eau milli-Q 5 fois de suite. Les graines sont ensuite étalées sur milieu gélosée, eau / Agar (Sigma #A9799) à 10 g/L puis mise à germer sur l'envers à l'obscurité durant 5 jours à 4°C.

Les spores stériles de *Rhizophagus irregularis* DAOM197198 ont été fournies par la société Agronutrition (Labège, France).

## 2-Clonage des gènes candidats

### 2.1-Synthèse ADNc

Les ARNs totaux de racines de plantes mycorhizées ont été extraits avec le kit RNeasy Mini (Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur, puis quantifiés par spectrophotométrie (Nanodrop DN-1000 - Labtech). Une quantité de 1 µg d'ARN préalablement traité à la DNase RNase-free RQ1 (Cat. #M6101 de Promega) a été utilisée pour la synthèse de d'ADNc en utilisant la reverse transcriptase M-MLV (Promega) suivant les recommandations du fournisseur.

### 2.2-Génération d'*Escherichia coli* / Agrobactéries thermocompétentes

Des cellules d'*E. coli* DH5α sont pré-cultivées sur la nuit dans du milieu LB à 37°C sous agitation. Une sous-culture est ensuite effectuée à 37°C sous agitation à partir de 1 mL de la suspension initiale dans 500 mL de LB, jusqu'à ce que la densité optique à 600nm (DO<sub>600</sub>) atteigne une valeur comprise entre 0,25 et 0,3. La croissance des bactéries, en phase exponentielle de croissance, est interrompue par traitement dans la glace durant 15 min avant collecte par



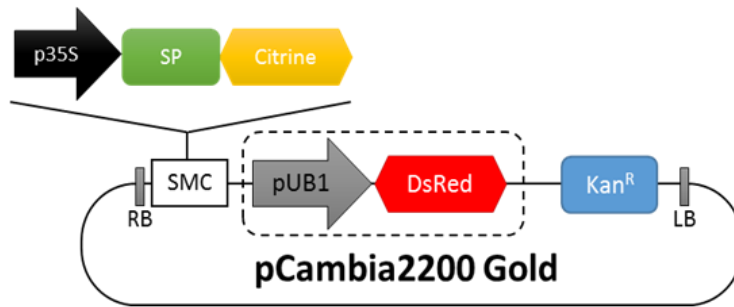
centrifugation 4000 rpm durant 10 min à 4°C. Le culot est repris dans du CaCl<sub>2</sub> 0,1 M froid puis maintenue à ce stade pour 30 min, la suspension bactérienne re-centrifugée comme décrit précédemment, et le culot repris dans 0,1 M de CaCl<sub>2</sub> froid contenant 15% de glycérol. Après congélation dans l'azote liquide, les bactéries sont conservées à -80°C.

Les Agrobactéries sont pré-cultivées sur la nuit dans du milieu LB (additionné de Rifampicine 20 µg/mL) à 28°C sous agitation. La suspension cellulaire est alors repiquée à 1% dans du milieu LB à 28°C sous agitation jusqu'à obtention d'une DO<sub>600</sub> comprise entre 0,5 et 1. La croissance est stoppée par mise en contact de la culture 15 min dans la glace. La suspension bactérienne est ensuite centrifugée 5 min à 3000 rpm, puis le culot est repris dans une solution froide de CaCl<sub>2</sub> 20 mM contenant 10% de glycerol, congelée dans l'azote liquide avant conservation à -80°C.

### **2.3-Clonage des gènes candidats par Golden Gate**

Les ADNc de racines de *M. truncatula* mycorhizées sont utilisés comme matrice pour le clonage de gènes candidats (Table S1). Les PCRs d'amplification ont été réalisées à partir d'1 µL avec la GoTaq polymérase (Promega). Suivant les recommandations du fournisseur, le volume de réaction utilisé est de 25 µL. Les conditions de PCR utilisées sont les suivantes : 95°C, 1 min ; [95°C, 30s ; 56°C, 30s ; 72°C, 30s à 2min suivant la longueur du fragment] x 32 cycles, 72°C, 7 min. Le nombre de cycle varie fortement en fonction de l'abondance du transcrit. Ensuite, 100 ng de produit PCR sont insérés dans le vecteur pGEM-T easy® de Promega, au niveau du gène exprimant la β-galactosidase (lacZ) suivant les recommandations du fournisseur. Le gène obtenu ligué dans le vecteur (noté pGEM-T::gène) est utilisé pour la transformation de cellules d'*Escherichia coli* DH5α thermocompétentes. L'ADN et les bactéries sont délicatement mélangés puis conservés dans la glace durant 30 min avant choc thermique. La solution est ensuite mise dans de l'eau chauffée à 42°C durant 45 s puis directement placée dans la glace durant 1 min. La suspension bactérienne est ensuite reprise dans 900 µL de milieu LB durant 1 h pour reprise de la croissance puis étalée sur milieu sélectif LB + 50 µg/mL de X-Gal + 50 µg/mL d'Ampicilline jusqu'à apparition des premières colonies à 37°C. Les colonies transformées (n'exprimant plus le gène lacZ) apparaissant blanches sont récupérées pour confirmation de l'intégration du gène candidat. Pour cela une PCR est effectuée avec ces colonies en utilisant les amorces T7 et SP6 situées de part et d'autre du site de clonage. Le

programme utilisé est : 95°C, 5 min ; [95°C, 30 s ; 56°C, 30 s ; 72°C, 2 min] x 26 cycles ; 72°C, 7 min. Les plasmides validés d'après la longueur de l'amplicon sont ensuite récupérés (Wizard Plus SV Miniprep DNA purification system, Promega) puis séquencés en utilisant les amorces T7 et SP6. Après validation de la séquence de l'insert, les plasmides pGEM-T::gène (séquences validées) ; pGEM-T::p35S ; pGEM-T::Citrine sont mis en contact avec le vecteur accepteur pCAMBIA2200 Gold vecteur modifié n'exprimant plus la DsRed (Fliegmann *et al.*, 2013) pour digestion et ligation afin d'obtenir la construction *p35S:SP:citrine* (**Figure S1**). Une quantité de 100 ng de chaque plasmide compatible pour le Golden Gate décrits précédemment sont mélangés avec 1 µL de tampon de ligase (Promega), 0,75 µL de T4 DNA ligase (Promega), 0,25 µL d'enzyme de digestion pour génération d'extrémités cohésives BsaI (NEB) et de l'eau afin que le volume de réaction soit de 10 µL. Les paramètres de cycles de digestion/ligation sont les suivants : [37°C, 30 min ; 16°C, 30 min] x2 ; 50°C, 20 min puis 80°C, 5 min. Les constructions pCambia *p35S::gène:citrine* ont ensuite servi pour la transformation de cellules d'*E. coli* DH5α thermocompétentes. Après vérification de l'insert dans le plasmide pCAMBIA (vérification avec les amorces Pro35S et Ter35S) par PCR sur colonies, les plasmides positifs sont extraits par miniprep puis validés par séquençage en utilisant les mêmes amorces, avant transformation des souches d'*Agrobacterium rhizogenes* et/ou *tumefaciens* comme suit. 50 µL d'agrobactéries thermocompétentes sont doucement mélangées à 1 µg de solution plasmidique et incubées 10 min dans la glace, puis plongées dans l'azote liquide jusqu'à la fin du frémissement, et enfin incubées à 37°C pour 5 min. Les agrobactéries sont enfin diluées dans 1 mL de LB puis placées à 28°C sous agitation pendant 3 h avant d'être étalées sur milieu LB + Kanamycine à 25 µg/ml pour croissance pendant 2 jours à 28°C.



**Figure S1 : Principales caractéristiques de l'ADN de transfert (ADNt) présent sur le plasmide pCambia 2200 Gold modifié pour clonage Golden Gate ayant servi à transformer les agrobactéries (*Agrobacterium rhizogenes* A4 et *Agrobacterium tumefaciens* C58C1) (Fliegmann *et al.*, 2013). Pour les constructions d'intérêt, le plasmide a été modifié afin de ne plus exprimer la DsRed (pCambia $\Delta$ DsRed), représenté encadré en pointillés. LB et RB représentent les bordures gauches et droites balisant l'ADNt. SMC désigne le site multiple de clonage ayant servi à insérer les constructions d'intérêt. P35S : promoteur 35S ; pUB1 : promoteur de l'ubiquitine ; SP : Séquence codante (CDS) de gènes codant pour les SP candidates ; DsRed et Citrine : gène codant pour des protéines rapporteurs fluorescentes ; Kan<sup>R</sup> : gène de résistance à la kanamycine.**

Amorces	Séquence 5'en 3'
SP1_F	AAAGGTCTCGTAGCATGGCTCGACTTTATCAGCAA
SP1_R	AAAGGTCTCGCCATTTTGTCTATAAAATATTGATACCAGGATTC
SP2_F	AAAGGTCTCGTAGCATGTTTACATCTAACATGCCTTTTATATTTG
SP2_R	AAAGGTCTCGCCATTAGTACTATAATGTCAATTTGGTGGACAC
SP6_F	AAAGGTCTCGTAGCATGAAATTAATTTCTTCTCGCAATC
SP6_R	AAAGGTCTCGCCATATGTCCAATACCACAACCTGGTTC
SP7_F	AAAGGTCTCGTAGCATGAAATTAATTTTATTCTCGCAATTCT
SP7_R	AAAGGTCTCGCCATATGTCCAATACCACAACCTGGTTC
SP9_F	AAAGGTCTCGTAGCATGAAGTTAGCATTAAATTACCTCAATTTTATT
SP9_R	AAAGGTCTCGCCATTCGTATCTCTCCATCCTTTCCAT
SP10_F	AAAGGTCTCGTAGCATGAAACTTTCCATTCCCTTAACC
SP10_R	AAAGGTCTCGCCATGCAGTTGTATTGATCAAAATGCC
SP12_F	AAAGGTCTCGTAGCATGAAAATTTCCATTCCCTTAACCG
SP12_R	AAAGGTCTCGCCATACTAGGGTTCTGGCAATATGACAT
SP13_F	AAAGGTCTCGTAGCATGAAATTTCCATTCCCTTAATCATT
SP13_R	AAAGGTCTCGCCATGTCTTGAGAATTGTTTTCGCAAAA
SP16_F	AAAGGTCTCGTAGCATGAATCATAATTACATTATTATTTTATTCTTGC
SP16_R	AAAGGTCTCGCCATATAATCTACATTGAGAGAAACATCTTCATGT
SP17_F	AAAGGTCTCGTAGCATGAAATATACTATCCTTTTTATTATTGTGTTCTTT
SP17_R	AAAGGTCTCGCCATTTTCGGTGGTTTATAGTCATAATATTTATATATT
SP23_F	AAAGGTCTCGTAGCATGAAGTTCTTTCACATTACGTTATTGT
SP23_R	AAAGGTCTCGCCATATGTTTCTTTTAGGTTTACCTTTTTTTC
SP28_F	AAAGGTCTCGTAGCATGAGGGTATTAACCTCTAATAATTGC
SP28_R	AAAGGTCTCGCCATCAATGTGCCATCTGGAGCA
SP29_F	AAAGGTCTCGTAGCATGAAGTGCCTATTTACCCTCTCC
SP29_R	AAAGGTCTCGCCATCAATGCTACAATACGTTTTTTCTTATTC
SP30_F	AAAGGTCTCGTAGCATGGTTGCTCCACGCTTC
SP30_R	AAAGGTCTCGCCATAAGCATTCTATATATATTTGTGCGCTT

**Table S1 : Amorces utilisées pour clonage Golden Gate.**

## 2.4-Constructions HIGS

Les constructions HIGS-SPs ont été obtenues par clonage Golden Gate à partir des constructions intermédiaires pGEM-T::p35S, pGEM-T::SP<sub>Antisens</sub>, pGEM-T::spacer, pGEM-T::SP<sub>Sens</sub> afin d'obtenir la construction HIGS suivante dans le pCambia 2200 Gold (p35S::SP<sub>Antisens</sub>:spacer:SP<sub>Sens</sub>). La séquence intronique spacer IV2-ST-LS1 avait été sous clonée dans pGEMT dans notre laboratoire au préalable (Vancanneyt *et al.*, 1990). Les fragments de gènes ont une taille comprise entre 200 et 400 nts (**Table S2**). Les constructions sont introduites dans *E. Coli* pour vérifier leur séquence avant transformation des souches A4 d'*A. rhizogenes* (voir procédure décrite plus haut).

Amorces	Séquence 5'en 3'
SP6_HIGS_ASF	AAAGGTCTCGTAGCATGTCCAATACCACAACCTTGTTTCACCCGGTGGAGTGTAT
SP6_HIGS_ASR	AAAGGTCTCGGCGTAAATAAATACATTAATTTATATAAACTTTCAAACCAAC
SP6_HIGS_SF	AAAGGTCTCGATTAATAAATAACATTAATTTATATAAACTTTCAAACCAAC
SP6_HIGS_SR	AAAGGTCTCGCGTAATGTCCAATACCACAACCTTGTTTCACCCGGTGGAGTGTAT
SP9_HIGS_ASF	AAAGGTCTCGTAGCACC GCCGAATTTTTAGAC
SP9_HIGS_ASR	AAAGGTCTCGGCGTACCTCAATTTTATTGTCACTTGC
SP9_HIGS_SF	AAAGGTCTCGATTAACCTCAATTTTATTGTCACTTGC
SP9_HIGS_SR	AAAGGTCTCGCGTAACCCGCCGAATTTTTAGAC
SP12_HIGS_ASF	AAAGGTCTCGTAGCTGAAAAGTTACTTGGATCTCCATT
SP12_HIGS_ASR	AAAGGTCTCGGCGTATGAAAATTTCCATTCCTTTAACCG
SP12_HIGS_SF	AAAGGTCTCGATTAATGAAAATTTCCATTCCTTTAACCG
SP12_HIGS_SR	AAAGGTCTCGCGTATGAAAAGTTACTTGGATCTCCATT
SP13_HIGS_ASF	AAAGGTCTCGTAGCATATGATATGTTAAATGTGGATCTCCTGTT
SP13_HIGS_ASR	AAAGGTCTCGGCGTATGAAATTTCCATTCCTTTAATCATT
SP13_HIGS_SF	AAAGGTCTCGATTAATGAAATTTCCATTCCTTTAATCATT
SP13_HIGS_SR	AAAGGTCTCGCGTAATATGATATGTTAAATGTGGATCTCCTGTT
SP16_HIGS_ASF	AAAGGTCTCGTAGCACATGTTTGCCATTGGGTTT
SP16_HIGS_ASR	AAAGGTCTCGGCGTTCCTGCGGATGTTATCCTG
SP16_HIGS_SF	AAAGGTCTCGATTATCACTGCGGATGTTATCCTG
SP16_HIGS_SR	AAAGGTCTCGCGTAACATGTTTGCCATTGGGTTT
SP23_HIGS_ASF	AAAGGTCTCGTAGCGGAAAGGGTTATCTAAAAGTTCTTG
SP23_HIGS_ASR	AAAGGTCTCGGCGTTGATGGTACACAAAATCGTGA
SP23_HIGS_SF	AAAGGTCTCGATTATGATGGTACACAAAATCGTGA
SP23_HIGS_SR	AAAGGTCTCGCGTAGGAAAGGGTTATCTAAAAGTTCTTG
SP28_HIGS_ASF	AAAGGTCTCGTAGCTGTTTCGGGAGCTTCACCA
SP28_HIGS_ASR	AAAGGTCTCGGCGTATGAGGGGTATTAACCTTCTAATAATTGC
SP28_HIGS_SF	AAAGGTCTCGATTAATGAGGGGTATTAACCTTCTAATAATTGC
SP28_HIGS_SR	AAAGGTCTCGCGTATGTTTCGGGAGCTTCACCA
SP29_HIGS_ASF	AAAGGTCTCGTAGCATGAAAATATCTGTCCCCGTAGGT
SP29_HIGS_ASR	AAAGGTCTCGGCGTATGAAGTGCCTATTTACCCTCTCC
SP29_HIGS_SF	AAAGGTCTCGATTAATGAAGTGCCTATTTACCCTCTCC
SP29_HIGS_SR	AAAGGTCTCGCGTAATGAAAATATCTGTCCCCGTAGGT

**Table S2 : Amorces utilisées pour construction HIGS par Golden Gate.** AS : fragment antisens ; S : fragment sens. La construction SP6\_HIGS va normalement éteindre l'expression de SP7 du fait d'une très importante homologie de séquence avec SP6.

## 2.5-Constructions V(H)IGS

Les vecteurs pTRV1 and pTRV2 (Liu *et al.*, 2002a) ont été fournis par le Dr B. Lefebvre (LIPM, INRA, Auzeville, France). Le plasmide pTRV2 a été digéré par les enzymes EcoRI et XhoI. Les extrémités cohésives correspondantes des amplicons comprenant les fragments de gènes ont été générées après digestion par l'enzyme BsaI puis liguées dans le plasmide pTRV2 (obtention des constructions pTRV2-SP) (**Table S3**). Les constructions ont été ensuite introduites dans des *E. coli* DH5 $\alpha$  thermocompétentes pour séquençage.

Amorces	Séquence 5'en 3'
SP2_vhigs_F	aaaGGTCTCgAATTATGTTTACATCTAACATGCCTTTTATATTTG
SP2_vhigs_R	aaaGGTCTCgTCGATAGTACTATAATGTCAATTTTGGTGGACAC
SP1_vhigs_F	aaaGGTCTCgAATTATGGCTCGACTTTATCAGCAAAT
SP1_vhigs_R	aaaGGTCTCgTCGATTTGCTATAAAATATTGATACCAGGATTC

**Table S3** : Amorces utilisées pour clonage des constructions dans le plasmide pTRV2.

### 3-Analyse d'expression par RT-qPCR

Les amorces de RT-qPCR ont été déterminées en utilisant le logiciel Primer3 avec un Tm optimal de 60°C pour un produit d'amplification compris entre 75 et 125 bp. Les séquences oligonucléotidiques sont détaillées ci-dessous (**Table S4**). La RT-qPCR s'effectue en plaque 384 puits et les échantillons sont marqués en utilisant le LightCycler® 480 SYBR green I master mix (Roche Applied Science) et le suivi de l'amplification se fait grâce au LightCycler® 480 detection system (Roche Applied Science). Deux réplicats techniques sont effectués pour chaque gène dans un volume final de 10 µL contenant 5 µL d'une solution concentrée 2x de SYBR green I master mix, 0,5 µL de chaque amorces (0,5 nM final de chaque amorce), et 50 ng d'ADNc matrice en utilisant le programme PCR suivant : 50°C pendant 2 min, 95°C pour 10 min, [95°C, 30s ; 56°C, 30s ; 72°C, 30s] pour 40 cycles. Les données ont été traitées en utilisant le logiciel LightCycler 480 (Roche). L'expression des gènes a été normalisée par l'expression du gène codant pour la phosphofructokinase (PFK) de *R. irregularis*.

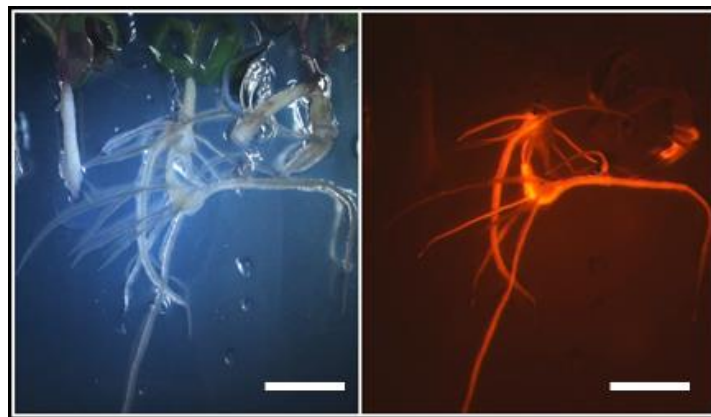
Amorces	Séquence 5'en 3'
PFK_F	GGTGCACCATCTCCAAGT
PFK_R	CGCACCATCAATTCCAATAA
SP1_F	TGGCTCGACTTTATCAGCAA
SP1_R	CCAGGATTCGTTCTACATTCAA
SP2_F	CATCTAACATGCCTTTTATATTTGTGA
SP2_R	GGACACCCTAGTGGGGATT
SP3_F	AAGCGTACCCTGCTACGAAA
SP3_R	GTGATCCCAATTGCCACAG
SP4_F	CAATGCTCCCACAATCTTCA
SP4_R	TTGCTTCTCGCAATCCTCTT
SP5_F	ATGCGAGTCTTGCTCTGTT
SP5_R	TGCACATCCTTTTTGACATTG
SP8_F	ATCTTTCGGTCTCGTGAAGC
SP8_R	CCAAAATCAACCCCATCATC
SP9_F	ATCTCAGGCAGTTCCTTTGG
SP9_R	ACCGTAACACATCCACCTC
SP10_F	TGGATACCGGATGGTTGAAT
SP10_R	TCTCTTGCTGCCATAACCT
SP12_F	CTACCGGATGGTTGAATTGC
SP12_R	TCTCTTGCTGCCATAACCT
SP13_F	AATCCATTCTGGCTTCATGC
SP13_R	AGCAGGTATCCCGCTAAAT
SP16_F	CCAATGGCAAACATGTCAGT
SP16_R	TGATAGCGCAACGGTAACAG
SP17_F	AGGAGCTGTCGATCACGAGT
SP17_R	GCATCACAATGCGTATCACC
SP23_F	AAAAGCCAAAAGGGGTCATT
SP23_R	AGCGATCGGCATAAGAAGAG
SP29_F	AGCTTTATGGCAAACGATGG
SP29_R	TGTTTTACCTGCCTGGCTTT
SP30_F	AGGTCGGAACATTCAAGGTG
SP30_R	GCCATTCAGCTGGTGATT

**Table S4:** Amorces utilisées pour la qRT-PCR

## 4-Génération de plantes composites de *M. truncatula*

Les racines de *M. truncatula* sont transformées selon le protocole décrit par Boisson-Dernier *et al.* (2001). Les graines germées sont sectionnées au scalpel à 2-3mm de l'apex racinaire, puis mises en contact d'*A.rhizogenes* souche A4 préalablement transformées avec les constructions d'intérêt et ayant poussé durant 2 jours à 28°C sur milieu LB (+ 50 mg/L de

Rifampicine et 25 mg/L de Kanamycine). Les graines sont ensuite disposées sur boîtes carrées (12 x 12 cm) contenant du milieu Fahraeus (**Table S5**) avec Kanamycine (25 mg/L final) à raison de 15 graines par boîtes. Ces dernières sont placées verticalement à 22°C à la lumière durant 3 à 4 semaines jusqu'à apparition et développement suffisant des racines transformées (**Figure S2**). Les plantules transformées (capable de croître sur kanamycine) sont ensuite sélectionnées et observées à la loupe binoculaire à fluorescence (Axiozoom V16, Zeiss). Les plantes témoins (transformées avec vecteur vide pCambia2200, exprimant de manière constitutive la DsRed ou exprimant les constructions (pCambia  $\Delta$ DsRed exprimant la citrine sous contrôle d'un promoteur 35S) seront utilisées pour la suite des expériences.



**Figure S2 : Expression de la DsRed dans des racines de *M. truncatula* transformées avec le vecteur vide témoin (pCambia utilisé comme contrôle).** Images prises avec le microscope à fluorescence Axiozoom V16 (Zeiss). La barre d'échelle représente 1 cm.

## 5-Racines en culture

Les racines transformées par les souches A4 d'*A. rhizogenes* ont été excisées stérilement puis cultivées sur milieu M (Bécard & Fortin, 1988) (**Table S5**) contenant 0,3g de Phytigel (Sigma) et de l'Augmentin (1 g d' amoxicilline – 200 mg d'acide clavulanique, SmithKline Beecham, Belgique) à des concentration successives de 800, 400 et 0 mg par litre. Les racines en culture peuvent ainsi être conservées durant 2 mois à l'obscurité (24°C, 50% humidité).



---

**Milieu Fahraeus :**

---

CaCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O 0,9 mM ; MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O 0,48 mM ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,73 mM ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O 0,42 mM ; Citrate de fer ammoniacal 0,02 mM ; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,5 mM ; MnCl<sub>2</sub> 100 µg/L ; CuSO<sub>4</sub> 100 µg/L ; ZnCl<sub>2</sub> 100 µg/L ; HBO<sub>3</sub> 100 µg/L ; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 100 µg/L ; MES 200 mg/L ; pH 7,5 NaOH ; Bacto-agar 7 g/L (EUROMEDEX #1329)

---

**Milieu M (Bécard & Fortin, 1988) :**

---

KNO<sub>3</sub> 80 mg/L ; MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O 731 mg/L ; KCl 65 mg/L ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,8 mg/L ; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 4 H<sub>2</sub>O 288 mg/L ; MnCl<sub>2</sub>, 4 H<sub>2</sub>O 6 mg/L ; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1,5 mg/L ; ZnSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O 2,65 mg/L ; NaMoO<sub>4</sub>, 2 H<sub>2</sub>O 2,4 µg/L ; CuSO<sub>4</sub>, 5 H<sub>2</sub>O 0,13 mg/L ; KI 0,75 mg/L ; Na-Fe-EDTA 8 mg/L ; Glycine 3 mg/L ; Inositol 50 mg/L ; Nicotinic acid 0,5 mg/L ; Pyrimidic, HCl 0,1 mg/L ; Thiamine, HCl 0,1 mg/L ; pH 5,5

---

**Table S5 :** Composition des milieux de culture

## 6-Préparation des solutions peptidiques

Les peptides ont été synthétisés par Smartox- Biotechnology (Saint-Martin-d'Hères, France). Les peptides sont dissous dans de l'eau, excepté pour SP1 et SP2 complexés à la 5 (6)-carboxyfluoresceine (FAM) qui ont été repris dans une solution à 10% d'acétonitrile comme préconisé par le fournisseur.

## 7-Bioessais

### 7.1-Agroinfiltration

Les agrobactéries C58C1 contenant nos constructions *p35S::SP:citrine* dans pCambia ont été cultivées pour 2 jours sous agitation à l'obscurité à 28°C dans du milieu LB contenant de la Kanamycine à 25 µg/mL et de la Rifampycine à 50 µg/mL. Après centrifugation (5 min à 5000 rpm), le culot bactérien est repris dans du tampon d'infiltration (10 mM MES KOH pH 5,6 ; 10 mM MgCl<sub>2</sub> ; 150 µM Acetosyringone) puis laissé sous agitation jusqu'à obtention d'une DO<sub>600</sub> de 0,5. Les solutions bactériennes sont ensuite infiltrées dans l'épiderme inférieur des feuilles

de *Nicotiana benthamiana* grâce à une seringue 1 ml. Enfin, les zones foliaires agroinfiltrées sont récupérées pour observation au microscope confocal 2-3 jours plus tard.

## **7.2-Plantes composites**

Les plantes chimériques sont mises à mycorhizer en pot de 250 mL contenant du substrat Oil-Dri US special (Damolin) préalablement autoclavé au four pasteur (180 °C durant 5h) mélangé à un inoculum faible de 400 spores par litre de *R. irregularis* DAOM197198. Ce choix d'utiliser un inoculum faible est justifié car il permet d'identifier des phénotypes masqués par des apports en spores plus important (Delaux *et al.*, 2013). Les plantes sont ensuite cultivées entre 8 et 12 semaines à 22°C et arrosées tous les deux jours avec une solution modifiée de Long Ashton à faible concentration en phosphate tel que décrit par Balzergue *et al.* (2011).

## **7.3-Apport exogène de peptides**

Les graines germées de *M. truncatula* sont déposées dans des demi Falcons contenant 30 mL d'un mélange sable/zeolite (v/v) (sable - quartz pur 98%, 0,7-1,3 mm - *Sibelco*, France ; Zeolite 1-2,5mm, *Symbiom Ltd.*, République Tchèque) et inoculées afin d'avoir 80 spores de *R. irregularis* DAOM197198 par demi falcon. Les plantes sont ensuite conservées durant 3-4 semaines en chambre de culture et arrosées tous les deux jours avec la solution d'arrosage précédemment décrite dans laquelle les peptides ont été dilués à 100 nM final.

Pour les tests avec les peptides complexés à la FAM, des plantules germées stériles ont été mis en croissance sur milieu Fahraeus durant 4 semaines à 22°C. Les plantules présentant des racines latérales ont ensuite été récupérés et leur système racinaire mis en contact d'une solution contenant 20 µM final d'une solution de peptides FAM pour 2h. Les plantes sont ensuite transférées pour 1h dans une solution de Long Ashton décrite précédemment puis rincées à l'eau avant d'être mise entre lame et lamelle dans de l'eau pour observation au microscope confocal.

## **8-Localisation subcellulaire**

Les observations ont été effectuées par microscopie confocale (Leica TCS SP2 et SP8 Zeiss). Les protéines fusionnées à la citrine sont excitées à 514 nm et le signal émis est détecté entre

522 et 550 nm. Pour les peptides marqués avec la FAM, cette dernière est excitée à 488 nm et le signal émis est détecté entre 500 et 540 nm.

Les plasmolyses générées pour confirmation d'un signal pariétal sont effectuées en remplaçant l'eau de la lame par une solution de Glycérol 30% ou Mannitol à 0,5M. Les observations sont effectuées 10-15 min après application des solutions.

Le traitement des images générées lors de cette étude a été effectué avec le logiciel ImageJ.

## **9-Observation du processus symbiotique**

Les plantes mycorhizées sont récupérées à 3-4 semaines et 8-12 semaines après inoculation, pour culture en demi Falcon et culture en pot respectivement, et les racines sont prélevées. Dans le cas de plantes composites, seules les racines transformées montrant une fluorescence à la loupe binoculaire à fluorescence sont conservées. Les racines sont ensuite colorées pour observation des structures fongiques comme décrit par Vierheilig *et al.*, (1998). Les racines sont traitées dans une solution de KOH 10% durant 8 min à 90°C afin de vider le contenu des cellules végétales puis rincées. Puis, elles sont colorées par une solution contenant de l'encre de Schaeffer (5% encre, 5% acide acétique) et laissées 10 min, toujours à 90°C. L'encre va ainsi colorer les structures fongiques. Les racines sont ensuite rincées puis conservées dans de l'éthanol 50% pour élimination du surplus d'encre avant observation à la loupe binoculaire.

L'évaluation du taux de mycorhization global s'effectue par la méthode d'intersection des racines avec les lignes d'une grille (Giovannetti & Mosse, 1980). L'état mycorhizé ou non d'une racine à chaque intersection avec une ligne est évalué et est ramené au nombre total d'intersection puis multiplié par 100 afin d'avoir un taux de mycorhization en pourcentage.

Concernant les points d'infections, le nombre total d'hyphopodes de chaque système racinaire est dénombré ainsi que les évènements de développements arbusculaires qui y sont associés.

## **10-Analyses statistiques**

Les analyses ont été effectuées grâce au logiciel STATGRAPHIC Centurion 17 software. Ceci inclut : l'ANOVA suivie d'une comparaison Post Hoc par le test de Tukey sur les tests de

prolifération des agrobactéries dans *N. benthamiana* et l'application du test de Student (t-test) sur les données de mycorhization sur les plantes chimériques. Pour les essais peptidique en exogène, une ANOVA a été appliquée mais n'a pas révélé de différences significatives.



# Bibliographie

- Abdel-Lateif K, Bogusz D, Hocher V. 2012.** The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and Frankia bacteria. *Plant Signaling & Behavior* **7**: 636–641.
- Agrawal GK, Jwa NS, Lebrun MH, Job D, Rakwal R. 2010.** Plant secretome: Unlocking secrets of the secreted proteins. *Proteomics* **10**: 799–827.
- Ait Lahmidi N, Courty PE, Brulé D, Chatagnier O, Arnould C, Doidy J, Berta G, Lingua G, Wipf D, Bonneau L. 2016.** Sugar exchanges in arbuscular mycorrhiza: RiMST5 and RiMST6, two novel Rhizophagus irregularis monosaccharide transporters, are involved in both sugar uptake from the soil and from the plant partner. *Plant Physiology and Biochemistry* **107**: 354–363.
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. 2005.** Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**: 824–827.
- Alexandersson E, Ali A, Resjö S, Andreasson E. 2013.** Plant secretome proteomics. *Frontiers in Plant Science* **4**: 9.
- Alfano JR, Collmer A. 2004.** Type III secretion system effector proteins : Double Agents in Bacterial Disease and plant defense. *Annual review of phytopathology* **42**: 385–414.
- Amijee F, Tinker PB, Stribley DP. 1989.** The development of endomycorrhizal root systems. VII. A detailed study of effects of soil phosphorus on colonization. *New Phytologist* **111**: 435–446.
- Amselem J, Cuomo C a., van Kan J a L, Viaud M, Benito EP, Couloux A, Coutinho PM, de Vries RP, Dyer PS, Fillinger S, et al. 2011.** Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens sclerotinia sclerotiorum and botrytis cinerea. *PLoS Genetics* **7**.
- Anh DH, Ullrich R, Benndorf D, Svatos A, Muck A, Hofrichter M. 2007.** The coprophilous mushroom Coprinus radians secretes a haloperoxidase that catalyzes aromatic peroxygenation. *Applied and environmental microbiology* **73**: 5477–85.
- Arnauteli S, Giastas P, Andreou A, Tzanodaskalaki M, Aldridge C, Tzartos SJ, Vollmer W, Eliopoulos E, Bouriotis V. 2015.** Two putative polysaccharide deacetylases are required for osmotic stability and cell shape maintenance in Bacillus anthracis. *Journal of Biological Chemistry* **290**: 13465–13478.
- Asmann YW, Klee EW, Thompson EA, Perez E a, Middha S, Oberg AL, Therneau TM, Smith DI, Poland G a, Wieben ED, et al. 2009.** 3' tag digital gene expression profiling of human brain and universal reference RNA using Illumina Genome Analyzer. *BMC genomics* **10**: 531.
- Augé RM. 2001.** Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* **11**: 3–42.
- Auriac M-C, Timmers ACJ. 2007.** Nodulation studies in the model legume Medicago truncatula: advantages of using the constitutive EF1alpha promoter and limitations in detecting fluorescent reporter proteins in nodule tissues. *Molecular plant-microbe interactions* **20**: 1040–1047.
- Azcon-Aguilar C, Diaz-Rodriguez RM, Barea J-M. 1986.** Effect of soil micro-organisms on spore germination and growth of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus Glomus mosseae. *Transactions of the British Mycological Society* **86**: 337–340.
- Bago B. 2000.** Putative sites for nutrient uptake in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **226**: 263–274.
- Bago B, Azcon-Aguilar C, Goulet A, Piche Y. 1998a.** Branched absorbing structures ( BAS ) : a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **139**: 375–388.
- Bago B, Azcon-Aguilar C, Piche Y. 1998b.** Architecture and Developmental Dynamics of the External Mycelium of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus Glomus intraradices Grown under Monoxenic Conditions. *Mycologia* **90**: 52.
- 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, Zipfel W, Williams RM, Jun J, Arreola R, Lammers PJ, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. 2002.** Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant physiology* **128**: 108–124.
- Baker LG, Specht CA, Donlin MJ, Lodge JK. 2007.** Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in Cryptococcus neoformans. *Eukaryotic Cell* **6**: 855–867.
- Balomenou S, Fouet A, Tzanodaskalaki M, Couture-Tosi E, Bouriotis V, Boneca IG. 2013.** Distinct functions of polysaccharide deacetylases in cell shape, neutral polysaccharide synthesis and virulence of Bacillus anthracis. *Molecular Microbiology* **87**: 867–883.

- Balzergue C, Puech-Pagès 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.
- Bartsev A V, Deakin WJ, Boukli NM, Mcalvin CB, Stacey G, Malnoe P, Broughton WJ, Staehelin C. 2004.** NopL, an Effector Protein of *Rhizobium* sp. NGR234, Thwarts Activation of Plant Defense Reactions. *Plant Physiology* **134**: 871–879.
- Bastmeyer M, Deising HB, Bechinger C. 2002.** Force exertion in fungal infection. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **31**: 321–41.
- Baulcombe DC. 2015.** VIGS, HIGS and FIGS: small RNA silencing in the interactions of viruses or filamentous organisms with their plant hosts. *Current Opinion in Plant Biology* **26**: 141–146.
- Bécard G, Doner LW, Rolin DB, DOUDS DD, Pfeffer PE. 1991.** Identification and quantification of trehalose in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi by in vivo <sup>13</sup>C NMR and HPLC analyses. *New Phytol* **118**: 547–552.
- Bécard G, Douds DD, Pfeffer PE. 1992.** Extensive In Vitro Hyphal Growth of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Presence of CO<sub>2</sub> and Flavonols. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 821–825.
- 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* **82**: 1186–1197.
- Becard G, Piché Y. 1989.** New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytologist* **112**: 77–83.
- Bécard G, Piché Y. 1989.** Fungal Growth Stimulation by CO<sub>2</sub> and Root Exudates in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 2320–2325.
- Bécard G, Piché Y. 1990.** Physiological factors determining vesicular–arbuscular mycorrhizal formation in host and nonhost Ri T-DNA transformed roots. *Canadian Journal of Botany* **68**: 1260–1264.
- Becard G, Taylor LP, Douds DD, Pfeffer PE, Doner LW. 1995.** Flavonoids Are Not Necessary Plant Signal Compounds in Arbuscular Mycorrhizal Symbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**: 252.
- 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**: 620–7.
- Benedito V a, Visser PB, Angenent GC, Krens F a. 2004.** The potential of virus-induced gene silencing for speeding up functional characterization of plant genes. *Genetics and molecular research* **3**: 323–341.
- 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, Becard G, Roux C, Séjalon-Delmas N. 2009.** Role of mitochondria in the response of arbuscular mycorrhizal fungi to strigolactones. *Plant signaling & behavior*: 75–77.
- 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. *PLoS biology* **4**: e226.
- Bever JD, Dickie IA, Facelli E, Facelli JM, Klironomos J, Moora M, Rillig MC, Stock WD, Tibbett M, Zobel M. 2010.** Rooting theories of plant community ecology in microbial interactions. *Trends in Ecology & Evolution* **25**: 468–478.
- Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, Bécard G, Rosenberg C, Barker DG. 2001.** Agrobacterium rhizogenes-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Molecular plant-microbe interactions* **14**: 695–700.
- Bolan N. 1991.** A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorous by plants. *Plant and Soil* **134**: 189–207.
- Boldt-burisch K, Franken P, Christina K. 2014.** The sucrose transporter SISUT2 from tomato interacts with brassinosteroid functioning and affects arbuscular mycorrhiza formation. *The Plant Journal*: 877–889.
- Boller T, Felix G. 2009.** A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual review of plant biology* **60**: 379–406.
- Bolton MD, Van Esse HP, Vossen JH, De Jonge R, Stergiopoulos I, Stulemeijer IJE, Van Den Berg GCM, Borrás-Hidalgo O, Dekker HL, De Koster CG, et al. 2008.** The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Molecular Microbiology* **69**: 119–136.
- Bonfante P, Genre A. 2010.** Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature communications* **1**: 48.
- Bonfante P, Genre A. 2015.** Arbuscular mycorrhizal dialogues : do you speak ‘ plantish ’ or ‘ fungish ’? *Trends in Plant Science*: 1–5.
- Boon E, Halary S, Bapteste E, Hijri M. 2015.** Studying Genome Heterogeneity within the Arbuscular Mycorrhizal

Fungal Cytoplasm. *Genome Biology and Evolution*: 1–47.

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

**Bozkurt TO, Schornack S, Banfield MJ, Kamoun S. 2012.** Oomycetes, effectors, and all that jazz. *Current opinion in plant biology* **15**: 483–92.

**Braaksma M, Martens-Uzunova ES, Punt PJ, Schaap PJ. 2010.** An inventory of the *Aspergillus niger* secretome by combining in silico predictions with shotgun proteomics data. *BMC Genomics* **11**: 1–11.

**Braunsdorf C, Mailänder-Sanchez D, Schaller M. 2016.** Fungal sensing of host environment. *Cellular Microbiology* **18**: 1188–1200.

**Breullin-Sessoms F, Floss DS, Gomez SK, Pumplin N, Ding Y, Levesque-Tremblay V, Noar RD, Daniels D a., Bravo A, Eaglesham JB, et al. 2015.** Suppression of Arbuscule Degeneration in *Medicago truncatula* phosphate transporter4 Mutants Is Dependent on the Ammonium Transporter 2 Family Protein AMT2;3 Florence. *The Plant cell* **27**: tpc.114.131144.

**Breuninger M, Requena N. 2004.** Recognition events in AM symbiosis: Analysis of fungal gene expression at the early appressorium stage. *Fungal Genetics and Biology* **41**: 794–804.

**Brown NA, Antoniw J, Hammond-Kosack KE. 2012.** The predicted secretome of the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*: A refined comparative analysis. *PLoS ONE* **7**.

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

**Bryant MK, Schardl CL, Hesse U, Scott B. 2009.** Evolution of a subtilisin-like protease gene family in the grass endophytic fungus *Epichloë festucae*. *BMC evolutionary biology* **9**: 168.

**Buee 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, Wang T, Girardin A, Lefebvre B. 2015.** The LysM receptor-like kinase SLYK10 regulates the arbuscular mycorrhizal symbiosis in tomato. *New Phytologist*.

**Burleigh S. 2001.** Relative quantitative RT-PCR to study the expression of plant nutrient transporters in arbuscular mycorrhizas. *Plant Science*.

**Butlin R. 2002.** Evolution of sex: The costs and benefits of sex: new insights from old asexual lineages. *Nature reviews. Genetics* **3**: 311–317.

**Caillaud MC, Piquerez SJM, Fabro G, Steinbrenner J, Ishaque N, Beynon J, Jones JDG. 2012.** Subcellular localization of the Hpa RxLR effector repertoire identifies a tonoplast-associated protein HaRxL17 that confers enhanced plant susceptibility. *Plant Journal* **69**: 252–265.

**Calabrese S, Pérez-Tienda J, Ellerbeck M, Arnould C, Chatagnier O, Boller T, Schübler A, Brachmann A, Wipf D, Ferrol N, et al. 2016.** GintAMT3 - a Low-Affinity Ammonium Transporter of the Arbuscular Mycorrhizal Rhizophagus irregularis. *Frontiers in plant science* **7**: 679.

**Calmels TPG, Martin F, Durand H, Tiraby G. 1991.** Proteolytic events in the processing of secreted proteins in fungi. *Journal of Biotechnology* **17**: 51–66.

**Campos-soriano L, Segundo BSAN. 2012.** The arbuscular mycorrhizal symbiosis promotes the systemic induction of regulatory defence-related genes in rice leaves and. *Molecular Plant Pathology* **13**: 579–592.

**Casacuberta JM, Devos Y, du Jardin P, Ramon M, Vaucheret H, Nogué F. 2015.** Biotechnological uses of RNAi in plants: Risk assessment considerations. *Trends in Biotechnology* **33**: 145–147.

**Catanzariti A-M, Dodds PN, Lawrence GJ, Ayliffe MA, Ellis JG. 2006.** Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *The Plant cell* **18**: 243–256.

**Catford JG, Staehelin C, Larose G, Piché Y, Vierheilig H. 2006.** Systemically suppressed isoflavonoids and their stimulating effects on nodulation and mycorrhization in alfalfa split-root systems. *Plant and Soil* **285**: 257–266.

**Catoira R, Galera C, de Billy F, Penmetsa R V, Journet EP, Maillet F, Rosenberg C, Cook D, Gough C, Dénarié J. 2000.** Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *The Plant Cell* **12**: 1647–1666.

**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 Ca<sup>2+</sup> 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.

**Cho S-J, Jeftinija K, Glavaski A, Jeftinija S, Jena BP, Anderson LL. 2002.** Structure and Dynamics of the Fusion Pores in Live GH-Secreting Cells Revealed Using Atomic Force Microscopy. *Endocrinology* **143**: 1144–1144.

**Choi J, Park J, Kim D, Jung K, Kang S, Lee Y-H. 2010.** Fungal secretome database: integrated platform for annotation of fungal secretomes. *BMC Genomics* **11**: 105.

**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, Turner B, Wall ME, Egley GH. 1966.** Germination of Witchweed (*Striga lutea* Lour.): Isolation and Properties of a Potent Stimulant. *Science* **154**.

**Cook CE, Whichard LP, Wall M, Egley GH, Coggon P, Luhan PA, McPhail AT. 1972.** Germination stimulants. II. Structure of strigol, a potent seed germination stimulant for witchweed (*Striga lutea*). *Journal of the American Chemical Society* **94**: 6198–6199.

**Cosgrove DJ. 2005.** Growth of the plant cell wall. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**: 850–861.

**Cosgrove DJ, Li LC, Cho HT, Hoffmann-Benning S, Moore RC, Blecker D. 2002.** The growing world of expansins. *Plant and Cell Physiology* **43**: 1436–1444.

**Coutte L, Antoine R, Drobecq H, Locht C, Jacob-Dubuisson F. 2001.** Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *EMBO Journal* **20**: 5040–5048.

**Croll D, Corradi N, Gamper HA, Sanders IR. 2008.** Multilocus genotyping of arbuscular mycorrhizal fungi and marker suitability for population genetics. *New Phytologist* **180**: 564–568.

**Croll D, Sanders IR. 2009.** Recombination in *Glomus intraradices*, a supposed ancient asexual arbuscular mycorrhizal fungus. *BMC evolutionary biology* **9**: 13.

**Cruz C, Egsgaard H, Trujillo C, Ambus P, Requena N, Martins-Loução MA, Jakobsen I. 2007.** Enzymatic evidence for the key role of arginine in nitrogen translocation by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant physiology* **144**: 782–792.

**Daniels BA, Trappe JM. 1980.** Factors affecting spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus epigaeus*. *Mycologia* **72**: 457–471.

**Davis LL, Bartnicki-Garcia S. 1984.** Chitosan synthesis by the tandem action of chitin synthetase and chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Biochemistry* **23**: 1065–1073.

**Dean P. 2011.** Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection. *FEMS Microbiology Reviews* **35**: 1100–1125.

**Dean R a, Talbot NJ, Ebbole DJ, Farman ML, Mitchell TK, Orbach MJ, Thon M, Kulkarni R, Xu J-R, Pan H, et al. 2005.** The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* **434**: 980–986.

**Declerck S, Strullu D, Fortin A. 2005.** In vitro culture of mycorrhizas.

**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.

**Delaux PM, Bécard G, Combier JP. 2013.** NSP1 is a component of the *Myc* signaling pathway. *New Phytologist* **199**: 59–65.

**Delaux P-M, Radhakrishnan G V., Jayaraman D, Cheema J, Malbreil M, Volkening JD, Sekimoto H, Nishiyama T, Melkonian M, Pokorny L, et al. 2015.** Algal ancestor of land plants was preadapted for symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 201515426.

**Dénarié J, Debelle F, Promé J-C. 1996.** Rhizobium Lipo-Chitoooligosaccharide Nodulation Factors: Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry* **65**: 503–535.

**Dickson S. 2004.** The Arum-Paris continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* **163**: 187–200.

**Djamei A, Schipper K, Rabe F, Ghosh A, Vincon V, Kahnt J, Osorio S, Tohge T, Fernie AR, Feussner I, et al. 2011.** Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* **478**: 395–398.

**Dodds PN, Rathjen JP. 2010.** Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature reviews. Genetics* **11**: 539–548.

**Doehlemann G, Hemetsberger C. 2013.** Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. *New Phytologist* **198**: 1001–1016.

**Doehlemann G, van der Linde K, Assmann D, Schwammbach D, Hof A, Mohanty A, Jackson D, Kahmann R. 2009.** Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS pathogens* **5**: e1000290.

**Doidy J, Grace E, Kühn C, Simon-Plas F, Casieri L, Wipf D. 2012.** Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends in Plant Science* **17**: 413–422.

**Douds DD, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. 2000.** Carbon Partitioning, Cost, and Metabolism of Arbuscular Mycorrhizas. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Dordrecht: Springer Netherlands, 107–129.

**Duplessis S, Cuomo CA, Lin Y-C, Aerts A, Tisserant E, Veneault-Fourrey C, Joly DL, Hacquard S, Amselem J, Cantarel BL, et al. 2011.** Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 1–23.

**Ehinger M, Koch AM, Sanders IR. 2009.** Changes in arbuscular mycorrhizal fungal phenotypes and genotypes in response to plant species identity and phosphorus concentration. *The New phytologist* **184**: 412–423.

**Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2007.** Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature Protocols* **2**: 953–971.

**Erb M, Lenk C, Degenhardt J, Turlings TCJ. 2009.** The underestimated role of roots in defense against leaf

attackers. *Trends in Plant Science* **14**: 653–659.

**Espino JJ, Gutiérrez-Sánchez G, Brito N, Shah P, Orlando R, Gonzalez C. 2010.** The *Botrytis cinerea* early secretome. *Proteomics* **10**: 3020–3034.

**Esse HP Van, Bolton MD, Stergiopoulos I, Wit PJGM De, Thomma BPHJ, van Esse HP, Bolton MD, Stergiopoulos I, de Wit PJGM, Thomma BPHJ. 2007.** The chitin-binding *Cladosporium fulvum* effector protein Avr4 is a virulence factor. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **20**: 1092–101.

**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.

**Faye L, Boulaflois A, Benchabane M, Gomord V, Michaud D. 2005.** Protein modifications in the plant secretory pathway: Current status and practical implications in molecular pharming. *Vaccine* **23**: 1770–1778.

**Feddermann N, Reinhardt D. 2011.** Conserved residues in the ankyrin domain of VAPYRIN indicate potential protein-protein interaction surfaces. *Plant signaling & behavior* **6**: 680–4.

**Fester T, Strack D, Hause B. 2001.** Reorganization of tobacco root plastids during arbuscule development. *Planta* **213**: 864–868.

**Field KJ, Pressel S, Duckett JG, Rimington WR, Bidartondo MI. 2015.** Symbiotic options for the conquest of land. *Trends in Ecology & Evolution*: 1–10.

**Fliegmann J, Canova S, Lachaud C, Uhlenbroich S, Gascioli V, Pichereaux C, Rossignol M, Rosenberg C, Cumener M, Pitorre D, et al. 2013.** Lipo-chitoooligosaccharidic symbiotic signals are recognized by LysM receptor-like kinase LYR3 in the legume *Medicago truncatula*. *ACS Chemical Biology* **8**: 1900–1906.

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

**Fuller RS, Brake a, Thorner J. 1989.** Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca<sup>2+</sup>-dependent serine protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 1434–1438.

**Fusconi A. 2014.** Regulation of root morphogenesis in arbuscular mycorrhizae: What role do fungal exudates, phosphate, sugars and hormones play in lateral root formation? *Annals of Botany* **113**: 19–33.

**Gandolfi A, Sanders IR, Rossi V, Menozzi P. 2003.** Evidence of recombination in putative ancient asexuals. *Molecular Biology and Evolution* **20**: 754–761.

**Garcia K, Doidy J, Zimmermann SD, Wipf D, Courty P-E. 2016.** Take a trip through the plant and fungal transportome of mycorrhiza. *Trends in plant science* **xx**: 1–14.

**García-Garrido M, Ocampo JA. 2002.** Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1377–1386.

**Gassmann W, Bhattacharjee S. 2012.** Effector-Triggered Immunity Signaling: From Gene-for-Gene Pathways to Protein-Protein Interaction Networks. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**: 862–868.

**Gaude N, Bortfeld S, Duensing N, Lohse M, Krajinski F. 2012.** Arbuscule-containing and non-colonized cortical cells of mycorrhizal roots undergo extensive and specific reprogramming during arbuscular mycorrhizal development. *The Plant Journal* **69**: 510–528.

**Gaude N, Bortfeld S, Erban A, Kopka J, Krajinski F. 2015.** Symbiosis dependent accumulation of primary metabolites in arbuscule-containing cells. *BMC Plant Biology* **15**: 234.

**Genre A, Chabaud M, Balergue C, Puech-Pages V, Novero M, Rey T, Fournier J, Rochange S, Becard G, Bonfante P, et al. 2013.** Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca<sup>2+</sup> spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytologist* **198**: 179–189.

**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*. *The Plant cell* **20**: 1407–1420.

**Genre A, Chabaud M, Timmers T. 2005.** Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *The Plant Cell* **17**: 3489–3499.

**Genre A, Ivanov S, Fendrych M, Faccio A, Žárský 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.

**Genre A, Ortu G, Bertoldo C, Martino E, Bonfante P. 2009.** Biotic and Abiotic Stimulation of Root Epidermal Cells Reveals Common and Specific Responses to Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Plant Physiology* **149**: 1424–1434.

**Gianinazzi-Pearson V, Branzanti B, Gianinazzi S. 1989.** In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis* **7**: 243–255.

**Gibson DM, King BC, Hayes ML, Bergstrom GC. 2011.** Plant pathogens as a source of diverse enzymes for lignocellulose digestion. *Current Opinion in Microbiology* **14**: 264–270.

- Gilbert L, Johnson D. 2016.** Plant–Plant Communication Through Common Mycorrhizal Networks. *Advances in Botanical Research*.
- Gimenez-Ibanez S, Solano R. 2013.** Nuclear jasmonate and salicylate signaling and crosstalk in defense against pathogens. *Frontiers in plant science* **4**: 72.
- Giovannetti M. 2013.** Spore Germination and Pre-Symbiotic Mycelial. Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function.47.
- Giovannetti M, Azzolini D, Citernesi AS. 1999.** Anastomosis formation and nuclear and protoplasmic exchange in arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and environmental microbiology* **65**: 5571–5.
- 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**: 186.
- Giovannetti M, Fortuna P, Citernesi AS, Morini S, Nuti MP. 2001.** The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist* **151**: 717–724.
- Giovannetti M, Mosse B. 1980.** An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* **84**: 489–500.
- Giovannetti M, Sbrana C, Silvia A, Avio L. 1996.** Analysis of factors involved in fungal recognition response to host-derived signals by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **133**: 65.
- Giraldo MC, Dagdas YF, Gupta YK, Mentlak TA, Yi M, Martinez-Rocha AL, Saitoh H, Terauchi R, Talbot NJ, Valent B. 2013.** Two distinct secretion systems facilitate tissue invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Nature Communications* **4**: 1–12.
- Giraldo MC, Valent B. 2013.** Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nature reviews. Microbiology* **11**: 800–14.
- Girard V, Dieryckx C, Job C, Job D. 2013.** Secretomes: The fungal strike force. *Proteomics* **13**: 597–608.
- Giuliani F, Grieve A, Rabouille C. 2011.** Unconventional secretion: A stress on GRASP. *Current Opinion in Cell Biology* **23**: 498–504.
- Glass NL, Schmoll M, Cate JHD, Coradetti S. 2013.** Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. *Annual review of microbiology* **67**: 477–98.
- Gomez-Roldan V, Roux C, Girard D, Becard G, Puech V. 2007.** Strigolactones: promising plant signals. *Plant Signaling & Behavior* **2**: 163–164.
- Gomez SK, Harrison MJ. 2009.** Laser microdissection and its application to analyze gene expression in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Pest management science* **65**: 504–11.
- Gomez SK, Javot H, Deewatthanawong P, Torres-Jerez I, Tang Y, Blancaflor EB, Udvardi MK, Harrison MJ. 2009.** *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC plant biology* **9**: 10.
- Goodin MM, Zaitlin D, Naidu RA, Lommel SA. 2008.** *Nicotiana benthamiana* : Its history and future as a model for plant–pathogen interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 1015–1026.
- Gough C, Cullimore J. 2011.** Lipo-chitoooligosaccharide signaling in endosymbiotic plant-microbe interactions. *Molecular plant-microbe interactions* **24**: 867–78.
- 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 J. 2000.** Assessing costs of arbuscular mycorrhizal symbiosis in agroecosystems. *CURRENT ADVANCES IN MYCORRHIZAE RESEARCH*: 127–140.
- Griesbeck O, Baird GS, Campbell RE, Zacharias DA, Tsien RY. 2001.** Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 29188–29194.
- Griffith M, Griffith OL, Mwenifumbo J, Goya R, Morrissy AS, Morin RD, Corbett R, Tang MJ, Hou Y-C, Pugh TJ, et al. 2010.** Alternative expression analysis by RNA sequencing. *Nat. Methods* **7**: 843–847.
- Grønlund M, Olsen A, Johansen EI, Jakobsen I. 2010.** Protocol: using virus-induced gene silencing to study the arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Pisum sativum*. *Plant methods* **6**: 28.
- Groten K, Nawaz A, Nguyen NHT, Santhanam R, Baldwin IT. 2015a.** Silencing a key gene of the common symbiosis pathway in *Nicotiana attenuata* specifically impairs arbuscular mycorrhizal infection without influencing the root-associated microbiome or plant growth. *Plant, Cell & Environment*: n/a-n/a.
- Groten K, Pahari NT, Xu S, Miloradovic van Doorn M, Baldwin IT. 2015b.** Virus-Induced Gene Silencing Using Tobacco Rattle Virus as a Tool to Study the Interaction between *Nicotiana attenuata* and *Rhizophagus irregularis*. *Plos One* **10**: e0136234.
- El Gueddari NE, Rauchhaus U, Moerschbacher BM, Deising HB. 2002.** Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plant pathogenic fungi. *New Phytologist* **156**: 103–112.
- Guether M, Neuhäuser B, Balestrini R, Dynowski M, Ludewig U, Bonfante P. 2009.** A mycorrhizal-specific

ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant physiology* **150**: 73–83.

**Gust AA, Willmann R, Desaki Y, Grabherr HM, Nürnberger T. 2012.** Plant LysM proteins: Modules mediating symbiosis and immunity. *Trends in Plant Science* **17**: 495–502.

**Gutjahr C, Banba M, Croset V, An K, Miyao A, An G, Hirochika H, Imaizumi-Anraku H, Paszkowski U. 2008.** Arbuscular Mycorrhiza-Specific Signaling in Rice Transcends the Common Symbiosis Signaling Pathway. *the Plant Cell Online* **20**: 2989–3005.

**Gutjahr C, Gobbato E, Choi J, Riemann M, Johnston MG, Summers W, Carbonnel S, Mansfield C, Yang S-YS-Y, Nadal M, et al. 2015.** Rice perception of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi requires the karrikin receptor complex. *Science* **350**: 1521–1524.

**Gutjahr C, Parniske M. 2013.** Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **29**: 593–617.

**Guttman DS, McHardy AC, Schulze-Lefert P. 2014.** Microbial genome-enabled insights into plant–microorganism interactions. *Nature Reviews Genetics* **15**: 797–813.

**Guyon K, Balagué C, Roby D, Raffaele S. 2014.** Secretome analysis reveals effector candidates associated with broad host range necrotrophy in the fungal plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *BMC genomics* **15**: 336.

**Hagen DC, McCaffrey G, Sprague GF. 1986.** Evidence the yeast STE3 gene encodes a receptor for the peptide pheromone a factor: gene sequence and implications for the structure of the presumed receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**: 1418–1422.

**Hara-Nishimura I, Hatsugai N. 2011.** The role of vacuole in plant cell death. *Cell Death And Differentiation* **18**: 1298–1304.

**Harrier LA, Millam S. 2001.** Biolistic Transformation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Progress and Perspectives. *Molecular Biotechnology* **18**: 25–34.

**Harrison MJ. 2005.** Signaling in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Annual Review of Microbiology* **59**: 19–42.

**Harrison MJ. 2012.** Cellular programs for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current opinion in plant biology* **15**: 691–8.

**Harrison MJ, Dewbre GR, Liu J. 2002.** A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *The Plant cell* **14**: 2413–29.

**Hatakka A. 1994.** Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews* **13**.

**Hawkins H-J, Johansen A, George E. 2000.** Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **226**: 275–285.

**Hegedus DD, Rimmer SR. 2005.** *Sclerotinia sclerotiorum*: When ‘to be or not to be’ a pathogen? *FEMS Microbiology Letters* **251**: 177–184.

**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*. : 537–548.

**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. *The Plant cell* **23**: 3812–23.

**Hemetsberger C, Herrberger C, Zechmann B, Hillmer M, Doehlemann G. 2012.** The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *PLoS pathogens* **8**: e1002684.

**Hemetsberger C, Mueller N, Matei A, Herrberger C, Doehlemann G. 2015.** The fungal core effector Pep1 is conserved across smuts of dicots and monocots. *New Phytologist*.

**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.

**Hiller NL, Bhattacharjee S, van Ooij C, Liolios K, Harrison T, Lopez-Estraño C, Haldar K. 2004.** A Host-Targeting Signal in Virulence Proteins Reveals a Secretome in Malarial Infection. *Science* **306**.

**Ho I, Trappe JM. 1973.** Translocation of C from *Festuca* plants to their endomycorrhizal fungi. *Nature: New biology* **244**: 30–1.

**Hofrichter M. 2002.** Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* **30**: 454–466.

**Hogekamp C, Arndt D, Pereira P a., Becker JD, Hohnjec N, Kuster H. 2011.** Laser Microdissection Unravels Cell-

Type-Specific Transcription in Arbuscular Mycorrhizal Roots, Including CAAT-Box Transcription Factor Gene Expression Correlating with Fungal Contact and Spread. *Plant Physiology* **157**: 2023–2043.

**Hong JJ, Park YS, Bravo A, Bhattarai KK, Daniels DA, Harrison MJ. 2012.** Diversity of morphology and function in arbuscular mycorrhizal symbioses in *Brachypodium distachyon*. *Planta* **236**: 851–865.

**Hooper L V., Stappenbeck TS, Hong C V., Gordon JI. 2003.** Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nature Immunology* **4**: 269–273.

**Humphreys CP, Franks PJ, Rees M, Bidartondo MI, Leake JR, Beerling DJ. 2010.** Mutualistic mycorrhiza-like symbiosis in the most ancient group of land plants. *Nature Communications* **1**: 103.

**Islam M, Haque M, Islam M, Emdad E, Halim A, Hossen QM, Hossain M, Ahmed B, Rahim S, Rahman M, et al. 2012.** Tools to kill: Genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. *BMC Genomics* **13**: 493.

**Jakobsen I, Rosendahl L. 1990.** Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytologist* **115**: 77–83.

**Jalving R, Van De Vondervoort PJI, Visser J, Schaap PJ. 2000.** Characterization of the kexin-like maturase of *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 363–368.

**Jashni MK, Mehrabi R, Collemare J, Mesarich CH, de Wit PJGM. 2015.** The battle in the apoplast: further insights into the roles of proteases and their inhibitors in plant–pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1–7.

**Jasper DA, Robson AD, Abbott LK. 1979.** Phosphorus and the formation of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Soil Biology and Biochemistry* **11**: 501–505.

**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.

**Jones JDG, Dangl L. 2006.** The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.

**Jonge R De, Esse HP Van, Kombrink A, Shinya T, Desaki Y, Bours R, Krol S Van Der, Shibuya N, Joosten MH A J, Thomma BPHJ. 2010.** Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* **329**: 953–955.

**Jung SC, Martinez-Medina A, Lopez-Raez J a, Pozo MJ. 2012.** Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of chemical ecology* **38**: 651–64.

**Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiya C, Dohmae N, Takio K, Minami E, Shibuya N. 2006.** Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 11086–91.

**Kamel L, Keller-pearson M, Roux C, An J. 2016.** Biology and evolution of arbuscular mycorrhizal symbiosis in the light of genomics. *New Phytologist*.

**Kämper J, Kahmann R, Bölker M, Ma L-J, Brefort T, Saville BJ, Banuett F, Kronstad JW, Gold SE, Müller O, et al. 2006.** Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**: 97–101.

**Karimi Jashni M, Dols IHM, Iida Y, Boeren S, Beenen HG, Mehabi R, Collemare J, De Wit PJGM. 2015.** Synergistic action of serine- and metallo-proteases from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* cleaves chitin-binding tomato chitinases, reduces their antifungal activity and enhances fungal virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **28**: 150427105219007.

**Kazan K, Lyons R. 2014.** Intervention of Phytohormone Pathways by Pathogen Effectors. *The Plant cell* **26**: 2285–2309.

**Kemen E, Kemen AC, Rafiqi M, Hempel U, Mendgen K, Hahn M, Voegelé RT. 2005.** Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **18**: 1130–1139.

**Kenrick P, Strullu-Derrien C. 2014.** The Origin and Early Evolution of Roots. *PLANT PHYSIOLOGY* **166**: 570–580.

**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*: 1202–1208.

**Kikuchi Y, Hijikata N, Yokoyama K, Ohtomo R, Handa Y, Kawaguchi M, Saito K, Ezawa T. 2014.** Polyphosphate accumulation is driven by transcriptome alterations that lead to near-synchronous and near-equivalent uptake of inorganic cations in an arbuscular mycorrhizal fungus. *The New phytologist*.

**Kim K-T, Jeon J, Choi J, Cheong K, Song H, Choi G, Kang S, Lee Y-H. 2016.** Kingdom-Wide Analysis of Fungal Small Secreted Proteins (SSPs) Reveals their Potential Role in Host Association. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1–13.

**King BC, Waxman KD, Nenni N V, Walker LP, Bergstrom GC, Gibson DM. 2011.** Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. *Biotechnology for biofuels* **4**: 4.

**Kleemann J, Rincon-Rivera LJ, Takahara H, Neumann U, Ver Loren van Themaat E, van Themaat EVL, van der Does HC, Hacquard S, Stüber K, Will I, et al. 2012.** Sequential delivery of host-induced virulence effectors by

appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS pathogens* **8**: e1002643.

**Klis FM, Mol P, Hellingwerf K, Stanley B. 2002.** Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews Review* **26**: 239–256.

**Kloppholz S, Kuhn H, Requena N. 2011.** A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Current Biology* **21**: 1204–1209.

**Kobae Y, Hata S. 2010.** Dynamics of periarbuscular membranes visualized with a fluorescent phosphate transporter in arbuscular mycorrhizal roots of rice. *Plant and Cell Physiology* **51**: 341–353.

**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.

**Kobae Y, Tomioka R, Tanoi K, Kobayashi NI, Ohmori Y, Nishida S, Fujiwara T. 2014.** Selective induction of putative iron transporters, *OPT8a* and *OPT8b*, in maize by mycorrhizal colonization. *Soil Science and Plant Nutrition* **60**: 843–847.

**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.

**Kombrink A, Sánchez-Vallet A, Thomma BPHJ. 2011.** The role of chitin detection in plant-pathogen interactions. *Microbes and Infection* **13**: 1168–1176.

**Koske RE. 1981.** Multiple germination by spores of *Gigaspora gigantea*. *Transactions of the British Mycological Society* **76**: 328–330.

**Kosová K, Vítámvás P, Prážil IT, Renaut J. 2011.** Plant proteome changes under abiotic stress - Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics* **74**: 1301–1322.

**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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 9823–8.

**Kreps JA, Wu Y, Chang H, Zhu T, Wang X, Harper JF, Mesa T, Row M, Diego S, California JAK, et al. 2002.** Transcriptome Changes for Arabidopsis in Response to Salt, Osmotic, and Cold Stress. *Plant physiology* **130**: 2129–2141.

**Kubicek CP, Starr TL, Glass NL. 2014.** Plant Cell Wall-Degrading Enzymes and Their Secretion in Plant-Pathogenic Fungi. *Annual review of phytopathology*: 1–25.

**Larose G, Chênevert R, Moutoglis P, Gagné S, Piché Y, Vierheilig H. 2002.** Flavonoid levels in roots of *Medicago sativa* are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Plant Physiology* **159**: 1329–1339.

**Latgé JP. 2007.** The cell wall: A carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology* **66**: 279–290.

**Laressergues D, Couzigou J-M, Clemente HS, Martinez Y, Dunand C, Bécard G, Combier J-P. 2015.** Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. *Nature* **520**: 90–93.

**Laressergues D, Delaux P-M, Formey D, Lelandais-Brière C, Fort S, Cottaz S, Bécard G, Niebel A, Roux C, Combier J-P. 2012.** The microRNA miR171h modulates arbuscular mycorrhizal colonization of *Medicago truncatula* by targeting NSP2. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **72**: 512–22.

**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* **82**: 1016–1045.

**Lee MCS, Miller EA, Goldberg J, Orci L, Schekman R. 2004.** Bi-Directional Protein Transport Between the ER and Golgi. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **20**: 87–123.

**Lee W, Rudd JJ, Hammond-kosack KE, Kanyuka K. 2014.** *Mycosphaerella graminicola* LysM Effector-Mediated Stealth Pathogenesis Subverts Recognition Through Both CERK1 and CEBiP Homologues in Wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**: 236–243.

**Lee WS, Rudd JJ, Kanyuka K. 2015.** Virus induced gene silencing (VIGS) for functional analysis of wheat genes involved in *Zymoseptoria tritici* susceptibility and resistance. *Fungal Genetics and Biology* **79**: 84–88.

**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.

**Leung TLF, Poulin R. 2008.** Parasitism, Commensalism, and Mutualism: Exploring the Many Shades of Symbioses. *Life and Environment* **58**: 107–115.

**Lévesque CA, Brouwer H, Cano L, Hamilton JP, Holt C, Huitema E, Raffaele S, Robideau GP, Thines M, Win J, et al. 2010.** Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. *Genome biology* **11**: R73.

**Li T, Hu Y-J, Hao Z-P, Li H, Wang Y-S, Chen B-D. 2013.** First cloning and characterization of two functional aquaporin genes from an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *The New phytologist* **197**: 617–30.

**Lin K, Limpens E, Zhang Z, Ivanov S, Saunders DGO, Mu D, Pang E, Cao H, Cha H, Lin T, et al. 2014.** Single nucleus genome sequencing reveals high similarity among nuclei of an endomycorrhizal fungus. *PLoS genetics* **10**: e1004078.

**Liu J. 2003.** Transcript Profiling Coupled with Spatial Expression Analyses Reveals Genes Involved in Distinct Developmental Stages of an Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *THE PLANT CELL ONLINE* **15**: 2106–2123.

**Liu J, Maldonado-Mendoza I, Lopez-Meyer M, Cheung F, Town CD, Harrison MJ. 2007.** Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *The Plant Journal* **50**: 529–44.

**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 YL, Schiff M, Dinesh-Kumar SP. 2002a.** Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant Journal* **31**: 777–786.

**Liu YL, Schiff M, Marathe R, Dinesh-Kumar SP. 2002b.** Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant Journal* **30**: 415–429.

**Liu T, Song T, Zhang X, Yuan H, Su L, Li W, Xu J, Liu S, Chen L, Chen T, et al. 2014.** Unconventionally secreted effectors of two filamentous pathogens target plant salicylate biosynthesis. *Nature communications* **5**: 4686.

**Lohse S, Schliemann W, Ammer C, Kopka J, Strack D, Fester T. 2005.** Organization and metabolism of plastids and mitochondria in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Plant physiology* **139**: 329–40.

**Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. 2014.** The carbohydrate-active enzymes database (CAZY) in 2013. *Nucleic Acids Research* **42**: 490–495.

**Lopez-Obando M, Ligerot Y, Bonhomme S, Boyer F-D, Rameau C. 2015.** Strigolactone biosynthesis and signaling in plant development. *Development (Cambridge, England)* **142**: 3615–9.

**Lota F, Wegmüller S, Buer B, Sato S, Bräutigam A, Hanf B, Bucher M. 2013.** The cis-acting CTC-PT1BS module is indicative for gene function of LjVTI12, a Qb-SNARE protein gene that is required for arbuscule formation in *Lotus japonicus*. *Plant Journal* **74**: 280–293.

**Lowie RGT, Howlett BJ. 2012.** Indifferent, affectionate, or deceitful: Lifestyles and secretomes of fungi. *PLoS Pathogens* **8**: 1–3.

**Lum G, Min XJ. 2011.** FunSecKB: The Fungal Secretome KnowledgeBase. *Database* **2011**: 1–10.

**Lundell TK, Mäkelä MR, Hildén K. 2010.** Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes - Ecological, functional and phylogenetic review. *Journal of Basic Microbiology* **50**: 5–20.

**Macho AP, Zipfel C. 2014.** Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular Cell* **54**: 263–272.

**Maillet F, Poinsot V, André O, Puech-Pagès V, Haouy A, Gueunier M, Cromer L, Giraudet D, Formey D, Niebel A, et al. 2011.** Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* **469**: 58–63.

**Maldonado-Mendoza I, Dewbre G, Harrison M. 2001.** A phosphate transporter gene from the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 1140–1148.

**Maller JL. 2003.** Fishing at the Cell Surface. *Science* **300**.

**Manck-Götzenberger J, Requena N. 2016.** Arbuscular mycorrhiza Symbiosis Induces a Major Transcriptional Reprogramming of the Potato SWEET Sugar Transporter Family. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1–14.

**Marshall R, Kombrink A, Motteram J, Loza-Reyes E, Lucas J, Hammond-Kosack KE, Thomma BPHJ, Rudd JJ. 2011.** Analysis of two in planta expressed LysM effector homologs from the fungus *Mycosphaerella graminicola* reveals novel functional properties and varying contributions to virulence on wheat. *Plant physiology* **156**: 756–69.

**Martin F, Aerts A, Ahrén D, Brun A, Danchin EGJ, Duchaussoy F, Gibon J, Kohler A, Lindquist E, Pereda V, et al. 2008a.** The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* **452**: 88–92.

**Martin F, Gianinazzi-Pearson V, Hijri M, Lammers P, Requena N, Sanders IR, Shachar-Hill Y, Shapiro H, Tuskan GA, Young JPW. 2008b.** The long hard road to a completed *Glomus intraradices* genome. *New Phytologist* **180**: 747–750.

**Martin K, Kopperud K, Chakrabarty R, Banerjee R, Brooks R, Goodin MM. 2009.** Transient expression in *Nicotiana benthamiana* fluorescent marker lines provides enhanced definition of protein localization, movement and interactions in planta. *Plant Journal* **59**: 150–162.

**Martin F, Tuskan GA, DiFazio SP, Lammers P, Newcombe G, Podila GK. 2004.** Symbiotic sequencing for the *Populus mesocosm* Sequencing. *New Phytologist*: 330–335.

**Martinez D, Challacombe J, Morgenstern I, Hibbett D, Schmoll M, Kubicek CP, Ferreira P, Ruiz-Duenas FJ, Martinez AT, Kersten P, et al. 2009.** Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus

Postia placenta supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 1954–1959.

**Martinoia E, Maeshima M, Neuhaus HE. 2007.** Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany* **58**: 83–102.

**Mascia T, Nigro F, Abdallah A, Ferrara M, De Stradis A, Faedda R, Palukaitis P, Gallitelli D. 2014.** Gene silencing and gene expression in phytopathogenic fungi using a plant virus vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 4291–6.

**Matsubara K, Hinoi T, Koyama S, Kikuchi A. 1997.** The post-translational modifications of Ral and Rac1 are important for the action of Ral-binding protein 1, a putative effector protein of Ral. *FEBS Letters* **410**: 169–174.

**Maxwell CA, Hartwig UA, Joseph CM, Phillips DA. 1989.** A Chalcone and Two Related Flavonoids Released from Alfalfa Roots Induce nod Genes of Rhizobium meliloti. *Plant physiology* **91**: 842–7.

**Mayer AM, Staples RC. 2002.** Laccase: New functions for an old enzyme. *Phytochemistry* **60**: 551–565.

**Maynard Smith J. 1996.** Evolution: contemplating life without sex. *Nature* **324**: 300–1.

**McCotter SW, Horianopoulos LC, Kronstad JW. 2016.** Regulation of the fungal secretome. *Current Genetics* **62**: 533–545.

**Meijer HJG, Mancuso FM, Espadas G, Seidl MF, Chiva C, Govers F, Sabido E. 2014.** Profiling the secretome and extracellular proteome of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular & cellular proteomics : MCP*: M113.035873-.

**Meister G, Tuschi T. 2004.** Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**: 343–349.

**Menge JA, Steirle D, Bagyaraj DJ, Johnson EL V., Leonard RT. 1978.** Phosphorus concentrations in plants responsible for inhibition of mycorrhizal infection. *New Phytologist* **80**: 575–578.

**Mentlak TT a., Kombrink A, Shinya T, Ryder LS, Otomo I, Saitoh H, Terauchi R, Nishizawa Y, Shibuya N, Thomma BPHJ, et al. 2012.** Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *The Plant Cell ...* **24**: 1–15.

**Mitchum MG, Hussey RS, Baum TJ, Wang X, Elling AA, Wubben M, Davis EL. 2013.** Nematode effector proteins: An emerging paradigm of parasitism. *New Phytologist* **199**: 879–894.

**Morgan W, Kamoun S. 2007.** RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *Current Opinion in Microbiology* **10**: 332–338.

**Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. 2008.** Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods* **5**: 621–628.

**Mueller O, Kahmann R, Aguilar G, Trejo-Aguilar B, Wu A, de Vries RP. 2008.** The secretome of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology* **45**: S63–S70.

**Mueller AN, Ziemann S, Treitschke S, Aßmann D, Doeblemann G. 2013.** Compatibility in the *Ustilago maydis*–Maize Interaction Requires Inhibition of Host Cysteine Proteases by the Fungal Effector Pit2. *PLoS Pathogens* **9**: e1003177.

**Mugnier J, Mosse B. 1987.** Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in transformed Ri T DNA roots grown axenically. *The American Phytopathological Society* **77**: 1045–1050.

**Mullins ED, Chen X, Romaine P, Raina R, Geiser DM, Kang S. 2001.** Agrobacterium-Mediated Transformation of *Fusarium oxysporum*: An Efficient Tool for Insertional Mutagenesis and Gene Transfer. *Phytopathology* **91**: 173–180.

**Müntz K. 2007.** Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2391–2407.

**Nagahashi G, Douds DDJ. 1997.** Appressorium formation by AM roots fungi on isolated cell walls of carrot. *New Phytologist* **136**: 299–304.

**Nagahashi G, Douds DD. 2000.** Partial separation of root exudate components and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. *Mycological Research* **104**: 1453–1464.

**Nagahashi G, Douds DD. 2004.** Isolated root caps, border cells, and mucilage from host roots stimulate hyphal branching of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora gigantea*. *Mycological Research* **108**: 1079–1088.

**Nagahashi G, Douds DD. 2011.** The effects of hydroxy fatty acids on the hyphal branching of germinated spores of AM fungi. *Fungal Biology* **115**: 351–358.

**Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. 2003.** *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **67**: 400–28, table of contents.

**Nars A, Lafitte C, Chabaud M, Drouillard S, Mélida H, Danoun S, Le Costaouëc T, Rey T, Benedetti J, Bulone V, et al. 2013.** *Aphanomyces euteiches* Cell Wall Fractions Containing Novel Glucan-Chitosaccharides Induce Defense Genes and Nuclear Calcium Oscillations in the Plant Host *Medicago truncatula*. *PLoS ONE* **8**: 1–13.

**Nickel W, Rabouille C. 2008.** Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**: 148–155.



- Nouri E, Breuillin-Sessoms F, Feller U, Reinhardt D. 2014.** Phosphorus and nitrogen regulate arbuscular mycorrhizal symbiosis in petunia hybrida. *PLoS ONE* **9**.
- Nowara D, Gay A, Lacomme C, Shaw J, Ridout C, Douchkov D, Hensel G, Kumlehn J, Schweizer P. 2010.** HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *The Plant cell* **22**: 3130–41.
- O’Connell R, Herbert C, Sreenivasaprasad S, Khatib M, Esquerré-Tugayé M-T, Dumas B. 2004.** A novel Arabidopsis-Colletotrichum pathosystem for the molecular dissection of plant-fungal interactions. *Molecular plant-microbe interactions* **17**: 272–282.
- O’Connell RJ, Thon MR, Hacquard S, Amyotte SG, Kleemann J, Torres MF, Damm U, Buiate E a, Epstein L, Alkan N, et al. 2012.** Lifestyle transitions in plant pathogenic Colletotrichum fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature genetics* **44**: 1060–5.
- Okazaki S, Kaneko T, Sato S, Saeki K. 2013.** Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 17131–17136.
- Okazaki S, Okabe S, Higashi M, Shimoda Y, Sato S, Tabata S, Hashiguchi M, Akashi R, Göttfert M, Saeki K. 2010.** Identification and functional analysis of type III effector proteins in *Mesorhizobium loti*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **23**: 223–234.
- Okubara PA, Paulitz TC. 2005.** Root defense responses to fungal pathogens: A molecular perspective. *Plant and Soil*: 215–226.
- Oláh B, Brière C, Bécard G, Dénarié J, Gough C. 2005.** Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *Plant Journal* **44**: 195–207.
- Oldroyd GED. 2013.** Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature reviews. Microbiology* **11**: 252–63.
- Oldroyd GED, Harrison MJ, Paszkowski U. 2009.** Reprogramming plant cells for endosymbiosis. *Science (New York, N.Y.)* **324**: 753–4.
- 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.
- Parniske M. 2008.** Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature reviews. Microbiology* **6**: 763–75.
- 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.
- Peleg Z, Blumwald E. 2011.** Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 290–295.
- Pellegrin C, Morin E, Martin FM, Veneault-Fourrey C. 2015.** Comparative analysis of secretomes from ectomycorrhizal fungi with an emphasis on small-secreted proteins. *Frontiers in Microbiology* **6**: 1–15.
- Pérez-Tienda J, Corrêa A, Azcón-Aguilar C, Ferrol N. 2014.** Transcriptional regulation of host NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporters and GS/GOGAT pathway in arbuscular mycorrhizal rice roots. *Plant Physiology and Biochemistry* **75**: 1–8.
- Pérez-Tienda J, Valderas A, Camaño G, García-Agustín P, Ferrol N. 2012.** Kinetics of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake by the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *Mycorrhiza* **22**: 485–491.
- Pérez P, Ribas JC. 2004.** Cell wall analysis. *Methods* **33**: 245–251.
- Petre B, Kamoun S. 2014.** How Do Filamentous Pathogens Deliver Effector Proteins into Plant Cells? *PLoS Biology* **12**.
- Pierleoni A, Martelli P, Casadio R. 2008.** PredGPI: a GPI-anchor predictor. *BMC Bioinformatics* **9**: 392.
- Plenchette C, Furian V, Fortin J. 1982.** Effects of different endomycorrhizal fungi on five host plants grown on calcined montmorillonite clay [Apple, asparagus, leek, strawberry, oats]. *Journal American Society for Horticultural Science*.
- Plett JM, Daguerrre Y, Wittulsky S, Vayssières A, Deveau A, Melton SJ, Kohler A, Morrell-Falvey JL, Brun A, Veneault-Fourrey C, et al. 2014.** Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus* JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 8299–304.
- Plett JM, Kempainen M, Kale SD, Kohler A, Legué V, Brun A, Tyler BM, Pardo AG, Martin F. 2011.** A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Current biology* **21**: 1197–203.
- Plett JM, Martin F. 2012.** Poplar root exudates contain compounds that induce the expression of MiSSP7 in *Laccaria bicolor*. *Plant signaling & behavior* **7**: 12–5.
- Poisson G, Chauve C, Chen X, Bergeron A. 2007.** FragAnchor: A Large-Scale Predictor of

Glycosylphosphatidylinositol Anchors in Eukaryote Protein Sequences by Qualitative Scoring. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* **5**: 121–130.

**Poussereau N, Gente S, Rascle C, Billon-Grand G, Fèvre M. 2001.** aspS encoding an unusual aspartyl protease from *Sclerotinia sclerotiorum* is expressed during phytopathogenesis. *FEMS Microbiology Letters* **194**: 27–32.

**Lo Presti L, Lanver D, Schweizer G, Tanaka S, Liang L, Tollot M, Zuccaro A, Reissmann S, Kahmann R. 2015.** Fungal Effectors and Plant Susceptibility. *Annual review of plant biology* **66**: 513–545.

**Lo Presti L, Zechmann B, Kumlehn J, Liang L, Lanver D, Tanaka S, Bock R, Kahmann R. 2016.** An assay for entry of secreted fungal effectors into plant cells. *New Phytologist*.

**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**: 809–19.

**Pumplin N, Mondo SJ, Topp S, Starker CG, Gantt JS, Harrison MJ. 2010.** *Medicago truncatula* Vapyrin is a novel protein required for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant journal* **61**: 482–94.

**Pumplin N, Zhang X, Noar RD, Harrison MJ. 2012.** Polar localization of a symbiosis-specific phosphate transporter is mediated by a transient reorientation of secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 665–672.

**Rabouille C. 2016.** Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends in Cell Biology* **xx**: 1–11.

**Raffaele S, Kamoun S. 2012.** Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better. *Nature Reviews Microbiology* **10**: 417–430.

**Rafiqi M, Ellis JG, Ludowici VA, Hardham AR, Dodds PN. 2012.** Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 477–482.

**Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC. 2001.** Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant Journal* **25**: 237–245.

**Redecker D, Kodner R, Graham LE, Stahl M, Pirozynski KA, Malloch DW, Simon L, Bousquet J, Levesque RC, Lalonde M, et al. 2000.** Glomalean fungi from the Ordovician. *Science (New York, N.Y.)* **289**: 1920–1.

**Redecker D, Schüßler A, Stockinger H, Stürmer SL, Morton JB, Walker C. 2013.** An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza* **23**: 515–531.

**Rey T, Nars A, Bonhomme M, Bottin A, Huguet S, Balzergue S, Jardinaud M-F, Bono J-J, Cullimore J, Dumas B, et al. 2013.** NFP, a LysM protein controlling Nod factor perception, also intervenes in *Medicago truncatula* resistance to pathogens. *The New phytologist* **198**: 875–86.

**Riley R, Corradi N. 2013.** Searching for clues of sexual reproduction in the genomes of arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Ecology* **6**: 44–49.

**Rooney HCE, van't Klooster JW, van der Hoorn RAL, Joosten MAHJ, Jones JDG, De Wit PJGM. 2005.** Cladosporium Avr2 Inhibits Tomato Rcr3 Protease Required for Cf-2-Dependent Disease Resistance. *Science* **308**: 1783–1786.

**Ropars J, Corradi N. 2015.** Homokaryotic vs heterokaryotic mycelium in arbuscular mycorrhizal fungi : different techniques , different results ? *New Phytologist* **789**.

**Ropars J, Toro KS, Noel J, Pelin A, Charron P, Farinelli L, Marton T, Krüger M, Fuchs J, Brachmann A, et al. 2016.** Evidence for the sexual origin of heterokaryosis in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature Microbiology*: 16033.

**Rovenich H, Boshoven JC, Thomma BPHJ. 2014.** Filamentous pathogen effector functions: Of pathogens, hosts and microbiomes. *Current Opinion in Plant Biology* **20**: 96–103.

**Ruiz-Sánchez M, Armada E, Munoz Y, García de Salamone IE, Aroca R, Ruíz-Lozano JM, Azcón R. 2011.** Azospirillum and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. *Journal of Plant Physiology* **168**: 1031–1037.

**Ryan MH, Graham JH. 2002.** Is there a role for arbuscular mycorrhizal fungi in production agriculture? *Plant and Soil* **244**: 263–271.

**Sahu PP, Puranik S, Khan M, Prasad M. 2012.** Recent advances in tomato functional genomics: Utilization of VIGS. *Protoplasma* **249**: 1017–1027.

**Salvioli A, Ghignone S, Novero M, Navazio L, Venice F, Bagnaresi P, Bonfante P. 2015.** Symbiosis with an endobacterium increases the fitness of a mycorrhizal fungus, raising its bioenergetic potential. *The ISME journal* **10**: 1–15.

**Sanchez-Vallet A, Mesters JR, Thomma BPHJ. 2015.** The battle for chitin recognition in plant-microbe interactions. *FEMS Microbiology Reviews* **39**: 171–183.

**Sánchez-Vallet A, Saleem-Batcha R, Kombrink A, Hansen G, Valkenburg DJ, Thomma BPHJ, Mesters JR. 2013.** Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization. *eLife* **2013**: 1–16.

**Sawers RJH, Svane SF, Quan C, Grønlund M, Wozniak B, Gebreselassie M-N, González-Muñoz E, Chávez Montes RA, Baxter I, Goudet J, 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*.

**Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM. 1998.** Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. *PLANT PHYSIOLOGY* **116**: 447–453.

**Schenck NC, Graham SO, Green NE. 1975.** Temperature and Light Effect on Contamination and Spore Germination of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Mycologia* **67**: 1189–1192.

**Schornack S, van Damme M, Bozkurt TO, Cano LM, Smoker M, Thines M, Gaulin E, Kamoun S, Huitema E. 2010.** Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 17421–6.

**Schreiner RP, Koide RT. 1993.** Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi by mycotrophic and nonmycotrophic plant root systems. *Applied and environmental microbiology* **59**: 2750–2.

**Schussler A, Martin H, Cohen D, Fitz M, Wipf D. 2006.** Characterization of a carbohydrate transporter from symbiotic glomeromycotan fungi. *Nature* **444**: 933–936.

**Schüßler A, Schwarzott D, Walker C. 2001.** A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* **105**: 1413–1421.

**Sedzielewska KA, Fuchs J, Tensch EM, Baronian K, Watzke R, Kunze G. 2011.** Estimation of the Glomus intraradices nuclear DNA content. *New Phytologist* **192**: 794–797.

**Sędzielewska Toro K, Brachmann A. 2016.** The effector candidate repertoire of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus*. *BMC Genomics* **17**: 101.

**Sędzielewska Toro K, Delaux P-M. 2016.** Meetings Mycorrhizal symbioses : today and tomorrow. *New Phytologist*: 917–920.

**Senthil-Kumar M, Mysore KS. 2014.** Tobacco rattle virus–based virus-induced gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Nature Protocols* **9**: 1549–1562.

**Shabab M, Shindo T, Gu C, Kaschani F, Pansuriya T, Chintha R, Harzen A, Colby T, Kamoun S, van der Hoorn RAL. 2008.** Fungal Effector Protein AVR2 Targets Diversifying Defense-Related Cys Proteases of Tomato. *Plant Cell* **20**: 1169–1183.

**Shachar-Hill Y, Pfeffer PE, Douds D, Osman SF, Doner LW, Ratcliffe RG. 1995.** Partitioning of Intermediary Carbon Metabolism in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Leek. *Plant physiology* **108**: 7–15.

**Shi Y, He M. 2014.** Differential gene expression identified by RNA-Seq and qPCR in two sizes of pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Gene* **538**: 313–322.

**Shi L, Li R, Liao S, Bai L, Lu Q, Chen B. 2014.** Prb1, a subtilisin-like protease, is required for virulence and phenotypical traits in the chestnut blight fungus. *FEMS microbiology letters* **359**: 26–33.

**Shinya T, Nakagawa T, Kaku H, Shibuya N. 2015.** Chitin-mediated plant–fungal interactions: catching, hiding and handshaking. *Current Opinion in Plant Biology* **26**: 64–71.

**Singh Arora D, Kumar Sharma R. 2010.** Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **160**: 1760–1788.

**Smith SE, Facelli E, Pope S, Andrew Smith F. 2010.** Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil* **326**: 3–20.

**Smith SE, Read DJ. 2010.** *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press.

**Smith SE, Smith FA. 2011.** Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual review of plant biology* **62**: 227–50.

**Solaiman MZ, Saito M. 1997.** Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry. *New Phytologist* **136**: 533–538.

**Song YY, Zeng R Sen, Xu JF, Li J, Shen X, Yihdego WG. 2010.** Interplant communication of tomato plants through underground common mycorrhizal networks. *PLoS ONE* **5**.

**Spanu PD, Abbott JC, Amselem J, Burgis TA, Soanes DM, Stüber K, Ver Loren van Themaat E, Brown JKM, Butcher S a, Gurr SJ, et al. 2010.** Genome Expansion and Gene Loss in Powdery Mildew Fungi Reveal Tradeoffs in Extreme Parasitism. *Science* **330**: 1543–1546.

**Spanu P, Boller T, Ludwig A, Wiemken A, Faccio A, Bonfante-Fasolo P. 1989.** Chitinase in roots of mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization. *Planta* **177**: 447–455.

**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.

**St Leger RJ, Joshi L, Roberts DW. 1997.** Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology* **143**: 1983–1992.

**Stergiopoulos I, de Wit PJGM. 2009.** Fungal effector proteins. *Annual review of phytopathology* **47**: 233–263.

Sun J, Miller JB, Granqvist E, Wiley-Kalil A, Gobbato E, Maillet F, Cottaz S, Samain E, Venkateshwaran M, Fort S, *et al.* 2015. Activation of symbiosis signaling by arbuscular mycorrhizal fungi in legumes and rice. *The Plant cell* **27**: 823–38.

Takahara H, Hacquard S, Kombrink A, Hughes HB, Halder V, Robin GP, Hiruma K, Neumann U, Shinya T, Kombrink E, *et al.* 2016. *Colletotrichum higginsianum* extracellular LysM proteins play dual roles in appressorial function and suppression of chitin-triggered plant immunity. *New Phytologist* **211**: 1323–1337.

Takeda N, Sato S, Asamizu E, Tabata S, Parniske M. 2009. Apoplastic plant subtilases support arbuscular mycorrhiza development in *Lotus japonicus*. *Plant Journal* **58**: 766–777.

Talbot JM, Martin F, Kohler A, Henrissat B, Peay KG. 2015. Functional guild classification predicts the enzymatic role of fungi in litter and soil biogeochemistry. *Soil Biology and Biochemistry* **88**: 441–456.

Tanaka S, Brefort T, Neidig N, Djamei A, Kahnt J, Vermerris W, Koenig S, Feussner K, Feussner I, Kahmann R. 2014. A secreted *Ustilago maydis* effector promotes virulence by targeting anthocyanin biosynthesis in maize. *eLife* **3**: e01355.

Tang N, San Clemente H, Roy S, Bécard G, Zhao B, Roux C. 2016. A Survey of the Gene Repertoire of *Gigaspora rosea* Unravels Conserved Features among Glomeromycota for Obligate Biotrophy. *Frontiers in Microbiology* **7**: 1–16.

Taylor TN, Remy W, Hass H, Kerp H. 1995. Fossil Arbuscular Mycorrhizae from the Early Devonian. *Mycologia* **87**: 560–573.

Tian C, Kasiborski B, Koul R, Lammers PJ, Bücking 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, Balestrini R, Benabdellah K, Colard A, Croll D, Da Silva C, Gomez SK, Koul R, *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, Kohler A, Symeonidi A, Balestrini R, Charron P, Duensing N, Frey NFD, Gianinazzi-Pearson V, *et al.* 2013. Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 20117–20122.

Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JD, Bron S, van Dijk JM. 2000. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiology and molecular biology reviews* **64**: 515–47.

Tollot M, Wong Sak Hoi J, Van Tuinen D, Arnould C, Chatagnier O, Dumas B, Gianinazzi-Pearson V, Seddas PMA. 2009. An STE12 gene identified in the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* restores infectivity of a hemibiotrophic plant pathogen. *New Phytologist* **181**: 693–707.

Trépanier M, Bécard G, Moutoglis P, Willemot C, Gagné S, Avis TJ, Rioux J, Tre M, Be G, Gagne S. 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**: 1–59.

Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez A, Willmitzer L, Rocha-Sosa M. 1990. Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Molecular & general genetics : MGG* **220**: 245–50.

Vandenkoornhuyse P, Leyval C, Bonnin I. 2001. High genetic diversity in arbuscular mycorrhizal fungi: evidence for recombination events. *Heredity* **87**: 243–253.

Vierheilig H, Coughlan AP, Wyss URS, Recherche C De. 1998. Ink and Vinegar , a Simple Staining Technique for Arbuscular-Mycorrhizal Fungi. *Applied and environmental microbiology* **64**: 5004–5007.

Vincent D, Kohler A, Claverol S, Solier E, Joets J, Gibon J, Lebrun M, Plomion C, Martin F. 2012. Secretome of the Free-living Mycelium from the Ectomycorrhizal Basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Journal of proteome*: 157–171.

Viotti C. 2014. ER and vacuoles: never been closer. *Frontiers in Plant Science* **5**: 20.

Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF. 2009. Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology* **47**: 177–206.

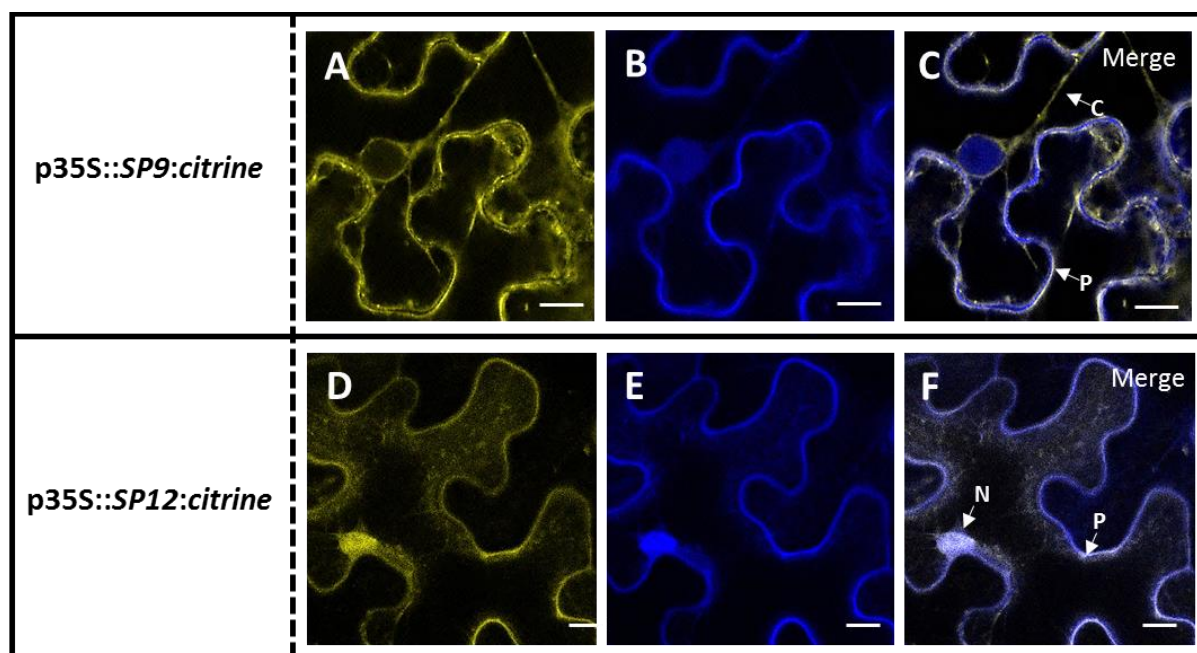
Wahl R, Wippel K, Goos S, Kämper J, Sauer N. 2010. A novel high-affinity sucrose transporter is required for virulence of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *PLoS Biology* **8**.

Walder F, van der Heijden M. 2015. Regulation of resource exchange in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature Plants* **1**: 1–7.

- Wang B, Qiu YL. 2006.** Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* **16**: 299–363.
- Wang E, Schornack S, Marsh JF, Gobbato E, Schwessinger B, Eastmond P, Schultze M, Kamoun S, Oldroyd GED. 2012.** A common signaling process that promotes mycorrhizal and oomycete colonization of plants. *Current biology : CB* **22**: 2242–6.
- Wang W, Wen Y, Berkey R, Xiao S. 2009.** Specific targeting of the Arabidopsis resistance protein RPW8.2 to the interfacial membrane encasing the fungal Haustorium renders broad-spectrum resistance to powdery mildew. *The Plant cell* **21**: 2898–2913.
- Waterhouse PM, Wang M, Lough T. 2001.** Defence Against Viruses. *Nature*.
- Waters CM, Bassler BL. 2005.** QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**: 319–346.
- Wellman CH, Osterloff PL, Mohiuddin U. 2003.** Fragments of the earliest land plants. *Nature* **425**: 282–285.
- 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.
- de Wit PJGM. 2016.** Apoplastic fungal effectors in historic perspective ; a personal view. *New Phytologist*: 1–9.
- Wright DP, Read DJ, Scholes JD. 1998.** Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment* **21**: 881–891.
- Wu AR, Neff NF, Kalisky T, Dalerba P, Treutlein B, Rothenberg ME, Mburu FM, Mantalas GL, Sim S, Clarke MF, et al. 2013.** Quantitative assessment of single-cell RNA-sequencing methods. *Nature Methods* **11**: 41–46.
- Wymelenberg A Vanden, Minges P, Sabat G, Martinez D, Aerts A, Salamov A, Grigoriev I, Shapiro H, Putnam N, Belinky P, et al. 2006.** Computational analysis of the *Phanerochaete chrysosporium* v2.0 genome database and mass spectrometry identification of peptides in ligninolytic cultures reveal complex mixtures of secreted proteins. *Fungal Genetics and Biology* **43**: 343–356.
- Xie X, Huang W, Liu F, Tang N, Liu Y, Lin H, Zhao B. 2013.** Functional analysis of the novel mycorrhiza-specific phosphate transporter AsPT1 and PHT1 family from *Astragalus sinicus* during the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* **198**: 836–852.
- Xie X, Lin H, Peng X, Xu C, Sun Z, Jiang K. 2016.** Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis Requires a Phosphate Transceptor in the *Gigaspora* Fungal Symbiont. *Molecular Plant* **9**: 1583–1608.
- Xu G, Fan X, Miller AJ. 2012.** Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual Review of Plant Biology* **63**: 153–182.
- Xue C, Hsueh Y-P, Hetman J. 2008.** Magnificent seven: roles of G protein-coupled receptors in extracellular sensing in fungi. *FEMS Microbiology Reviews* **32**: 1010–1032.
- Yang S-Y, Grønlund M, Jakobsen I, Grottemeyer MS, Rentsch D, Miyao A, Hirochika H, Kumar CS, Sundaresan V, Salamin N, et al. 2012.** Nonredundant regulation of rice arbuscular mycorrhizal symbiosis by two members of the phosphate transporter1 gene family. *The Plant cell* **24**: 4236–51.
- Yasuda M, Miwa H, Masuda S, Takebayashi Y, Sakakibara H, Okazaki S. 2016.** Effector-triggered Immunity Determines Host Genotype-specific Incompatibility in Legume- *Rhizobium* Symbiosis. *Plant and Cell Physiology* **0**: pcw104.
- Young PW. 2015.** Genome diversity in arbuscular mycorrhizal fungi. *Current Opinion in Plant Biology* **26**: 113–119.
- Zhang H, Franken P. 2014.** Comparison of systemic and local interactions between the arbuscular mycorrhizal fungus *Funneliformis mosseae* and the root pathogen *Aphanomyces euteiches* in *Medicago truncatula*. *Mycorrhiza* **24**: 419–30.
- Zhang G, Gurtu V, Kain SR. 1996.** An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications* **227**: 707–11.
- Zhang X, Pumplun N, Ivanov S, Harrison MJ. 2015.** EXO70I Is Required for Development of a Sub-domain of the Periarbuscular Membrane during Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Current biology : CB* **25**: 2189–2195.
- Zhang S, Xu JR. 2014.** Effectors and Effector Delivery in *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathogens* **10**: 1–4.
- 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.
- Zuccaro A, Lahrmann U, Güldener U, Langen G, Pfiffi S, Biedenkopf D, Wong P, Samans B, Grimm C, Basiewicz M, et al. 2011.** Endophytic Life Strategies Decoded by Genome and Transcriptome Analyses of the Mutualistic Root Symbiont *Piriformospora indica*. *PLoS Pathogens* **7**: e1002290.

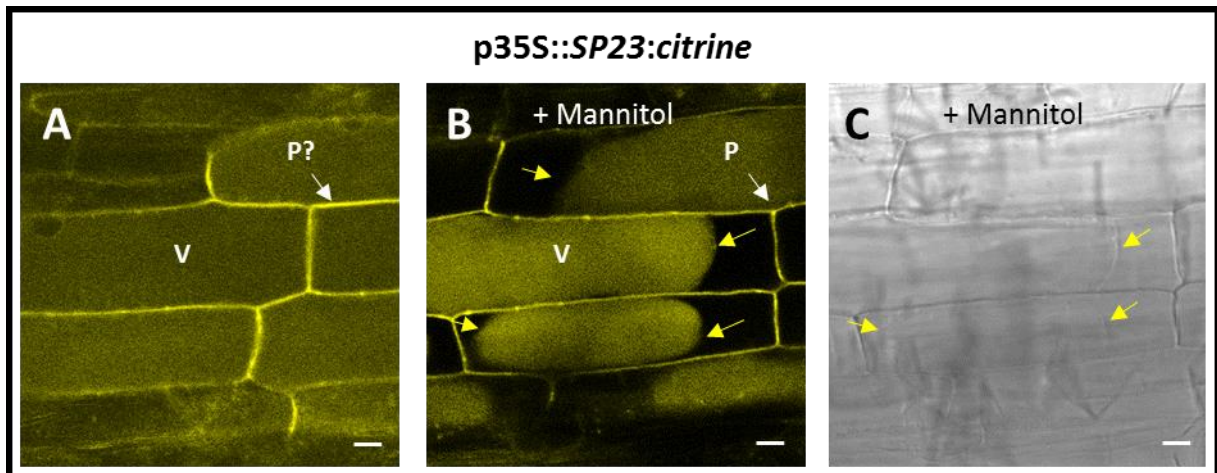
# Annexes

## Annexe 1: Confirmation de la localisation pariétale de SP9 et SP12 dans des feuilles de *N. benthamiana* agroinfiltrées.



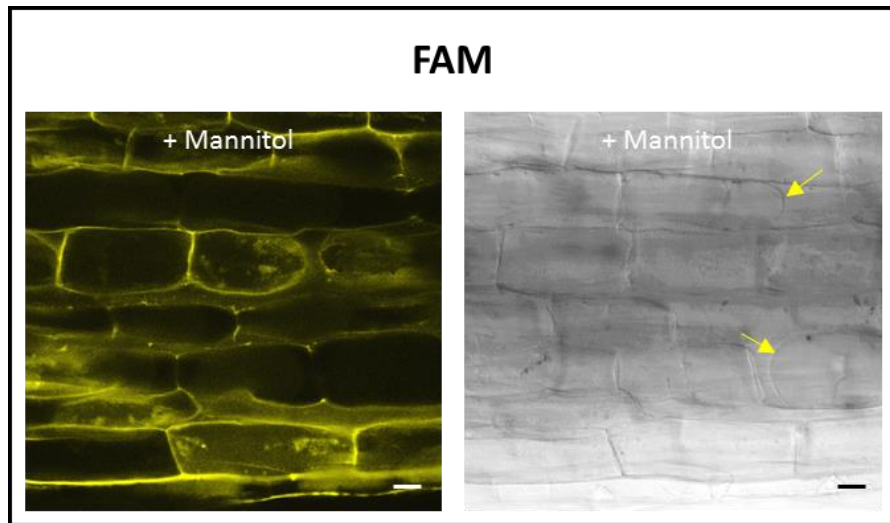
La fluorescence des SPs candidates fusionnées à la citrine est visualisée en jaune (images A et D pour les constructions respectives SP9:citrine et SP12:citrine), tandis que celle correspondant à une protéine localisée en partie dans la paroi (contrôle positif fourni par l'équipe du Dr Jamet, LRSV – non publié) fusionnée à la BFP (Blue Fluorescent Protein) figure en bleu. Les images C et F sont une superposition (merge) des images A et B puis C et D respectivement. Les colocalisations des signaux des différentes protéines apparaissent en blanc. Les observations ont été effectuées entre 2 et 4 jours dans les feuilles de tabac. C : cytoplasme ; N : noyau ; P : paroi. Barre d'échelle : 10  $\mu$ m.

**Annexe 2: Confirmation de la localisation pariétale de SP23 par plasmolyse dans des racines de *M. truncatula* transformées (*p35S::SP23:citrine*) et mycorrhizées.**



L'image A présente la localisation de SP23 fusionnée à la citrine (SP23:citrine) en jaune dans les compartiments vacuolaires et en périphérie des cellules. Les images B et C montrent le marquage dans des cellules plasmolysées après traitement mannitol à 0,5 M durant 10 minutes. Le choc osmotique entraîne une rétractation de la membrane plasmique et du tonoplaste en suivant (flèche en jaune) sans avoir de conséquence sur le signal pariétal. V: vacuole; P?: péricellulaire ; P : paroi. La barre d'échelle représente 10  $\mu$ m.

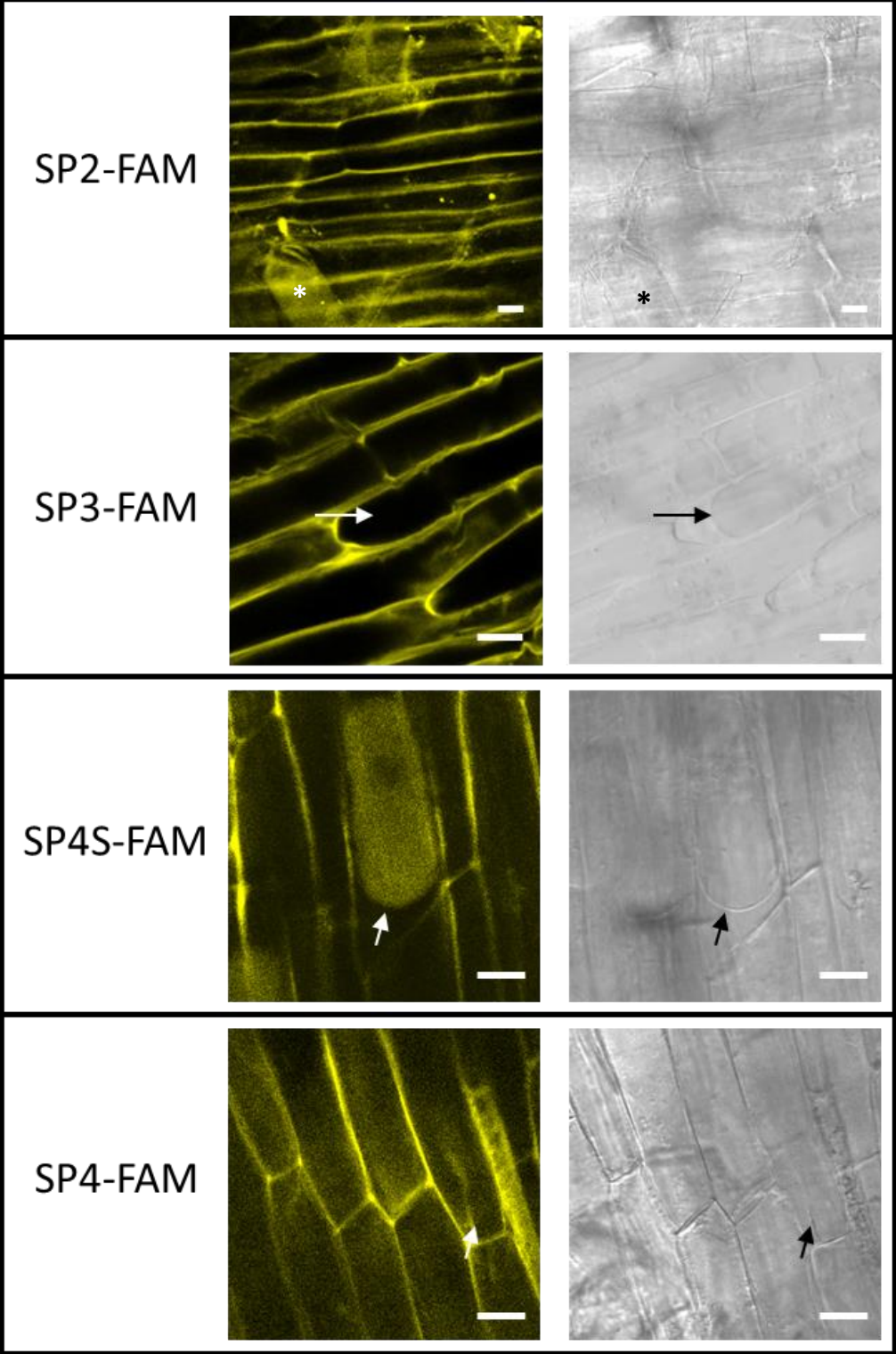
### Annexe 3: Confirmation de la localisation pariétale de la FAM dans la zone pilifère

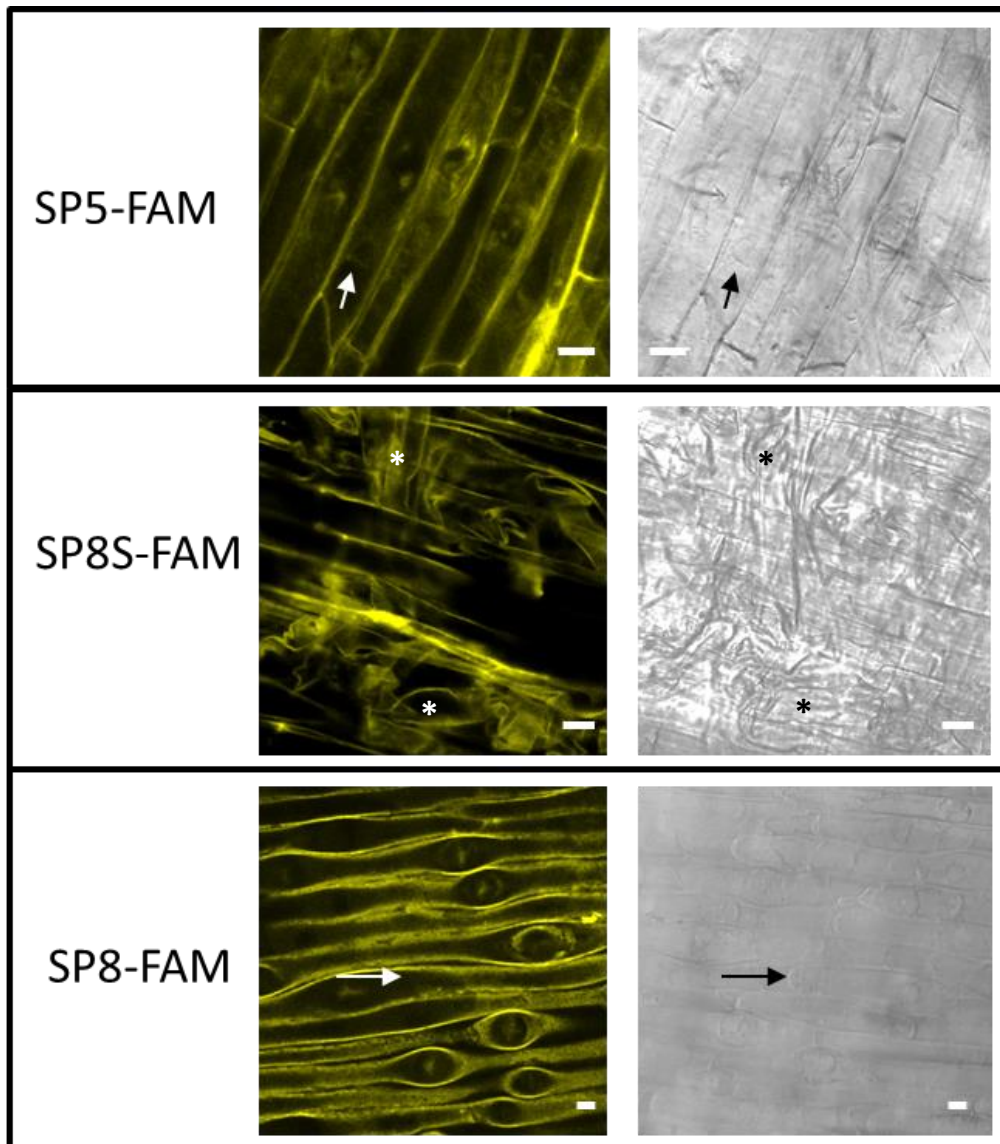


Suite à un traitement mannitol 0,5 M pendant 10 min, les cellules plasmolysées présentent une rétractation des membranes cellulaires (visualisées par les flèches jaunes sur l'image en fond clair). Le signal de la FAM, visualisé en jaune, n'étant pas modifié, il peut en être déduit une localisation pariétale. La barre d'échelle représente 10  $\mu\text{m}$ .



**Annexe 4: Confirmation de la localisation pariétale des SP-FAM dans les racines de *M. truncatula*.**





Les racines ont été traitées durant 10 à 15 min dans une solution de mannitol à 0,5 M. Pour les peptides SP3, SP4S, SP4, SP5 et SP8-FAM les flèches pointent une zone de rétractation membranaire. Pour les peptides SP2 et SP8, la qualité des images ne permet pas d'observer cette rétractation mais la structure des poils absorbant (\*) confirme la présence du stress osmotique. Aucune image exploitable n'a pu être obtenue pour SP1-FAM. Dans leur totalité, ces observations pointent une localisation pariétale de ces SPs.

**Annexe 5 : Kamel *et al.*, 2016 : Biology and Evolution of arbuscular mycorrhizal fungi in the light of genomics**



## Tansley insight

# Biology and evolution of arbuscular mycorrhizal symbiosis in the light of genomics

Authors for correspondence:

Christophe Roux

Tel: +33 534323804

Email: roux@lrsv.ups-tlse.fr

Jean-Michel Ané

Tel: +1 6082626457

Email: jeanmichel.ane@wisc.edu

Received: 1 June 2016

Accepted: 27 July 2016

**Laurent Kamel<sup>1,2\*</sup>, Michelle Keller-Pearson<sup>3,4\*</sup>, Christophe Roux<sup>1</sup> and Jean-Michel Ané<sup>3,5</sup>**

<sup>1</sup>Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, Université de Toulouse, UPS, CNRS 24 Chemin de Borde Rouge-Auzeville, BP 42617, 31326 Castanet-Tolosan, France; <sup>2</sup>Agronutrition SA, rue Pierre et Marie Curie Immeuble Biostep, 31670 Labège, France;

<sup>3</sup>Department of Bacteriology, University of Wisconsin – Madison, Madison, WI 53706, USA; <sup>4</sup>Department of Plant Pathology, University of Wisconsin – Madison, Madison, WI 53706, USA; <sup>5</sup>Department of Agronomy, University of Wisconsin – Madison, Madison, WI 53706, USA

## Contents

Summary	1	V. Evolution of mycorrhizal associations revealed by comparative genomics	4
I. Introduction	1	Acknowledgements	5
II. Genomics of arbuscular mycorrhizal fungi	2	References	5
III. Genomic insights into the obligate nature of arbuscular mycorrhizal fungi	2		
IV. Interdisciplinary approaches to unravel the host–symbiont interactome	4		

## Summary

Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi associate with the vast majority of land plants, providing mutual nutritional benefits and protecting hosts against biotic and abiotic stresses. Significant progress was made recently in our understanding of the genomic organization, the obligate requirements, and the sexual nature of these fungi through the release and subsequent mining of genome sequences. Genomic and genetic approaches also improved our understanding of the signal repertoire used by AM fungi and their plant hosts to recognize each other for the initiation and maintenance of this association. Evolutionary and bioinformatic analyses of host and nonhost plant genomes represent novel ways with which to decipher host mechanisms controlling these associations and shed light on the stepwise acquisition of this genetic toolkit during plant evolution. Mining fungal and plant genomes along with evolutionary and genetic approaches will improve understanding of these symbiotic associations and, in the long term, their usefulness in agricultural settings.

*New Phytologist* (2016)

doi: 10.1111/nph.14263

**Key words:** arbuscular mycorrhiza (AM), bioinformatics, evolution, genomics, host plants.

## I. Introduction

Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi form symbiotic associations with representatives from most families of land plants, including early-diverging lineages such as liverworts and hornworts (Bonfante & Genre, 2008; Wang *et al.*, 2010). This symbiosis

facilitates water and nutrient uptake in host plants, protecting them against various biotic and abiotic stresses. The emergence of AM fungi and land plants strikingly coincided at nearly 450 million yr ago (Taylor *et al.*, 1995), with the earliest known fossils dated to 407 million yr ago (Strullu-Derrien *et al.*, 2014), suggesting that associations with fungi probably facilitated land colonization and true root development (Selosse *et al.*, 2015). This ancient association arose in Pangaea and is now present on all continents.

\*These authors contributed equally to this work.

Notably, plants can survive and even grow in the absence of AM fungi, but AM fungi are obligate symbionts. This feature, called 'obligate biotrophy', is ancient; all extant AM fungi share this feature, and it probably shaped their evolution. Mycorrhizal colonization of plants follows a well-defined sequence of events: germination of fungal spores, hyphal branching in the vicinity of a host root that facilitates recognition, hyphal attachment to root surfaces and hyphopodium differentiation, penetration and spread of the fungus in plant roots guided by a prepenetration apparatus (Genre *et al.*, 2005), and development of highly ramified arbuscules within reprogrammed root cortical cells that allow efficient exchange of nutrients between symbionts (Gutjahr & Parniske, 2013). These steps occur after a coordinated molecular dialog between AM fungi and host plants. Several host signals, as well as perception mechanisms, are well characterized at the molecular level thanks to studies employing combinations of genetic and biochemical approaches (Oldroyd, 2013). Less is known about the fungal partner. Recent advances in AM fungal genomics provide new opportunities to discover genes, proteins, and regulatory elements involved in a range of key activities either in the symbiotic establishment (i.e. signaling and nutrient exchange between the AM fungus and the plant host) or in fungal development (i.e. reproduction of AM fungi). New evidence adds credence to the highly debated potential for sexual reproduction in AM fungi. Access to AM genomes also enables deeper evaluation of transcriptomic data from plants associated or not with AM fungi such that clearer distinctions can be drawn between species origins for identified sequences.

## II. Genomics of arbuscular mycorrhizal fungi

The announcement of the genome-sequencing program for the model AM fungus in 2004 posed a real challenge (Martin *et al.*, 2004). First, genomes of AM fungi are among the largest in fungi, ranging from 150 Mb to over 1 Gb depending on the species (Hosny *et al.*, 1998). Second, producing enough tissue to study presents a challenge as they require co-cultivation with a host plant. *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198 was therefore chosen because of its relatively small genome size (153 Mb) (Sędziewska *et al.*, 2011) and the possibility to propagate it efficiently with *in vitro* root organ cultures. Because their spores are asexual structures filled with hundreds to thousands of nuclei and because the nuclei within a single spore were thought to be extremely diverse, AM fungi were anticipated to be very difficult to sequence from spores (Bécard & Pfeffer, 1993; Kuhn *et al.*, 2001). Such heterokaryotic organization would limit shotgun sequencing strategies, as it impairs assembly procedures. Taking advantage of the development of next-generation sequencing technologies, two independent studies published genomic sequences for *R. irregularis* DAOM 197198 (Tisserant *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014). The genome was estimated to be 153 Mb with a high frequency of transposable elements (36% of the genome). Thus, 60 and 92% of the deduced genome, respectively, is covered by the two assemblies (genome assembly length: 91.08 Mb, Tisserant *et al.*, 2013; 141 Mb, Lin *et al.*, 2014). Gene expansion was observed in several gene families

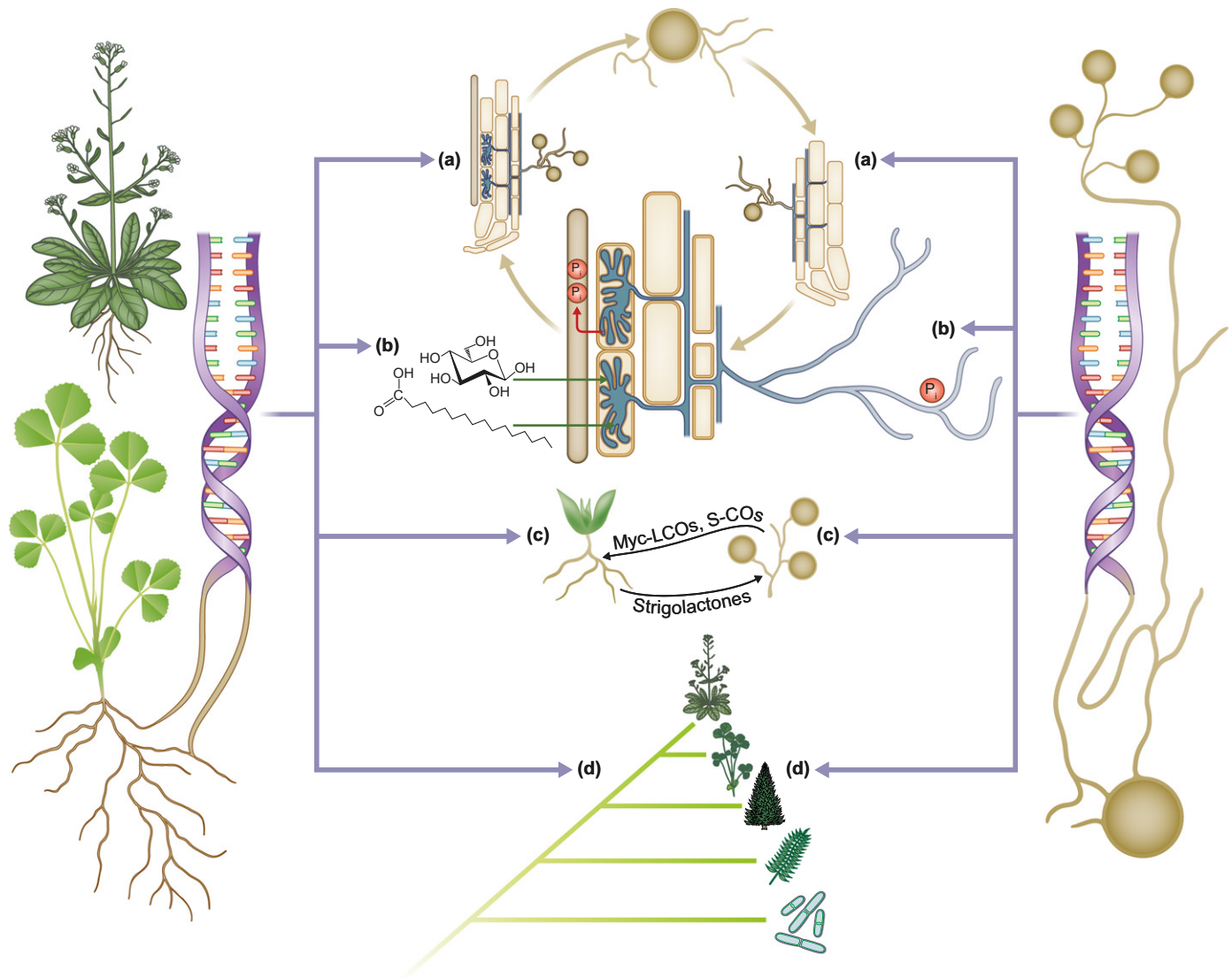
such as kinases and mating-related genes, whereas, in both assemblies, other genes were strikingly absent, such as glycoside hydrolases, which could damage plant cell walls. By sequencing individual nuclei, Lin *et al.* (2014) showed that ribosomal regions are highly variable within each nucleus. Moreover, the rate of single nucleotide polymorphisms (SNPs) found in *R. irregularis* was similar to that of other genomes of mycorrhizal fungi. The analysis of genomic sequences from different strains of *R. irregularis* recently confirmed the low rate of SNPs (Ropars *et al.*, 2016). A similar result was also found for the gene repertoire of another AM species, *Gigaspora rosea* (Tang *et al.*, 2016). Global analyses of the coding gene repertoires obtained at this time indicate that AM fungi exhibit features of classical genome organization, that is, one genome per strain.

The recent publication of genomic data for strains of *R. irregularis* (Ropars *et al.*, 2016) and gene repertoires of additional AM species (*Rhizophagus clarus* (Sędziewska Toro & Brachmann, 2016), *Gigaspora margarita* (Salvioli *et al.*, 2016), and *Gigaspora rosea* (Tang *et al.*, 2016)) heralds a new era in the investigation of AM fungi. These gene repertoires will enable deeper investigations of fungal biology through RNAseq analyses, for instance.

These genomic advances also drastically changed our views on the (lack of) sexuality of AM fungi. In the absence of an observed sexual cycle at the cellular and morphological levels, AM fungi were thought to be asexual. Recent studies revealed that genes involved in meiosis and sexuality are present in several AM fungi, suggesting a cryptic sexual cycle (Riley & Corradi, 2013; Riley *et al.*, 2014). The comparison of genomic sequences from strains of *R. irregularis* revealed differential allele distributions consistent with the probable existence of homokaryotic and dikaryotic strains (Ropars *et al.*, 2016). This work also revealed the presence of a locus very similar to mating-type (MAT) loci found in heterothallic bipolar Basidiomycetes (Ropars *et al.*, 2016). Interestingly, this locus seems to be the only protein-coding locus shown to differ between dikaryons. Allele occurrence within this putative MAT locus is consistent with the hypothesis that the dikaryotic strains originated from plasmogamy between two monokaryotic ones (Ropars *et al.*, 2016). These results strongly suggest that AM fungi have a functional sexual cycle. However, further studies are needed to evaluate the full extent of mating types, to understand the molecular function of this putative MAT locus and, most of all, to show whether homokaryotic AM parental strains can be crossed in experimental conditions to form a heterokaryotic strain and later homokaryotic progeny (Fig. 1). A better understanding of the entire lifecycle of AM fungi would facilitate the genetic development of improved fungal strains for agricultural applications.

## III. Genomic insights into the obligate nature of arbuscular mycorrhizal fungi

Because AM fungi are obligate symbionts, genes involved in hijacking the host metabolism are critical for the stability of these associations. AM fungi obtain carbohydrates derived from hosts' photosynthesis in exchange for nutrients such as phosphorous and nitrogen (Pfeffer *et al.*, 1999; Bago *et al.*, 2003). Until recently, it



**Fig. 1** Genomic approaches shed light on the fungal and host mechanisms controlling arbuscular mycorrhizal (AM) associations. (a) Lifecycle. Recent genomic data have revealed potential homokaryotic and dikaryotic strains of *Rhizophagus irregularis*, as well as a putative mating locus and mating types. At this time, it is unknown whether plasmogamy/karyogamy events occur. (b) Obligate requirements. The absence of essential metabolic pathways and proteins (e.g. fatty acid synthase) in AM fungi has led to new hypotheses being proposed for the origins of fatty acids in these oleogenic fungi. (c) Host–symbiont interactome. In response to plant signals, AM fungi produce lipochitooligosaccharides and short chitooligosaccharides. Our understanding of signal perception in both partners continues to progress. New techniques such as host-induced gene silencing enable the validation of fungal candidate genes. (d) Evolution of AM associations. Acquisition of the ‘host symbiotic toolkit’ occurred in a stepwise manner starting with nonmycorrhizal Charophyte algae. The correlation between the loss of symbiosis and the loss of essential genes from this toolkit drove innovative genome mining approaches to identify plant genes following the same evolutionary pattern and requirement for AM associations. AM fungal genome comparisons will enable identification of a ‘fungal symbiotic toolkit’ and its conservation among Glomeromycota.

was thought that AM fungi used this carbon source to synthesize lipids for their vast mycelial networks (Trépanier *et al.*, 2005), but analysis of the *R. irregularis* genome revealed the absence of fatty acid synthase (FAS; Wewer *et al.*, 2014). FASs are also absent in other AM fungal genomes such as those of *G. margarita* and *G. rosea* (Salvioli *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2016) as well as in five *R. irregularis* strains (Ropars *et al.*, 2016). This observation raises the question of the origin of palmitic acid (C16) in these oleogenic fungi. Lipid droplets released after the collapse of old arbuscules are apparently recaptured by the hyphae (Kobae *et al.*, 2014). Autophagy-like mechanisms could, therefore, facilitate lipid

recycling from the host–fungus interface. The lack of FAS in fungi was already reported in the case of a fungal pathogen (*Malassezia globosa*) that acquires its fatty acids from the host via secreted lipases (Xu *et al.*, 2007). Intriguingly, 36 putative secreted lipases are found in the *R. irregularis* genome. Mining of host and nonhost genomes revealed several nonspecific lipid transfer proteins to be potentially involved in AM associations (Delaux *et al.*, 2014). These proteins could play a role in the transfer of lipids from host to fungi. Future investigations will probably elucidate how the loss of FAS may be an adaptive strategy of AM fungi for obligate symbiosis (Fig. 1).

#### IV. Interdisciplinary approaches to unravel the host–symbiont interactome

Mutual recognition between plants and AM fungi is essential for the initiation and probably the maintenance of symbiotic associations. AM fungi recognize several signals exuded by plant roots into the rhizosphere. In low-nutrient soils or drought conditions, plant roots secrete strigolactones (Ruyter-Spira *et al.*, 2013; Lopez-Obando *et al.*, 2015), which activate hyphal growth and branching (Akiyama *et al.*, 2005; Bessener *et al.*, 2006). Other stimulatory compounds have also been described: a higher concentration of carbon dioxide promotes hyphal growth, and flavonoids increase spore germination for several AM fungal species, although they seem dispensable in later steps of the interaction (Bécard *et al.*, 1992, 1995; Larose *et al.*, 2002; Scervino *et al.*, 2007). Hydroxy fatty acids provoke the branching of hyphae emerging from germinating spores (Nagahashi & Douds, 2011). It was proposed that cutin monomers released from the root surface induce the formation of fungal penetration structures, hyphopodia (Wang *et al.*, 2012). The mechanisms allowing AM fungi to perceive these signals are still unknown, but the availability of genome sequences and comparative genomic approaches will accelerate mechanistic discoveries.

In response to some of these plant signals, AM fungi produce chitin-derived signals collectively referred to as Myc (Mycorrhizal) factors. These factors include short chitoooligosaccharides (S-COs) and Myc-lipochoooligosaccharides (Myc-LCOs) decorated with various fatty acids and substitutions (Maillet *et al.*, 2011; Genre *et al.*, 2013). Given that decorated LCOs are probably derived from S-COs, it is tempting to speculate that AM fungi may also produce decorated S-COs. Comparisons of plant responses to S-CO and Myc-LCO signals reveal differences between rice (*Oryza sativa*) and legumes as well as among root types and cell types. For example, S-COs and Myc-LCOs induced typical oscillations of the nuclear and perinuclear calcium concentration, called ‘calcium spiking’, in legume atrichoblasts, but only S-COs induced this response in rice atrichoblasts (Sun *et al.*, 2015). Also, this study revealed that a combination of S-COs and Myc-LCOs, present in AM fungal exudates, triggered responses different from those triggered by individual signals. In rice, S-COs trigger calcium spiking in atrichoblasts and only a combination of both S-COs and Myc-LCOs leads to calcium spiking in root hairs (trichoblasts). However both S-COs and LCOs alone are able to stimulate root development. The observation of a synergy between signals limits the relevance of previous studies investigating host responses to individual signals and indicates that cell responses to a combination of S-COs/Myc-LCOs could differ according to plant species or clade. It also highlights the need to quantify S-CO and Myc-LCO repertoires in the presence of different hosts and possibly at different stages of the symbiotic association.

Since the first description of a small secreted peptidic effector in *R. irregularis* (SP7; Klopplolz *et al.*, 2011), several studies have analyzed the secretomes of various AM fungi. The number of secreted proteins from *R. irregularis* ranges from 300 to 600 candidates (Tisserant *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014). The recent publication of secreted protein repertoires for *R. clarus*

(Sędziewska Toro & Brachmann, 2016), *G. margarita* (Salvioli *et al.*, 2016), and *G. rosea* (Tang *et al.*, 2016) revealed that secreted proteins are mostly lineage specific. It is now necessary to investigate the expression of these secreted proteins in various host plants to determine if some of these secreted proteins are host specific and possibly involved in controlling host fitness. It will also be important to determine their expression pattern at different stages of the symbiotic interaction (Fig. 1).

#### V. Evolution of mycorrhizal associations revealed by comparative genomics

Host mechanisms allowing the establishment of AM symbioses, sometimes referred to as the ‘symbiotic toolkit’ (Delaux *et al.*, 2013), were initially found in model legumes through forward genetic screens for symbiotic associations, via protein interactions, and reverse genetics (Ané *et al.*, 2004; Kevei *et al.*, 2007; Horváth *et al.*, 2011), and have now also been discovered in other hosts such as tomato (*Solanum lycopersicum*) and rice (Larkan *et al.*, 2013; Gutjahr *et al.*, 2015). Evolutionary studies of these host genes across land plants and in their algal relatives suggest that they were acquired through the classical potentiation–actualization–refinement sequence (Blount *et al.*, 2012; Delaux *et al.*, 2014, 2015; Favre *et al.*, 2014). The functional conservation of these genes from legumes to hornworts and even liverworts was demonstrated through rescue assays of the corresponding legume mutants and protein interactions (Wang *et al.*, 2010).

Some proteins of the host ‘symbiotic toolkit’ are absent in many lineages that have lost symbiotic abilities, such as Brassicaceae, some Caryophyllales, and many gymnosperms (Delaux *et al.*, 2015; Bravo *et al.*, 2016). Several hypotheses have been proposed to explain the loss of apparently beneficial AM associations in these lineages. Clade-specific innovations such as antifungal metabolites, thick cell walls, or extremely fine roots with a limited cortex may have made some plants incompatible with AM fungi. Colonized plants might have had reduced fitness as a result of carbon costs of AM colonization or vulnerabilities inherent in symbiotic signaling pathways. Consistent with this latest hypothesis, the loss of *Reduced Arbuscular Mycorrhization2* (*RAM2*) in *Medicago truncatula* resulted in the loss of AM associations but conferred resistance to oomycete pathogens (Wang *et al.*, 2012; Gobbato *et al.*, 2013). It will be interesting to determine whether nonmycorrhizal lineages are more resistant to oomycetes, particularly lineages that lost AM associations fairly recently, such as lupines. The repeated loss of the same set of genes in independent lineages prompted several groups to look for more host genes following the same evolutionary pattern and potentially involved in AM associations (Delaux *et al.*, 2014; Favre *et al.*, 2014; Bravo *et al.*, 2016). Functional validation of some of these candidates clearly demonstrated that this evolution-based bioinformatics mining of genomes and transcriptomes is an extremely powerful approach to identify genes involved in specific biological processes and, in particular, in symbiotic associations.

Interestingly, these symbiotic pathways are not lost in all nonhost lineages. For instance, Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase (CCaMK) and Interacting Protein of DMI3

(IPD3)/CYCLOPS are found in nonhost bryophytes (Wang *et al.*, 2010; Favre *et al.*, 2014; Delaux *et al.*, 2015). Even more surprising is the conservation of host mechanisms in Charophyte green algae that are not known to associate with mycorrhizal fungi but are the closest algal relatives to land plants (Leliaert *et al.*, 2012; Delaux *et al.*, 2015). Conservation of these genes in nonmycorrhizal lineages raises questions about other unknown roles that these symbiotic pathways may play and whether unidentified symbiotic interactions occur in these lineages. Interactions between these early diverging lineages and microbes are very much unexplored. In recent years, elegant ecological and physiological studies have revealed endosymbiotic associations between liverworts, hornworts, and lycopods with Mucoromycotina fungi which are closely related to Glomeromycota (Bidartondo *et al.*, 2011; Favre *et al.*, 2014; Field *et al.*, 2014). Given the strong similarities between these fungal associations, it seems likely that associations with Mucoromycotina fungi may rely on the same host mechanisms as those with Glomeromycota in early diverging lineages.

We believe that significant progress will be made through the development and use of genetic model systems in the early diverging host and nonhost lineages (Fig. 1). Powerful genetic tools are available already in *Physcomitrella patens* (moss) and *Marchantia* (liverwort) (Zimmer *et al.*, 2013; Hiss *et al.*, 2014). Use of these and the Charophyte green alga *Penium margaritaceum* as research models will lead to greater understanding of the host mechanisms that gave rise to efficient AM symbioses (Sørensen *et al.*, 2014).

## Acknowledgements

C.R. and J.-M.A. planned and designed the review. L.K., M.K.-P., C.R. and J.-M.A. wrote the manuscript. This work was supported by USDA-AFRI grant #2015-67013-22899 to J.-M.A. and by an NSF GRFP fellowship awarded to M.K.-P. L.K. received funding from Agronutrition SA (Labège, France). LRSV is part of the TULIP 'Laboratoire d'Excellence' (ANR-10-LABX-41). The authors are grateful to the three anonymous reviewers for constructive comments on the manuscript.

## References

- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435: 824–827.
- Ané J-M, Kiss GB, Riely BK, Penmetts RV, Oldroyd GED, Ayax C, Lévy J, Debelle F, Baek J-M, Kaló P *et al.* 2004. *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* 303: 1364–1367.
- 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.
- Bécard G, Douds DD, Pfeffer PE. 1992. Extensive *in vitro* hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO<sub>2</sub> and flavonols extensive *in vitro* hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO<sub>2</sub> and flavonols. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 821–825.
- Bécard G, Pfeffer PE. 1993. Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during *in vitro* development. *Protoplasma* 174: 62–68.
- Bécard G, Taylor LP, Douds DD, Pfeffer PE, Doner LW. 1995. Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 252–258.
- 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. *PLoS Biology* 4: e226.
- Bidartondo MI, Read DJ, Trappe JM, Merckx V, Ligrone R, Duckett JG. 2011. The dawn of symbiosis between plants and fungi. *Biology Letters* 7: 574–577.
- Blount ZD, Barrick JE, Davidson CJ, Lenski RE. 2012. Genomic analysis of a key innovation in an experimental *Escherichia coli* population. *Nature* 489: 513–518.
- Bonfante P, Genre A. 2008. Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. *Trends in Plant Science* 13: 492–498.
- Bravo A, York T, Pumphin N, Mueller LA, Harrison MJ. 2016. Genes conserved for arbuscular mycorrhizal symbiosis identified through phylogenomics. *Nature Plants* 2: 15208.
- Delaux P-M, Radhakrishnan GV, Jayaraman D, Cheema J, Malbreil M, Volkening JD, Sekimoto H, Nishiyama T, Melkonian M, Pokorny L *et al.* 2015. Algal ancestor of land plants was preadapted for symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 112: 13390–13395.
- Delaux P-M, Séjalon-Delmas N, Bécard G, Ané J-M. 2013. Evolution of the plant-microbe symbiotic 'toolkit'. *Trends in Plant Science* 18: 298–304.
- Delaux P-M, Varala K, Edger PP, Coruzzi GM, Pires JC, Ané J-M. 2014. Comparative phylogenomics uncovers the impact of symbiotic associations on host genome evolution. *PLoS Genetics* 10: e1004487.
- Favre P, Bapaume L, Bossolini E, Delorenzi M, Falquet L, Reinhardt D. 2014. A novel bioinformatics pipeline to discover genes related to arbuscular mycorrhizal symbiosis based on their evolutionary conservation pattern among higher plants. *BMC Plant Biology* 14: 333.
- Field KJ, Rimington WR, Bidartondo MI, Allinson KE, Beerling DJ, Cameron DD, Duckett JG, Leake JR, Pressel S. 2014. First evidence of mutualism between ancient plant lineages (Haplomitriopsida liverworts) and Mucoromycotina fungi and its response to simulated Palaeozoic changes in atmospheric CO<sub>2</sub>. *New Phytologist* 205: 743–756.
- Genre A, Chabaud M, Balzergue C, Puech-Pagès V, Novero M, Rey T, Fournier J, Rochange S, Bécard G, Bonfante P *et al.* 2013. Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca<sup>2+</sup> spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytologist* 198: 190–202.
- 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. *Plant Cell* 17: 3489–3499.
- Gobbato E, Wang E, Higgins G, Bano SA, Henry C, Schultze M, Oldroyd GED. 2013. RAM1 and RAM2 function and expression during arbuscular mycorrhizal symbiosis and *Aphanomyces euteiches* colonization. *Plant Signaling & Behavior* 8: 1–5.
- Gutjahr C, Gobbato E, Choi J, Riemann M, Johnston MG, Summers W, Carbonnel S, Mansfield C, Yang S-Y, Nadal M *et al.* 2015. Rice perception of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi requires the karrikin receptor complex. *Science* 350: 1521–1524.
- Gutjahr C, Parniske M. 2013. Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 29: 593–617.
- Hiss M, Laule O, Meskauskiene RM, Arif MA, Decker EL, Erxleben A, Frank W, Hanke ST, Lang D, Martin A *et al.* 2014. Large-scale gene expression profiling data for the model moss *Physcomitrella patens* aid understanding of developmental progression, culture and stress conditions. *Plant Journal* 79: 530–539.
- Horváth B, Yeun LH, Domanos Á, Halász G, Gobbato E, Ayaydin F, Miró K, Hirsch S, Sun J, Tadege M *et al.* 2011. *Medicago truncatula* IPD3 is a member of the common symbiotic signaling pathway required for rhizobial and mycorrhizal symbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 1345–1358.
- Hosny M, Gianinazzi-Pearson V, Dulieu H. 1998. Nuclear DNA content of 11 fungal species in Glomales. *Genome* 41: 422–428.
- Kevei Z, Loungnon G, Mergaert P, Horváth B, Kereszt A, Jayaraman D, Zaman N, Marcel F, Regulski K, Kiss GB *et al.* 2007. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase1 interacts with NOR1 and is crucial for nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 19: 3974–3989.
- Kloppholz S, Kuhn H, Requena N. 2011. A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Current Biology* 21: 1204–1209.



- Kobae Y, Gutjahr C, Paszkowski U, Kojima T, Fujiwara T, Hata S. 2014. Lipid droplets of arbuscular mycorrhizal fungi emerge in concert with arbuscule collapse. *Plant & Cell Physiology* 55: 1945–1953.
- Kuhn G, Hijri M, Sanders IR. 2001. Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 414: 745–748.
- Larkan NJ, Ruzicka DR, Edmonds-Tibbett T, Durkin JMH, Jackson LE, Smith FA, Schachtman DP, Smith SE, Barker SJ. 2013. The reduced mycorrhizal colonisation (*rnc*) mutation of tomato disrupts five gene sequences including the CYCLOPS/IPD3 homologue. *Mycorrhiza* 23: 573–584.
- Larose G, Chenevert R, Moutoglis P, Gagne S, Piche Y, Vierheilig H, Chenevert R, Moutoglis P, Gagné S, Piché Y *et al.* 2002. Flavonoid levels in roots of *Medicago sativa* are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Plant Physiology* 159: 1329–1339.
- Leliaert F, Smith DR, Moreau H, Herron MD, Verbruggen H, Delwiche CF, De Clerck O. 2012. Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Critical Reviews in Plant Sciences* 31: 1–46.
- Lin K, Limpens E, Zhang Z, Ivanov S, Saunders DGO, Mu D, Pang E, Cao H, Cha H, Lin T *et al.* 2014. Single nucleus genome sequencing reveals high similarity among nuclei of an endomycorrhizal fungus. *PLoS Genetics* 10: e1004078.
- Lopez-Obando M, Ligerot Y, Bonhomme S, Boyer F-D, Rameau C. 2015. Strigolactone biosynthesis and signaling in plant development. *Development* 142: 3615–3619.
- Maillet F, Poinot V, André O, Puech-Pagès V, Haouy A, Gueunier M, Cromer L, Giraudet D, Formey D, Niebel A *et al.* 2011. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469: 58–63.
- Martin FM, Tuskan GA, DiFazio SP, Lammers P, Newcombe G, Podila GK. 2004. Symbiotic sequencing for the *Populus* mesocosm. *New Phytologist* 161: 330–335.
- Nagahashi G, Douds DD. 2011. The effects of hydroxy fatty acids on the hyphal branching of germinated spores of AM fungi. *Fungal Biology* 115: 351–358.
- Oldroyd GED. 2013. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology* 11: 252–263.
- Pfeffer PE, Douds DD Jr, Bécard G, Shachar-Hill Y. 1999. Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology* 120: 587–598.
- Riley R, Charron P, Idnurm A, Farinelli L, Dalpé Y, Martin FM, Corradi N. 2014. Extreme diversification of the mating type-high-mobility group (MATA-HMG) gene family in a plant-associated arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* 201: 254–268.
- Riley R, Corradi N. 2013. Searching for clues of sexual reproduction in the genomes of arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Ecology* 6: 44–49.
- Ropars J, Toro KS, Noel J, Pelin A, Charron P, Farinelli L, Marton T, Krüger M, Fuchs J, Brachmann A *et al.* 2016. Evidence for the sexual origin of heterokaryosis in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature Microbiology* 1: 16033.
- Ruyter-Spira C, Al-Babili S, van der Krol S, Bouwmeester HJ. 2013. The biology of strigolactones. *Trends in Plant Science* 18: 72–83.
- Salvioli A, Ghignone S, Novero M, Navazio L, Venice F, Bagnaresi P, Bonfante P. 2016. Symbiosis with an endobacterium increases the fitness of a mycorrhizal fungus, raising its bioenergetic potential. *ISME Journal* 10: 130–144.
- Scervino JM, Ponce MA, Erra-Bassells R, Bompadre J, Vierheilig H, Ocampo JA, Godeas A. 2007. The effect of flavones and flavonols on colonization of tomato plants by arbuscular mycorrhizal fungi of the genera *Gigaspora* and *Glomus*. *Canadian Journal of Microbiology* 53: 702–709.
- Sędziewska KA, Fuchs J, Temsch EM, Baronian K, Watzke R, Kunze G. 2011. Estimation of the *Glomus intraradices* nuclear DNA content. *New Phytologist* 192: 794–797.
- Sędziewska Toro K, Brachmann A. 2016. The effector candidate repertoire of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus*. *BMC Genomics* 17: 101.
- Selosse M-A, Strullu-Derrien C, Martin FM, Kamoun S, Kenrick P. 2015. Plants, fungi and oomycetes: a 400-million year affair that shapes the biosphere. *New Phytologist* 206: 501–506.
- Sørensen I, Fei Z, Andreas A, Willats WGT, Domozych DS, Rose JKC. 2014. Stable transformation and reverse genetic analysis of *Penium margaritaceum*: a platform for studies of charophyte green algae, the immediate ancestors of land plants. *Plant Journal* 77: 339–351.
- Strullu-Derrien C, Kenrick P, Pressel S, Duckett JG, Rioult JP, Strullu DG. 2014. Fungal associations in Horneophyton ligneri from the Rhynie Chert (c. 407 million year old) closely resemble those in extant lower land plants: novel insights into ancestral plant-fungus symbioses. *New Phytologist* 203: 964–979.
- Sun J, Miller JB, Granqvist E, Wiley-Kalil A, Gobbato E, Maillet F, Cottaz S, Samain E, Venkateshwaran M, Fort S *et al.* 2015. Activation of symbiosis signaling by arbuscular mycorrhizal fungi in legumes and rice. *Plant Cell* 27: 823–838.
- Tang N, San Clemente H, Roy S, Bécard G, Zhao B, Roux C. 2016. A survey of the gene repertoire of *Gigaspora rosea* unravels conserved features among Glomeromycota for obligate biotrophy. *Frontiers in Microbiology* 7: 233.
- Taylor TN, Remy W, Hass H, Kerp H. 1995. Fossil arbuscular mycorrhizae from the early Devonian. *Mycologia* 87: 560–573.
- Tisserant E, Malbreil M, Kuo A, Kohler A, Symeonidi A, Balestrini R, Charron P, Duensing N, Frei dit Frey N, Gianinazzi-Pearson V *et al.* 2013. Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 110: 20117–20122.
- Trépanier M, Bécard G, Moutoglis P, Willemot C, Gagné S, Avis TJ, Rioux J, Tre M, Be G, Gagne S. 2005. Dependence of arbuscular-mycorrhizal fungi on their plant host for palmitic acid synthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5341–5347.
- Wang B, Yeun LH, Xue JY, Liu Y, Ané J-M, Qiu YL. 2010. Presence of three mycorrhizal genes in the common ancestor of land plants suggests a key role of mycorrhizas in the colonization of land by plants. *New Phytologist* 186: 514–525.
- Wang E, Schornack S, Marsh JFF, Gobbato E, Schwessinger B, Eastmond P, Schultze M, Kamoun S, Oldroyd GED. 2012. A common signaling process that promotes mycorrhizal and oomycete colonization of plants. *Current Biology* 22: 1–5.
- 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*. *Plant Journal* 79: 398–412.
- Xu J, Saunders CW, Hu P, Grant RA, Boekhout T, Kuramae EE, Kronstad JW, Deangelis YM, Reeder NL, Johnstone KR *et al.* 2007. Dandruff-associated *Malassezia* genomes reveal convergent and divergent virulence traits shared with plant and human fungal pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 104: 18730–18735.
- Zimmer AD, Lang D, Buchta K, Rombauts S, Nishiyama T, Hasebe M, Van de Peer Y, Rensing SA, Reski R. 2013. Reannotation and extended community resources for the genome of the non-seed plant *Physcomitrella patens* provide insights into the evolution of plant gene structures and functions. *BMC Genomics* 14: 498.

## **Title : Characterization of *Rhizophagus irregularis* secreted proteins - Screening of their effect on the establishment of endomycorrhizal symbiosis**

---

### **Abstract**

Arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis is a mutualistic association established between plant roots and soil fungi belonging to the phylum Glomeromycota. In this association, the fungus acts as a natural fertilizer, supplying the plant with various minerals (phosphorus, but also nitrogen and sulfur) in exchange to carbon sources essential for its development. An original feature of these fungi is their very broad host spectrum: c.a. 80% of plant species have the ability to form this symbiosis, and some species of AM fungi do not seem to have a restrictive host spectrum. Would MA fungi possess "universal keys" for cell compatibility with their host, or to by-pass plant immunity?

To address this problem, we studied the secretome of the AM fungus *Rhizophagus irregularis* from which several genomic data were available. Eukaryotic microorganisms indeed secrete in their environment proteins acting on their exogenous structures (cell wall), on their environment (nutrient recruitment), and even on host plant cell immunity. These last secreted proteins (SPs) are defined as effectors. Based on two different assemblies, a repertoire of 872 SPs of *R. irregularis* was defined for which transcriptional expression profiles obtained in three hosts were compared, as well with SPs from another species of AM fungus, *Gigaspora rosea*. After adding sequences of small size identified from an in-house transcriptomic assembly, screening unambiguous open reading frame, and selecting strongly expressed candidates (FC > 10) in the 3 plant hosts analyzed, a set of 33 RiSPs of interest was defined, of which 18 were selected for functional analysis.

As genetic transformation protocol is unavailable for AM fungi, RiSP:citrine fusion proteins were overexpressed in tobacco leaves and barrel medic roots for plant cell localization. Different cell compartments were targeted by these RiSPs, and often localised in the vacuolar compartment. *In planta* overexpression of several candidates allowed identifying 3 RiSPs that stimulate the establishment of the symbiosis. In the same time, attempts to enhance MA symbiosis by addition of exogenous RiSPs on seedlings during mycorrhizal establishment were initiated. Such assays should be pursued on the 3 active candidates revealed by overexpression assays. Evaluating the specificity of action of these RiSPs on AM symbiosis compared to other plant-fungus interactions will open the way to field trials.

### **Key words :**

Symbiosis ; Mycorrhizae ; Glomeromycota ; *Rhizophagus irregularis* ; Comparative transcriptomic ; Secretome ; Effectors ; Synthetic peptides ; Heterologous expression ; Cytolocalization

Laurent KAMEL

Thèse dirigée par le Pr. Christophe ROUX  
Correspondant scientifique pour l'entreprise Agronutrition : Dr. Sébastien ROY  
Thèse soutenue le Jeudi 9 Mars 2017, LRSV, Castanet-Tolosan

**Titre : Caractérisation de protéines sécrétées du champignon *Rhizophagus irregularis* -  
Criblage de leur effet sur l'établissement de la symbiose endomycorhizienne**

---

**Résumé**

La symbiose mycorhizienne à arbuscule (MA) est une association mutualiste s'établissant entre les racines des plantes et des champignons du sol appartenant à l'embranchement des Glomérormycètes. Dans cette association, le champignon agit comme un fertilisant naturel, fournissant à la plante divers minéraux (phosphore, mais aussi azote et soufre ...) en échange de sources de carbone indispensables à son développement. Une caractéristique originale de ces champignons est leur très large spectre d'hôte : de l'ordre de 80% des espèces végétales ont l'aptitude à former cette symbiose, et certains espèces de champignons MA ne semblent pas avoir de limitation de spectre d'hôte. Les champignons MA possèderaient-ils des « clés universelles » de compatibilité cellulaire avec leur hôte, ou de contournement de l'immunité végétale ?

Pour aborder cette problématique, nous avons entrepris l'étude du sécrétome du champignon MA *Rhizophagus irregularis* dont plusieurs données génomiques étaient disponibles. Les microorganismes eucaryotes sécrètent en effet dans leur environnement des protéines agissant sur leurs structures exogènes (paroi cellulaire), leur environnement, et pouvant agir sur l'immunité des cellules hôtes. Ces protéines sécrétées (SPs) sont dans ce dernier cas appelées « effecteurs ». Sur la base de deux assemblages différents, un catalogue de 872 SPs de *R. irregularis* (RiSPs) a été défini pour lesquelles les profils d'expression dans trois plantes hôtes ont été comparés. Nous avons également comparé ces SPs à celles que nous avons définies sur une autre espèce de champignon MA, *Gigaspora rosea*. Après enrichissement du catalogue de RiSPs avec des séquences de petite taille identifiées sur un assemblage transcriptomique propre, puis sélection des candidats dont les cadres de lecture sont robustes et présentant un niveau d'expression élevé ( $FC > 10$ ) dans les 3 hôtes testés, un jeu de 33 RiSPs d'intérêt a été défini, dont 18 ont été sélectionnées pour effectuer des analyses fonctionnelles.

En absence de protocole de transformation de ces champignons, l'analyse fonctionnelle a porté sur la cytolocalisation de protéines de fusion RiSP:citrine dans les cellules végétales par surexpression dans des feuilles de tabac et des racines de luzerne tronquée. Différents compartiments cellulaires sont ciblés par ces RiSPs, très souvent le compartiment vacuolaire. Des approches par surexpression *in planta* de plusieurs candidats RiSP ont permis d'identifier une activité stimulatrice de 3 RiSPs sur l'établissement de la symbiose. Parallèlement, des essais de stimulation de la symbiose MA par apport exogène de différents SPs sur plantules en cours de mycorhization en chambre ont été initiés. Ils devront être poursuivis sur les 3 candidats issus du crible de surexpression.

En perspective, l'évaluation de la spécificité d'action de ces SPs sur la symbiose MA comparativement à d'autres interactions plante-champignon ouvrira la voie à des essais d'application au champ.

**Mots clés:**

Symbiose ; Mycorhize ; Glomérormycota ; *Rhizophagus irregularis* ; Transcriptomique comparative ; Sécrétome ; Effecteurs ; Peptides synthétiques ; Expression hétérologue ; Cytolocalisation