



**HAL**  
open science

# Implication des cytokinines dans la formation de l'haustorium chez la plante parasite *Phelipanche ramosa*

Estelle Billard

► **To cite this version:**

Estelle Billard. Implication des cytokinines dans la formation de l'haustorium chez la plante parasite *Phelipanche ramosa*. Biologie végétale. Université de Nantes, 2020. Français. <NNT : 2020NANT4005>. <tel-05372951>

**HAL Id: tel-05372951**

**<https://theses.hal.science/tel-05372951v1>**

Submitted on 19 Nov 2025

**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.



HAL Authorization

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

ECOLE DOCTORALE N° 600

*Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation*

Spécialité : Biologie et physiologie végétales

Par

**Estelle BILLARD**

**Implication des cytokinines dans la formation de l'haustorium  
chez la plante parasite *Phelipanche ramosa***

**Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 10 juillet 2020**

**Unité de recherche : Laboratoire de Biologie et de Pathologie Végétales**

## **Rapporteurs avant soutenance :**

Sabine CARPIN Maître de Conférences, Université d'Orléans

Nicolas PAPON Professeur, Université d'Angers

## **Composition du Jury :**

Président : Catherine RAMEAU Directrice de recherche, INRAE

Examineurs : Catherine RAMEAU Directrice de recherche, INRAE  
Stéphanie GIBOT-LECLERC Maître de Conférences, Agrosup Dijon

Dir. de thèse : Philippe SIMIER Professeur, Université de Nantes  
Grégory MONTIEL Maître de Conférences, Université de Nantes



UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

---

**ECOLE DOCTORALE**  
**ECOLOGIE, GEOSCIENCES, AGRONOMIE ET ALIMENTATION (EGAAL)**

Année 2020

**Implication des cytokinines dans la formation de l'haustorium chez la plante  
parasite *Phelipanche ramosa***

---

THESE DE DOCTORAT  
Spécialité : Biologie et physiologie végétales

Présentée  
et soutenue publiquement par

**Estelle Billard**

*le 10 juillet 2020, devant le jury ci-dessous*

Président      **Catherine RAMEAU**, Directrice de recherche, INRAE

Rapporteurs   **Sabine CARPIN**, Maître de Conférences, Université d'Orléans  
                    **Nicolas PAPON**, Professeur, Université d'Angers

Examineurs   **Catherine RAMEAU**, Directrice de recherche, INRAE  
                    **Stéphanie GIBOT-LECLERC**, Maître de Conférences, Agrosup Dijon

Directeur de Thèse  
**Philippe SIMIER**  
Co-encadrant de Thèse  
**Grégory MONTIEL**



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier la Recherche, Formation et Innovation en Pays de Loire, Objectif Végétal, pour avoir rendu possible le déroulement de cette thèse.

J'adresse de sincères remerciements aux membres du jury Madame Sabine Carpin, Madame Stéphanie Gibot-Leclerc, Madame Catherine Rameau et Monsieur Nicolas Papon pour avoir accepté de me faire bénéficier de leur expertise en évaluant les travaux de cette thèse.

Je souhaite également remercier les membres de mon comité de thèse Monsieur Fabien Nogué et Monsieur Thomas Dugé de Bernonville, pour leurs conseils et leur enthousiasme concernant ces recherches.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance envers les directeurs du Laboratoire de Biologie et Pathologie Végétales, Monsieur Philippe Simier et Monsieur Philippe Delavault, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de leur équipe et pour m'avoir accompagnée tout au long de ces années aussi bien dans mes recherches que dans mes missions d'enseignements. Je les remercie également pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer un séjour au Laboratory of Growth Regulators (Olomouc, République tchèque), ainsi que de participer à un congrès international, qui m'a permis de rencontrer et d'échanger avec la communauté de chercheurs sur les plantes parasites.

J'en profite pour remercier Monsieur Lukáš Spíchal pour son bon accueil au LGR, ses conseils, ainsi que Monsieur Karel Doležal et les membres de l'équipe qui ont participé à ce travail. Je remercie également Monsieur Arnaud Lanoué pour l'ensemble du travail fourni en collaboration.

Je souhaite remercier tout particulièrement mes deux encadrants de thèse, Philippe Simier et Grégory Montiel, pour leur disponibilité, leur patience et le temps consacré à ces recherches. Merci Philippe pour toutes les remarques pertinentes sur mon travail qui m'ont encouragées à me perfectionner. Un grand merci Grégory pour m'avoir guidée et aidée quotidiennement au cours de ces quatre années. Merci de m'avoir toujours incitée à aller plus loin dans mes réflexions en prenant du recul et surtout de m'avoir formée sur tous les aspects que peuvent embrasser les missions d'un enseignant-chercheur. Didactique, expressions ou mots croisés, j'ai plus que jamais appris à ton contact et je sors grandie de ces années.

Je remercie également Jean-Bernard Pouvreau et Lucie Poulin pour leur aide précieuse. Merci Jean-Bernard pour tes lumineuses suggestions et toute la formation biochimique dont j'ai pu bénéficier avec les machines effrayantes que tu sais si bien transformer, après décodage, en de sympathiques compagnons de l'analyse. Merci Lucie pour ton expertise en analyses statistiques, les bons tuyaux informatiques, les échanges microbio et d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions.

J'adresse aussi tout mon meilleur souvenir à l'ensemble du personnel du LBPV et du département de Biologie. Merci pour votre écoute, votre disponibilité ainsi que vos conseils aussi bien en sciences qu'en enseignement. Anne-Sophie, Delphine, merci pour votre soutien, votre bonne humeur et votre aide



essentielle pour les nombreuses tâches administratives que j'ai pu affronter en votre agréable compagnie.

Un grand merci à Sabine, Yohannes, Yolène, Céline, pour toute l'aide technique que vous m'avez apportée et qui a rendue possible la réussite de ces travaux ainsi que pour votre soutien moral. Je garde en souvenir les échanges d'inspiration Népalaise et artistiques, la compagnie en bio mol et pour certaines les « danses de la victoire » à chaque nouveau résultat. Je remercie tout particulièrement Sabine Delgrange qui a pu suivre toute l'évolution pendant ces quatre années, merci pour ton investissement et ton immense gentillesse.

Evidemment, je remercie l'ensemble des personnes avec qui j'ai partagé le bureau des doctorants-stagiaires qui sont la raison principale pour laquelle cette aventure de quatre ans a été aussi agréable. Vincent et Guillaume, mes premiers colocataires de bureau, merci pour votre accueil, les conseils et l'expérience partagée. Merci Vincent de m'avoir si bien lancée dans le monde des haustoria en me transmettant tout ton savoir et en me formant sur les différentes disciplines qui englobent ce sujet. Merci Guillaume pour m'avoir fait part de ta riche expérience concernant la thèse mais surtout sur l'après thèse et d'être toujours disponible et volontaire pour donner tes conseils avisés.

Je n'oublie pas les valeureux stagiaires Vivien, Thibault et Sarah qui ont amené beaucoup de rires, (de gaffes) et un joyeux bazar dans le bureau. Merci à Vivien et Bethsabée que j'ai apprécié encadrer, d'avoir été aussi dévoués et curieux en gardant leur bonne humeur.

Merci Alexandre d'avoir pris part à ce travail en offrant ton aide aussi souvent que possible et d'avoir fait partie des oreilles attentives. Merci également de rester toujours aussi calme face au désormais bureau de filles.

Un remerciement tout particulier à mon acolyte Sabine qui a partagé le meilleur mais surtout le plus difficile de ces années, ce qui est la compagnie la plus importante dans la vie de doctorante. Merci pour nos discussions, tes gâteaux et les fous rires. La vie trépidante du bureau peut désormais compter sur Lisa, que je remercie pour avoir contribué à rendre ma fin de thèse la plus sympathique possible. Je vous transmets tous mes encouragements pour la poursuite de vos travaux.

Un clin d'œil également aux Rochelais-Nantais et Nantais-Baulois pour leur amitié et tous les bons moments passés ensemble. Merci de m'avoir autant soutenue sans tout comprendre (non Stan je ne clone pas de dinosaures et je ne suis pas Ross !) et d'avoir permis autant de sas de décompression.

Enfin, je remercie tout mon entourage ma famille et mes amis qui ont pu suivre de près ou de loin ce chapitre. En particulier mon pendant doctorante Camille, merci pour ton entrain et ton ambition qui déteignent sur moi à chacune de nos retrouvailles et me boostent toujours.

Mes derniers remerciements sont adressés à mes parents qui m'ont toujours soutenue et à Olivier, merci pour ta patience, ton humour et ton soutien au-delà de tout.



## Table des matières

Liste des Figures .....	13
Liste des Tableaux .....	19
Abréviations .....	21
Relevé de la production scientifique .....	23
Introduction bibliographique .....	27
<b>I. Les plantes parasites .....</b>	<b>27</b>
1. Le parasitisme des plantes à fleurs .....	27
A. Evolution au sein des Angiospermes.....	27
B. Diversité des plantes parasites.....	29
2. La famille des <i>Orobanchaceae</i> .....	33
A. Diversité et impacts agronomiques.....	33
B. Le cycle de vie de l'holoparasite racinaire <i>Phelipanche ramosa</i> .....	35
C. Méthodes de lutte.....	41
<b>II. L'organe clé du parasitisme : l'haustorium .....</b>	<b>43</b>
1. Caractéristiques de l'haustorium .....	43
A. Evolution de l'organe parasitaire .....	43
B. Les structures haustoriales précoces .....	43
2. Les molécules inductrices de l'haustorium (HIF) .....	45
A. Les composés phénoliques .....	47
B. Les hormones végétales .....	49
3. L'induction haustoriale chez <i>P. ramosa</i> .....	51
<b>III. Les cytokinines.....</b>	<b>55</b>
1. Rôles physiologiques et mode d'action.....	55
2. Caractéristiques structurales et biosynthèse .....	57
3. Transport.....	61
4. Dégradation et conversion chimique .....	63
5. Voie de signalisation des cytokinines .....	67
A. Perception des cytokinines.....	67
B. Transduction du signal .....	69
6. Les cytokinines dans l'environnement .....	71
<b>IV. Problématiques de recherche .....</b>	<b>73</b>
<b>Chapitre 1. Les microcals de <i>Phelipanche ramosa</i> traités aux cytokinines : un modèle efficace pour étudier la formation de l'haustorium chez les plantes holoparasites.....</b>	<b>81</b>
<b>I. Introduction.....</b>	<b>81</b>
<b>II. Article publié : Cytokinin treated microcalli of <i>Phelipanche ramosa</i>: an efficient model for studying haustorium formation in holoparasitic plants.....</b>	<b>85</b>
Abstract.....	85



1. Introduction .....	87
2. Materials and methods .....	91
A. Plant material .....	91
B. Microcallus production.....	91
C. Co-cultivation bioassays.....	93
D. Sample preparation for total RNA extraction and quantitative real-time PCR (RT-qPCR) analysis .....	95
E. Statistical analysis.....	97
3. Results and Discussion .....	97
A. Cytokinin treatments enhance the aggressiveness of <i>P. ramosa</i> microcallus ..	97
B. c/tZeatin induces the same molecular response pattern in seeds and microcalli	101
C. Fully grown plants producing viable seeds can regenerate from microcallus.	101
4. Conclusion .....	103
Acknowledgments .....	103
<b>III. Conclusion .....</b>	<b>105</b>
<b>Chapitre 2. <i>Phelipanche ramosa</i> répond à un double signal haustoriogène contenu dans les extraits rhizosphériques des plantes hôtes .....</b>	<b>111</b>
<b>I. Introduction.....</b>	<b>111</b>
<b>II. Matériel et Méthodes .....</b>	<b>121</b>
1. Matériel végétal.....	121
2. Production des extraits rhizosphériques .....	123
3. Purification bio-guidée des HIFs.....	123
4. Identification et quantification des composés actifs par UPLC-MS/MS .....	125
5. Tests d'induction haustoriale chez <i>P. ramosa</i> et traitements chimiques .....	129
6. Tests d'agressivité de <i>P. ramosa</i> en mini-rhizotron .....	131
7. Extraction d'ARN et d'ADN génomique .....	131
8. Amplification par PCR et PCR quantitative en temps réel.....	133
9. Clonage moléculaire des ADNc des gènes <i>HK</i> .....	135
10. Analyse phylogénétique des domaines CHASE des récepteurs HK.....	137
<b>III. Résultats .....</b>	<b>139</b>
1. Les extraits rhizosphériques de <i>B. napus</i> , <i>S. lycopersicum</i> et <i>A. thaliana</i> contiennent un signal haustoriogène commun.....	139
2. Les fractions 9 et 16 augmentent l'agressivité de <i>P. ramosa</i> .....	143
3. Les fractions 9 et 16 ont un effet synergique .....	143
4. Les fractions 9 et 16 induisent des réponses moléculaires différentes chez <i>P. ramosa</i>	145



5. Effets d'inhibiteurs pharmacologiques sur l'activité haustoriogène des fractions 9 et 16	149
6. Identification et quantification des cytokinines dans les extraits rhizosphériques d' <i>A. thaliana</i>	151
7. Identification du composé haustoriogène de la fraction 16	157
8. Une altération de la voie de signalisation des cytokinines conduit à une variation de l'activité haustoriogène des extraits rhizosphériques	159
9. Isolement des séquences codant pour les récepteurs HK	163
10. Analyse phylogénétique des domaines CHASE des récepteurs <i>HK</i>	165
<b>IV. Discussion</b>	<b>169</b>
1. Mise en évidence d'un double signal haustoriogène commun dans les extraits rhizosphériques de différentes plantes hôtes	169
2. Les extraits rhizosphériques d' <i>A. thaliana</i> déclenchent deux voies de signalisation distinctes, conduisant à la formation d'EHS chez <i>P. ramosa</i>	177
3. Des composés haustoriogènes de nature différente dans les extraits rhizosphériques	191
3.1. Les cytokinines comme HIFs naturels chez <i>P. ramosa</i> : un signal complexe	191
3.2. Des avancées concernant l'activité de la fraction 16	199
4. La plante hôte produit et exsude des cytokinines dans la rhizosphère	203
5. Les récepteurs des cytokinines, la clé de l'haustoriogenèse chez <i>P. ramosa</i> ?	209
<b>V. Conclusion</b>	<b>215</b>
<b>Conclusions générales et Perspectives</b>	<b>221</b>
1. Développement de l'outil microcal pour la validation fonctionnelle de gènes intégrateurs du signal haustoriogène	221
2. Les structures haustoriales précoces correspondent à des poils racinaires spécialisés mettant en jeu des acteurs moléculaires communs	225
3. Les CK agissent comme des molécules de signalisation plante-plante dans la rhizosphère et induisent la formation de l'haustorium chez <i>P. ramosa</i>	229
4. Evaluation de l'affinité des CK à activité haustoriogène pour les récepteurs HK	233
5. Crosstalk phytohormonal des CK haustoriogènes	237
6. Crosstalk entre les voies de signalisations F9 et F16	239
<b>Références bibliographiques</b>	<b>247</b>
<b>Annexes</b>	<b>269</b>



# Liste des Figures

## Introduction bibliographique

- Figure 1.** Evolution des plantes parasites chez les Angiospermes à travers 12 ou 13 évènements évolutifs (Westwood *et al.*, 2010)
- Figure 2.** Diversité phénotypique des plantes parasites (d'après Heide-Jorgensen, 2008)
- Figure 3.** Distribution géographique des espèces *S. hermonthica*, *S. asiatica*, *O. cumana* et *P. ramosa* (d'après Joel *et al.*, 2013)
- Figure 4.** Infestation des cultures par *Phelipanche ramosa* en France métropolitaine
- Figure 5.** Cycle de vie de *P. ramosa* (d'après Delavault *et al.*, 2017)
- Figure 6.** Morphologie de la graine et de l'haustorium terminal de *P. ramosa* (d'après Gibot-Leclerc *et al.*, 2012 et Goyet *et al.*, 2017)
- Figure 7.** Structures des principaux stimulants de germination des plantes parasites (d'après Joel *et al.*, 2013)
- Figure 8.** Connexion vasculaire entre le parasite et la plante hôte (Joel *et al.*, 2013)
- Figure 9.** Apparition de l'haustorium chez les orobanches (d'après Westwood *et al.*, 2010)
- Figure 10.** Haustorium latéral et terminal
- Figure 11.** Structures haustoriales précoces chez *Phelipanche ramosa* et *Striga hermonthica*
- Figure 12.** Principaux HIF décrits chez les plantes hémiparasites (d'après Joel *et al.*, 2013)
- Figure 13.** Mécanisme d'induction de l'haustorium chez les hémiparasites de racines
- Figure 14.** Induction de structures haustoriales précoces (EHS) par les extraits de *B. napus* responsables de l'agressivité chez *P. ramosa* (d'après Goyet *et al.*, 2017)
- Figure 15.** Fractionnement des extraits de *B. napus* (d'après Goyet *et al.*, 2017)
- Figure 16.** Principaux rôles des cytokinines dans la plante (d'après Werner and Schmölling, 2009)
- Figure 17.** Structures des cytokinines naturelles
- Figure 18.** Principales voies de biosynthèse des cytokinines (Hirose *et al.*, 2008)
- Figure 19.** Mécanisme d'inactivation des cytokinines par les CKXs (Kiber and Schaller, 2014)
- Figure 20.** Interaction moléculaire des cytokinines avec les récepteurs histidine kinases et transduction du signal (Arkhipov *et al.*, 2019)
- Figure 21.** Les acteurs de la voie de biosynthèse, transport, dégradation et signalisation des cytokinines



## **Chapitre 1. Les microcals de *Phelipanche ramosa* traités aux cytokinines : un modèle efficace pour étudier la formation de l'haustorium chez les plantes holoparasites**

**Figure 1.1.** Induction of *P. ramosa* microcalli in 96-well plates under binocular

**Figure 1.2.** Co-cultivation steps of *P. ramosa* microcalli on *S. Lycopersicum* roots

**Figure 1.3.** Cytokinin pretreatments enhance microcallus aggressiveness

**Figure 1.4.** Cytokinin treatment triggers haustorium marker genes expression in *P. ramosa* seeds and microcalli

**Figure 1.5.** Attached microcalli pretreated with cytokinin regenerate healthy plants that produce viable seeds in large amount

**Figure 1.6.** Timeline of plant regeneration method using cytokinin treated microcalli

## **Chapitre 2. *Phelipanche ramosa* répond à un double signal haustoriogène contenu dans les extraits rhizosphériques de plantes hôtes**

**Figure 2.1.** Voie de signalisation des cytokinines et étapes ciblées dans l'étude pour la caractérisation de mutants et la lignée transgénique

**Figure 2.2.** Dispositif expérimental pour la production des extraits rhizosphériques de *B. napus*, *S. lycopersicum* et *A. thaliana*

**Figure 2.3.** Culture hydroponique des plants de *B. napus*, *S. lycopersicum* et *A. thaliana*

**Figure 2.4.** Cinétique de l'activité haustoriogène des extraits rhizosphériques de *B. napus*, *S. lycopersicum*, *A. thaliana* évaluée sur 9 semaines d'exsudation

**Figure 2.5.** Activité haustoriogène des extraits rhizosphériques après concentration et fractionnement par HPLC inverse pour *B. napus*, *S. lycopersicum* et *A. thaliana*

**Figure 2.6.** Un traitement avec les fractions 9 et 16 d'*A. thaliana* augmente l'agressivité de *P. ramosa* de la même manière que les cytokinines

**Figure 2.7.** Action synergique des fractions 9 et 16 issues des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana*

**Figure 2.8.** Effet des fractions 9 et 16 des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* de *S. lycopersicum* sur l'expression des gènes de réponse aux cytokinines et des gènes marqueurs de la formation des EHS

**Figure 2.9.** Cinétique d'expression des gènes marqueurs de la formation des EHS après un traitement avec la fraction 9 et la fraction 16 des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana*

**Figure 2.10.** Le PI-55, l'ANA et l'ABA inhibent l'activité haustoriogène de la fraction 9 d'*A. thaliana* mais n'ont pas d'effet sur la fraction 16

**Figure 2.11.** Le DPI et le benzoate de potassium inhibent l'activité haustoriogène de la fraction 16 d'*A. thaliana* mais n'ont pas d'effet sur la fraction 9

**Figure 2.12.** Quantification des cytokinines dans les extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* (Col-0) concentrés par SPE inverse et quantité relative des cytokinines haustoriogènes détectées



**Figure 2.13.** Identification de cytokinines dans les fractions des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* (Col-0)

**Figure 2.14.** Quantité relative des cytokinines haustoriogènes identifiées dans les fractions des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* (Col-0)

**Figure 2.15.** Quantité relative des cytokinines haustoriogènes et représentation graphique de leur proportion dans les fractions haustoriogènes 9 et 16 et non haustoriogènes 7, 8, et 14 des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* (Col-0)

**Figure 2.16.** Activité haustoriogène des cytokinines (d'après Goyet *et al.*, 2017)

**Figure 2.17.** Chromatogramme ULC-MS full scan ES+ de la fraction 16 d'*A. thaliana* en comparaison avec une fraction sans activité haustoriogène (n°12)

**Figure 2.18.** Spectre de masse du pic d'intérêt contenu dans la fraction 16 des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana*

**Figure 2.19.** Spectre MS/MS haute résolution de l'ion parent du composé détecté dans la fraction 16 des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana*

**Figure 2.20.** Cinétique de l'activité haustoriogène des extraits rhizosphériques de l'écotype sauvage Col-0, des mutants *log4*, *pup14* et des plants transgéniques 35S:CKX2, évaluée sur 7 semaines

**Figure 2.21.** Activité haustoriogène des extraits rhizosphériques de Col-0, des mutants *log4*, *pup14* et de la lignée transgénique 35S:CKX2, après concentration et fractionnement par HPLC inverse

**Figure 2.22.** Domaines conservés des récepteurs HK de *P. ramosa* et *O. cumana*

**Figure 2.23.** Evolution de la présence des récepteurs HK chez les plantes autotrophes et parasites

**Figure 2.24.** Analyse phylogénétique des séquences protéiques des domaines CHASE des récepteurs aux cytokinines HK chez différentes espèces

**Figure 2.25.** Induction haustoriale chez les plantes hémiparasites (d'après Wada *et al.*, 2019)

**Figure 2.26.** Synthèse des différents acteurs identifiés dans cette étude comme étant impliqués dans l'induction de la formation de l'haustorium chez *Phelipanche ramosa*

## Conclusions générales et Perspectives

**Figure 3.1.** Acteurs moléculaires de la voie de différenciation des poils absorbants et des trichomes des plantes autotrophes impliquant une signalisation cytokinique

**Figure 3.2.** Système hétérologue pour l'expression des récepteurs HK avec les souches mutantes d'*E. coli* ( $\Delta$ rscC, cps::lacZ) (d'après Spíchal, 2011)

**Figure 3.3.** Evolution de la capacité à percevoir les molécules inductrices d'haustorium (d'après Westwood *et al.*, 2010)

## Annexes

**Annexe 2.** Activité haustoriogène des cytokinines chez *S. hermonthica*



## Liste des Tableaux

**Chapitre 1. Les microcals de *Phelipanche ramosa* traités aux cytokinines : un modèle efficace pour étudier la formation de l'haustorium chez les plantes holoparasites**

**Table 1.1.** Primer used for RT-qPCR analysis

**Chapitre 2. *Phelipanche ramosa* répond à un double signal haustoriogène contenu dans les extraits rhizosphériques de plantes hôtes**

**Tableau 2.1.** Liste des mutants d'*A. thaliana* pour la biosynthèse et le transport des cytokinines ainsi que les couples d'amorces utilisés pour la confirmation moléculaire

**Tableau 2.2.** Masses sèches de racines et volumes d'extraits rhizosphériques concentrés par SPE inverse pour les différents génotypes d'*A. thaliana*

**Tableau 2.3.** Volumes des extraits rhizosphériques les plus actifs concentrés par SPE inverse chez *B. napus*, *S. lycopersicum*, *A. thaliana*

**Tableau 2.4.** Intervalles des temps d'élution lors du fractionnement par HPLC inverse des extraits rhizosphériques de *B. napus*, *S. lycopersicum* et *A. thaliana* (d'après Goyet, 2017)

**Tableau 2.5.** Facteurs de corrections appliqués aux données de quantification et d'identification des cytokinines dans les extraits rhizosphériques d'*A. thaliana*

**Tableau 2.6.** Liste des cytokinines testées pour leur activité haustoriogène (d'après Goyet et al., 2017)

**Tableau 2.7.** Liste des inhibiteurs pharmacologiques testés

**Tableau 2.8.** Ratios du volume d'extrait rhizosphérique récupéré par semaine sur la masse racinaire sèche récoltée pour chaque génotype d'*A. thaliana*

**Tableau 2.9.** Liste des couples d'amorces utilisés en qPCR

**Tableau 2.10.** Amorces utilisées pour le clonage moléculaire des récepteurs *HK3* et *HK4* pour les plantes parasites *P. ramosa* et *O.cumana*

**Tableau 2.11.** Numéros d'accession des séquences *HK*

**Tableau 2.12.** Quantité totale de cytokinines détectées dans les extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* (Col-0) après concentration par SPE inverse

**Tableau 2.13.** Activité haustoriogène pour différentes dilutions des 24 fractions HPLC issues des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana*

**Tableau 2.14.** Caractéristiques des séquences *HK* de *P. ramosa* et *O.cumana* obtenues par clonage moléculaire

## Annexes

**Annexe 1.** Séquences en acides aminés des récepteurs *HK* de *P. ramosa*, *O.cumana* et *A. thaliana*



## Abréviations

ABA : Acide abscissique

ANA : Auxine

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

CK : Cytokinine

CKX : Cytokinines oxydases

EHS : Early Haustorial Structures

HIF : Haustorium Inducing Factor

HK : Histidine Kinase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Péroxyde d'hydrogène

HPLC : High Pressure Liquid Chromatography

LOG : Lonely Guy

MS/MES : Murashige & Skoog medium containing Nitsch vitamins and MES buffer

PPM : Plant Preservative Mixture

PCR : Polymerase Chain Reaction

PUP : Purine Perméase

ROS : Reactive Oxygen Species

RR : Response Regulator

SL : Strigolactones

SPE : Solid Phase Extraction

TRN2 : Tornado 2

UPGMA : Unweight Pair Group Method with Arithmetic mean

UPLC-MS/MS : Ultra-high performance liquid chromatography mass spectrometry

YFP : Yellow Fluorescent Protein

ZFP6 : Zinc Finger Protein 6



## Relevé de la production scientifique

### Articles scientifiques

**Billard E.**, Goyet V., Delavault P., Simier P., Montiel G., (2020). Cytokinin treated microcalli of *Phelipanche ramosa*: an efficient model for studying haustorium formation in holoparasitic plants. *Journal of Plant Cell Tissue and Organ Culture*. doi:10.1007/s11240-020-01813-6.

Goyet V., **Billard E.**, Pouvreau J-B., Lechat MM., Pelletier S., Bahut M., Monteau F., Spichal L., Delavault P., Montiel G., Simier P., (2017). Haustorium initiation in the obligate parasitic plant *Phelipanche ramosa* involves a host-exudated cytokinin signal. *Journal of Experimental Botany* 68, 5539–5552.

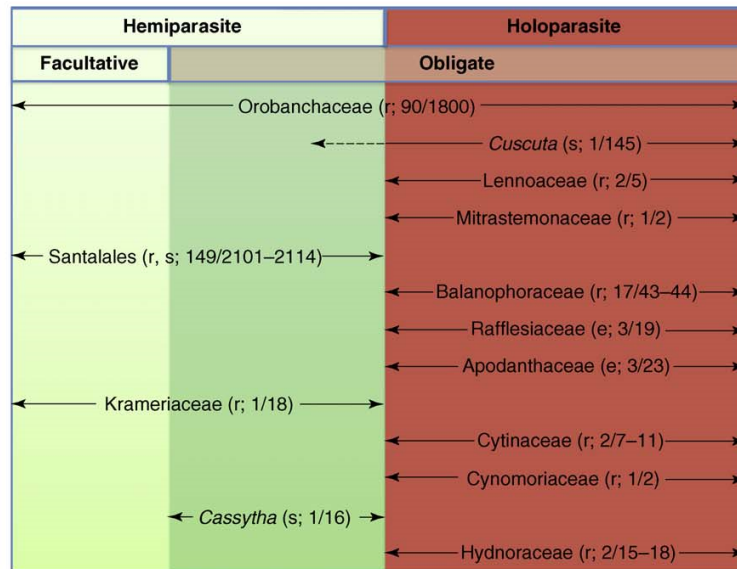
### Communications orales

**Billard E.**, Le Vourch V., Goyet V., Pouvreau JB., Spíchal L., Montiel G., Simier P., (2019). Cytokinins act as signaling molecules within the rhizosphere to trigger haustorium formation in the holoparasitic plant *Phelipanche ramosa*. *15<sup>e</sup> Congrès International sur les Plantes Parasites (WCPP – World Congress on Parasitic Plants)*. Amsterdam, Pays Bas.

**Billard E.**, Montiel G., Simier P., (2018). Cytokinins involvement in haustorium formation in parasitic plant *Phelipanche ramosa*. *11<sup>e</sup> Journée des Doctorants de la Structure Fédérative de Recherche (SFR) QUASAV*. Angers, France.



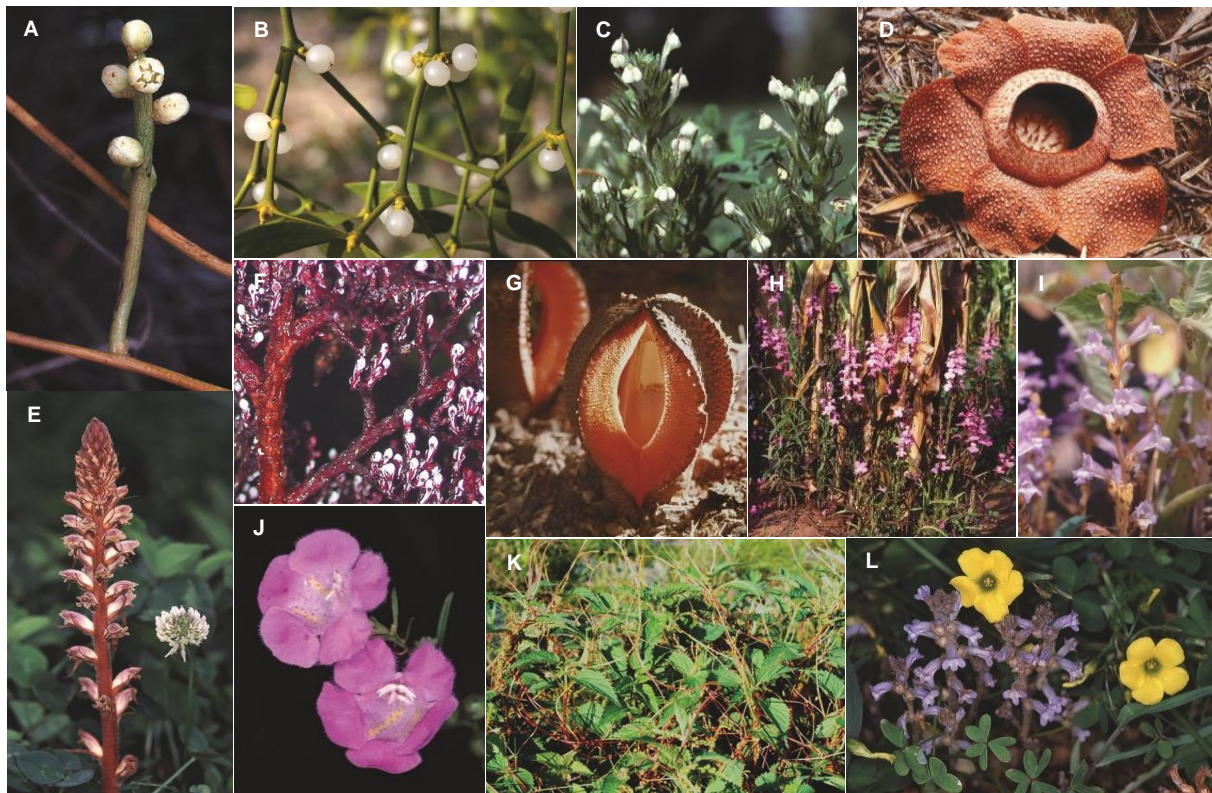
## **INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**



TRENDS in Plant Science

**Figure 1. Evolution des plantes parasites chez les Angiospermes à travers 12 ou 13 évènements évolutifs (Westwood *et al.*, 2010).**

Mode de fixation r : épiphyte ; s : épiphyte ; e : endophytes ; x/y : nombre de genres/d'espèces estimées.



**Figure 2. Diversité phénotypique des plantes parasites (d'après Heide-Jørgensen, 2008).**

**A.** *Cassytha filiformis* (Lauraceae). **B.** *Viscum album* (Viscaceae). **C.** *Triphysaria versicolor* (Orobanchaceae). **D.** *Rafflesia keithii* (Rafflesiaceae). **E.** *Orobanche minor* (Orobanchaceae) sur le trèfle (*Trifolium* sp.). **F.** *Parasitaxus usta* (Podocarpaceae). **G.** *Hydnora africana* (Aristolochiaceae). **H.** *Striga hermonthica* (Scrophulariaceae) sur des plants de maïs (*Zea mays*). **I.** *Phelipanche aegyptiaca* (Orobanchaceae). **J.** *Agalinis purpurea* (Orobanchaceae). **K.** *Cuscuta europaea* (Cuscutaceae) parasitant l'ortie (*Urtica dioica*). **L.** *Phelipanche ramosa* (Orobanchaceae) sur de l'*Oxalis* sp.

## Introduction bibliographique

### I. Les plantes parasites

#### 1. Le parasitisme des plantes à fleurs

##### A. Evolution au sein des Angiospermes

L'extrême diversité du vivant conduit à des interactions constantes entre des espèces différentes. L'ensemble de ces interactions constitue un moteur important de l'adaptation et la co-évolution des espèces en termes de comportement, de morphologie ou de physiologie.

Le parasitisme fait partie de cette course à l'évolution. Selon l'hypothèse de Van Valen en 1973, il est le résultat d'un processus évolutif réciproque qui s'illustre par une métaphore célèbre « Ici, voyez-vous, il faut courir aussi vite que possible pour rester au même endroit » (la Reine Rouge dans « De l'autre côté du miroir », Carroll, 1871). L'hôte et le pathogène évoluent constamment et simultanément pour maintenir leur niveau d'adaptation face à l'autre. Les parasites occuperaient ainsi une place majeure dans la diversité totale du vivant puisque l'on estime que ce mode vie serait présent chez tous les types d'organismes existants sur Terre (Windsor, 1998; Poulin and Morand, 2000). Les parasites tirent des bénéfiques d'un hôte et en modifient profondément leur biologie, leur croissance, leur vulnérabilité, leur succès reproducteur, leur comportement ou encore leur distribution spatiale. Bien que le parasitisme soit communément réservé aux animaux, ce mode d'interaction est très présent dans le règne végétal et certaines plantes ont développé la capacité de parasiter d'autres plantes afin d'y prélever les nutriments nécessaires à leur croissance (Kuijt, 1969). C'est notamment au sein de l'abondant groupe des Angiospermes que les plantes parasites sont recensées.

Les plantes à fleurs représentent la majeure partie de la flore terrestre comprenant 250 000 à 300 000 espèces, et forment à elles seules environ 90% des espèces végétales terrestres (Lupia *et al.*, 2000; Crepet and Niklas, 2009; Sauquet *et al.*, 2017). Cette division, qualifiée d'« abominable mystère » par Charles Darwin en 1879 à l'égard de leur prolifération rapide et de leur diversification précoce, dominerait depuis le début du Crétacé soit environ 150 millions d'années (Crane *et al.*, 1995; Soltis *et al.*, 2009; Friedman, 2009). L'essentiel des familles déjà présentes vers 75 millions d'années en fait le groupe le plus diversifié totalisant actuellement 453 familles (Soltis *et al.*, 2009). Une adaptation remarquable de ces plantes à fleurs est le parasitisme, qui semblerait avoir évolué indépendamment 12 fois au sein des Angiospermes dicotylédones (**Figure 1** ; dePamphilis *et al.*, 1997; Nickrent *et al.*, 1998; Barkman *et al.*, 2007; Westwood *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 2016). Seule l'espèce *Parasitaxus ustus*, présente chez les Gymnospermes (**Figure 2.F**), aurait la capacité de parasiter d'autres plantes (Atsatt, 1973; Feild and Brodribb, 2005). L'ensemble des plantes parasites représenterait aujourd'hui 1% des plantes Angiospermes (Kuijt, 1969; Press and Graves, 1995; Westwood *et al.*, 2010;



Yoshida and Shirasu, 2012). Elles ont ainsi la faculté d'envahir la plante hôte en pénétrant dans les tissus vivants par l'intermédiaire d'un organe spécialisé dénommé haustorium pour en tirer les ressources nécessaires à leur croissance. C'est en particulier cet organe qui témoigne de l'évolution du mode de nutrition de l'autotrophie vers l'hétérotrophie (Westwood *et al.*, 2010).

Le parasitisme résulterait de pressions évolutives directionnelles exercées sur les plantes autotrophes qui ont conduit à l'accumulation d'un nouveau potentiel génétique pour évoluer vers l'hétérotrophie (Atsatt, 1973). Par ailleurs, les plantes parasites évolueraient plus rapidement d'un point de vue moléculaire avec un taux de mutations plus élevé que les autres plantes. Cette hypothèse est probablement liée au mode de vie parasitaire de ces plantes qui, de par leur connexion directe avec la plante hôte, seraient plus fréquemment soumises à des mutations. En outre, les parasites seraient constamment soumis à de fortes pressions évolutives en interagissant de manière constante avec l'hôte et bénéficieraient ainsi de sélections positives à travers une augmentation du taux de substitutions parmi des gènes impliqués dans l'exploitation de l'hôte (Bromham *et al.*, 2013).

Si l'adaptation unique de ces plantes parasites les rend fascinantes aussi bien sur le plan anatomique, morphologique que biochimique (Nickrent *et al.*, 1998), elles représentent en revanche une menace pour les cultures d'intérêt économique comme le colza (*Brassica napus* L.) ou le maïs (*Zea mays* L.). Aussi, l'accumulation de connaissances sur l'interaction entre la plante parasite et l'hôte sur le plan génétique et moléculaire est plus que jamais une étape fondamentale pour appréhender des méthodes de lutttes durables contre les parasites les plus dévastateurs des grandes cultures tels que les genres *Orobanche* *Phelipanche* et *Striga*.

## **B. Diversité des plantes parasites**

Les plantes parasites sont connues depuis l'antiquité avec le recensement de certaines espèces comme le gui (*Viscum album* L.) (**Figure 2.B**), qui fut la première plante parasite à avoir été reconnue comme telle dès l'an 1200 par Albertus Magnus, avant la découverte des genres *Cuscuta* ou *Cassytha* peu après 1800 (Agiros, 2005; Heide-Jørgensen, 2008; Furuhashi *et al.*, 2011). Cependant, ces parasites sont véritablement devenus une source d'intrigue et de recherche pour les scientifiques depuis le 20<sup>ème</sup> siècle, avec l'introduction de l'espèce *Striga asiatica*, une plante dévastatrice pour les cultures de maïs, dans le Sud-Est des Etats Unis dans les années 1950 (Hood *et al.*, 1998).

La grande diversité des plantes parasites est directement liée à l'apparition multiple, au sein de 20 familles différentes, de la capacité à parasiter d'autres plantes (Heide-Jørgensen, 2008). Ces familles réparties dans trois sous-classes des Angiospermes dicotylédones,



les *Magnoliidae*, *Rosidae*, et *Asteridae*, comprennent approximativement 280 genres et plus de 4000 espèces (Nickrent *et al.*, 1998; Heide-Jørgensen, 2008; Torres-Vera *et al.*, 2016). La diversité taxonomique de ces plantes leur a permis de coloniser pratiquement toutes les communautés végétales et de s'implanter dans une large diversité d'habitats et de climats à l'exception de l'Antarctique (Parker, 2012; Heide-Jørgensen, 2013). Ces parasites ont ainsi su s'adapter à des conditions difficiles comme en témoigne la présence de la plante parasite *Pedicularis dasyantha* dans le grand Nord, ou bien des parasites des familles *Rafflesiaceae* et *Balanophoraceae* dans les forêts tropicales ou encore du genre *Hydnora* dans certaines régions subtropicales (Press and Graves, 1995).

Au-delà de la classification taxonomique, les plantes parasites présentent des distinctions morphologiques et de développement qui conditionnent leur stratégie d'invasion qui peuvent être multiples. Dès lors, il est possible de distinguer cette disparité selon deux critères principaux.

Une première distinction concerne le site de fixation du parasite sur la plante hôte. En effet, certaines plantes parasites telles que le gui ou la cuscute (*Cuscuta sp*) (**Figure 2.K**), colonisent les parties aériennes de leur plante hôte respective. Elles sont à ce titre qualifiées de parasites « épiphytes » et ces derniers représentent environ 40% des parasites Angiospermes. Au contraire, lorsque le parasite colonise les parties racinaires de la plante hôte comme les espèces *Rafflesia keithii* ou *Striga hermonthica* (**Figure 2.D.H**), ce sont des parasites dit « épiphyses » qui regroupent 60% d'espèces (Press and Graves, 1995).

Une seconde discrimination est établie selon la capacité photosynthétique des plantes parasites. Ainsi, les plantes hémiparasites possèdent une activité photosynthétique leur permettant (si leur dépendance à l'hôte le permet), d'établir une relation parasitaire moins stricte en prélevant uniquement l'eau et les sels minéraux dans le xylème de l'hôte. Ces plantes peuvent ainsi être classées selon leur degré de dépendance à l'hôte. Elles sont qualifiées de plantes obligatoires lorsqu'elles ont la nécessité d'être totalement liées à la plante hôte pour se perpétuer, tandis que les hémiparasites facultatifs peuvent s'affranchir de l'hôte pendant au moins une partie de leur cycle végétatif. Cependant, bien que ces derniers soient capables de fournir leur propre apport en glucides et ainsi survivre sur de longues périodes sans plante hôte, les quantités produites sont généralement insuffisantes et la survie de ces plantes se fait souvent au détriment de leur croissance, d'une altération des fleurs ou de la production des fruits (Heide-Jørgensen, 2008).

Les plantes qualifiées d'holoparasites sont quant à elles totalement dépourvues de chlorophylle et dépendent donc exclusivement de la relation avec la plante hôte pour survivre (Yoder, 2001; Joel *et al.*, 2013). Ces dernières vont se fixer à la plante hôte pour capter l'eau,

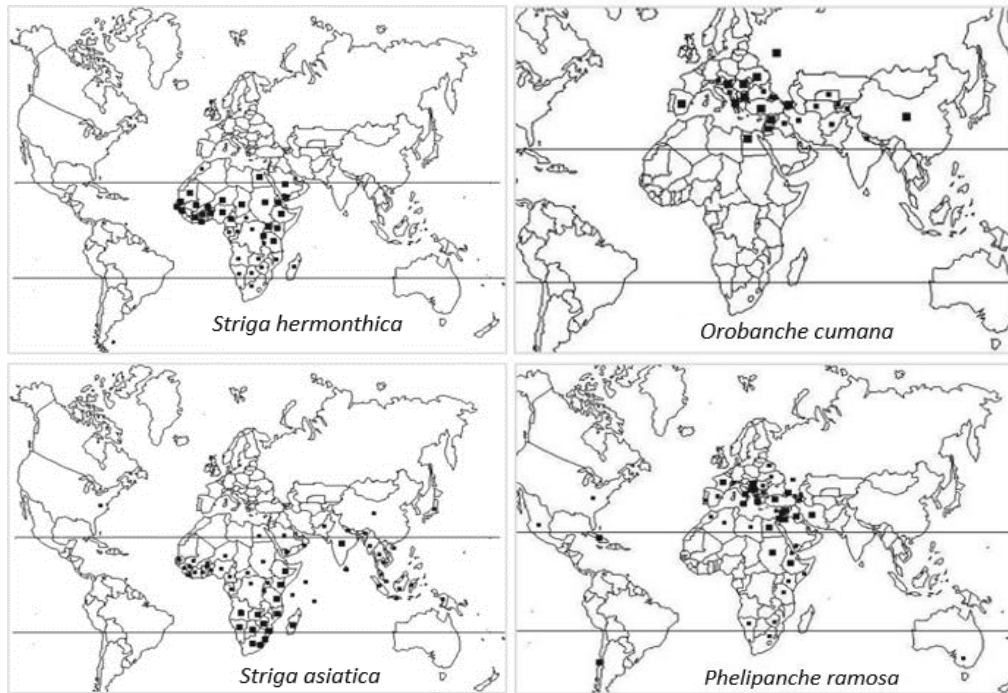


Figure 3. Distribution géographique des espèces *S. hermonthica*, *S. asiatica*, *O. cumana* et *P. ramosa* (d'après Joel et al., 2013).

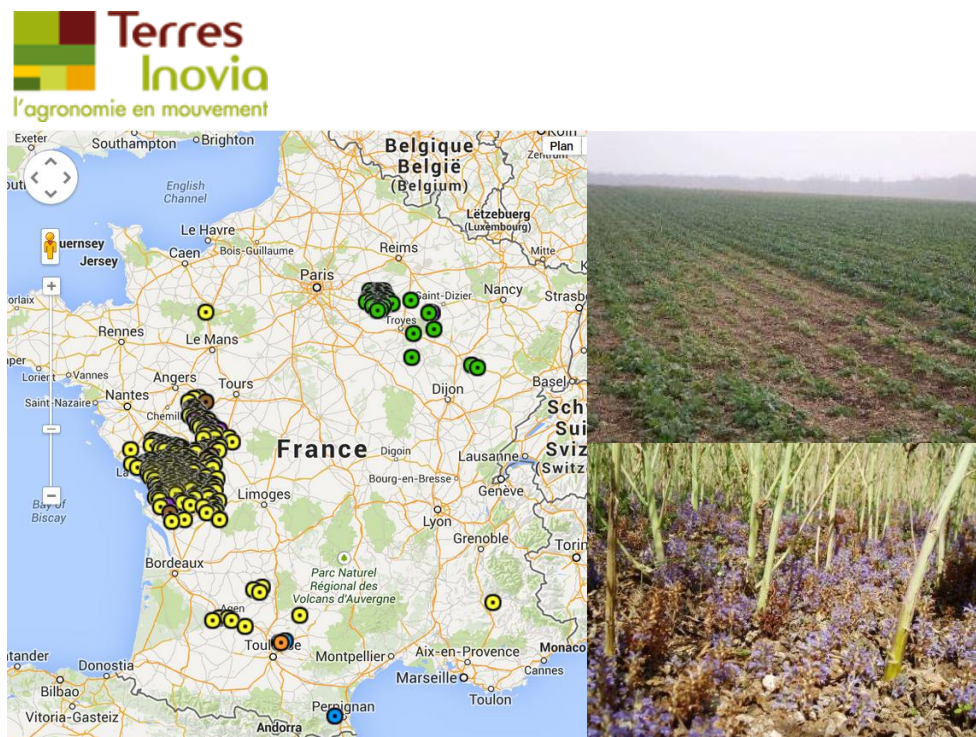


Figure 4. Infestation des cultures par *Phelipanche ramosa* en France métropolitaine.

Les communes et les cultures touchées par l'orobanche rameuse en France métropolitaine (carte de Terres Inovia, 10/2017). En jaune les cultures de colza, en vert les cultures de chanvre, en orange les cultures de tournesol, en marron les cultures de tabac et en bleu d'autres cultures. A droite, photographies de champs de colza infestés par *P. ramosa* (crédit : LBPV).

les minéraux ainsi que les composés réduits (glucides, acides aminés, acides organiques, ...), à travers des connexions principalement phloémiennes. La représentation de ces deux dernières catégories est hétérogène puisqu'il existe 90% de plantes hémiparasites contre 10% de plantes holoparasites (Joel *et al.*, 2013). Les premières sont réparties dans l'ensemble des sous-classes des Angiospermes tandis que les secondes sont les plus avancées en ce qui concerne leur spécialisation parasitaire, et sont donc affiliées aux sous-classes les plus récentes des dicotylédones, les *Rosidae* et les *Asteridae*.

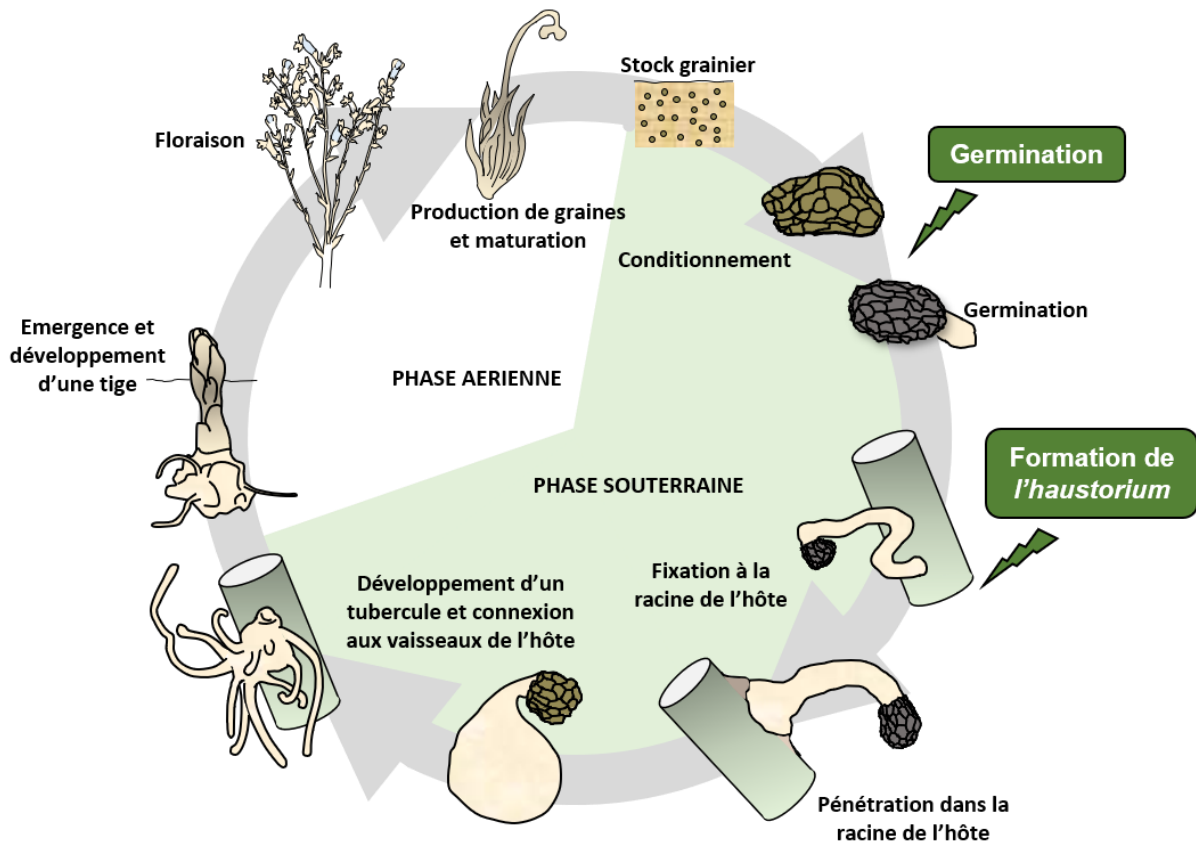
A elle seule, la famille des *Orobanchaceae* est connue pour regrouper l'ensemble de ces stratégies parasitaires comprenant aussi bien des plantes holoparasites que des hémiparasites, et forme l'un des groupes les plus fournis en plantes parasites (Westwood *et al.*, 2010).

## 2. La famille des *Orobanchaceae*

### A. Diversité et impacts agronomiques

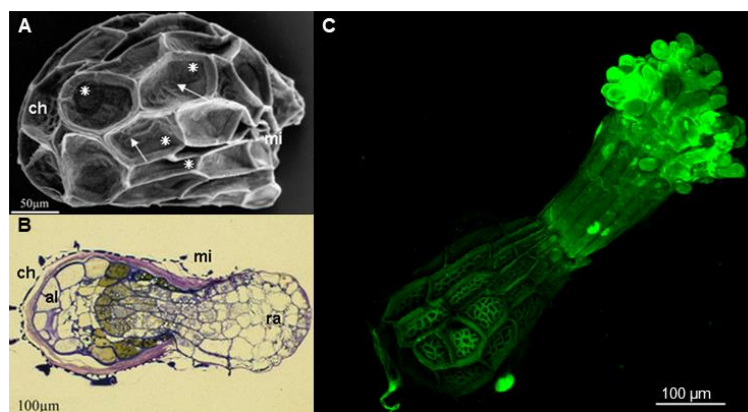
La famille des *Orobanchaceae* regroupe une majorité de plantes parasites épirhizes, avec plus de 2060 espèces réparties dans 90 genres présentes sur l'ensemble des continents, à l'exception de l'Antarctique (McNeal *et al.*, 2013). La majorité des *Orobanchaceae* parasitent des espèces hôtes non cultivées et ont un rôle dans la structuration des communautés végétales en limitant la propagation de certaines plantes adventices (Press, 1998). Cependant, c'est au sein de cette famille que les genres *Striga*, *Alectra*, *Aeginetia*, *Orobanche* et *Phelipanche*, comprennent des espèces qui sont considérées comme les parasites les plus sévères des cultures des régions tropicales, subtropicales sèches ou tempérées. Avec le genre *Cuscuta* (*Cuscutaceae*), ils comptent parmi les plantes parasites les plus dommageables pour les cultures dans le monde (Bennett and Mathews, 2006; Mohamed *et al.*, 2006). Parmi les espèces les plus dévastatrices, les hémiparasites appartenant au genre *Striga*, telles que *Striga hermonthica*, *Striga gesnerioides* ou *Striga asiatica*, sont connues pour affliger des contraintes majeures pour la production agricole des régions d'Asie ou d'Afrique en s'attaquant au maïs ou au sorgho (*Sorghum bicolor* L.) (**Figure 3** ; Palmer *et al.*, 2009). C'est notamment *S. asiatica*, qui fut considérée comme la plus dommageable après son apparition en 1956 dans le Sud-Est des Etats-Unis, entraînant des pertes de rendement allant jusqu'à 100% pour les cultures de maïs (Hood *et al.*, 1998).

Parmi les holoparasites, les genres *Phelipanche* et *Orobanche* principalement originaires des régions méditerranéennes comprenant l'Afrique du Nord, le Moyen-Orient, l'Europe du Sud, ainsi que de l'Asie occidentale (**Figure 3**), sont connus pour être des bio-agresseurs des cultures pouvant être à l'origine de pertes importantes de récoltes parmi les cultures de



**Figure 5. Cycle de vie de *P. ramosa* (d'après Delavault et al., 2017).**

Le cycle de *P. ramosa* débute par la germination des graines en dormance dans le sol en réponse à des stimulants de germination émis dans la rhizosphère par la plante hôte. En réponse à des stimuli chimiques et physiques provenant de l'hôte, l'haustorium va se différencier au niveau de l'apex de la radicule et permettre l'adhésion puis la connexion au système vasculaire de la plante hôte. Le parasite va alors exploiter les ressources de l'hôte et stocker les réserves, sous la forme d'un tubercule. Ce dernier va se différencier en hampe florale qui émergera du sol pour fleurir et fructifier, libérant des centaines de milliers de graines.



**Figure 6. Morphologie de la graine et de l'haustorium terminal de *P. ramosa* (d'après Gibot-Leclerc et al., 2012 et Goyet et al., 2017).**

**A.** Observation en microscopie électronique à balayage d'une graine de *P. ramosa* (Gibot-Leclerc et al., 2012). **B.** Coupe longitudinale d'une graine germée de *P. ramosa*. (Gibot-Leclerc et al., 2012). **C.** Papilles haustoriales terminales de *P. ramosa* au microscope confocal (Goyet et al., 2017). ch : chalaze, mi : micropyle, al : albumen, ra : radicule.

légumineuses, *Solanaceae*, *Brassicaceae* ou *Asteraceae* (Gibot-Leclerc *et al.*, 2012; Bao *et al.*, 2017). Les plantes appartenant à ces genres sont ainsi des pathogènes majeurs pour certaines cultures, comme c'est le cas pour *Orobanche crenata* qui engendre le plus fort impact agronomique pour les cultures de féverole (*Vicia faba* L.), *Orobanche cumana* qui infeste le tournesol (*Helianthus annuus* L.) principalement dans la région méditerranéenne, ou encore *Phelipanche aegyptiaca* avec la tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Mohamed *et al.*, 2006; Hershenhorn *et al.*, 2009; Parker, 2009).

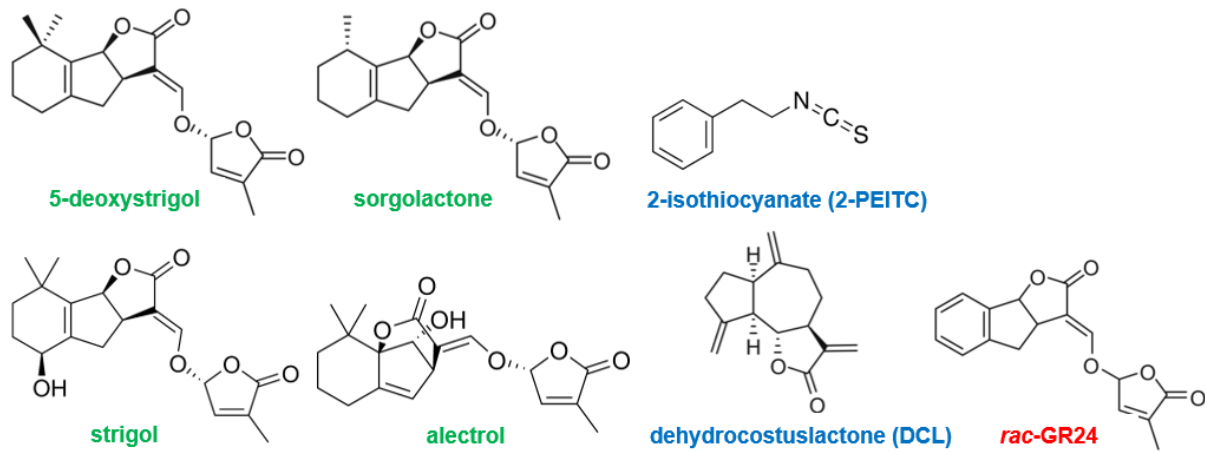
En France, c'est l'orobanche rameuse *Phelipanche ramosa* L. (Pomel.) (**Figure 2.L**) qui est considérée comme la plante parasite la plus dévastatrice, entraînant des pertes de récoltes allant jusqu'à 80% pour les cultures de colza, son hôte principal. De par son large spectre de plantes hôtes comprenant également le tabac (*Nicotiana tabacum* L.), le chanvre (*Cannabis sativa* L.), ou la tomate (*Lycopersicon esculentum*), ce parasite a su coloniser notamment tout l'ouest du territoire avec une concentration particulière dans la région Poitou-Charentes (**Figure 4** ; Gibot-Leclerc *et al.*, 2003; Stojanova *et al.*, 2019). L'étendue du spectre d'hôte de *P. ramosa* ainsi que son expansion rapide en Europe la place comme une espèce modèle pour l'étude de la biologie parasitaire des interactions plantes - parasites, et des mécanismes de coévolution.

### **B. Le cycle de vie de l'holoparasite racinaire *Phelipanche ramosa***

Le cycle de développement particulier de *P. ramosa* se déroule majoritairement de manière souterraine et comporte deux phases clés du comportement parasitaire (**Figure 5**). Ces deux étapes correspondent d'une part à la germination inductible des graines par des molécules émises par la racine hôte et d'autre part à la colonisation racinaire de la plante hôte par la plante parasite.

- **Phase pré-parasitaire**

Le cycle de vie de *P. ramosa* commence par une période de dormance des graines dans le sol empêchant la germination de celles-ci (**Figure 6.A** ; Joel *et al.*, 2007). Les graines peuvent ainsi rester dans le sol pendant près de 20 ans jusqu'à l'apparition des conditions favorables d'hygrométrie, d'oxygène, de température ou lumière, qui permettraient de maximiser les chances de survie de la plante parasite après germination (Estabrook and Yoder, 1998; Bewley *et al.*, 2012; Murdoch and Kebeab, 2013). Chez *P. ramosa*, la levée de dormance débute par une phase d'imbibition de la graine. Cette étape peut être définie comme une phase de reprise métabolique qui est suivie d'une phase d'acquisition de la capacité à percevoir des stimulants de germination ou conditionnement. Cette dernière étape correspond à une déméthylation massive de l'ADN. Après perception des stimulants de germination,



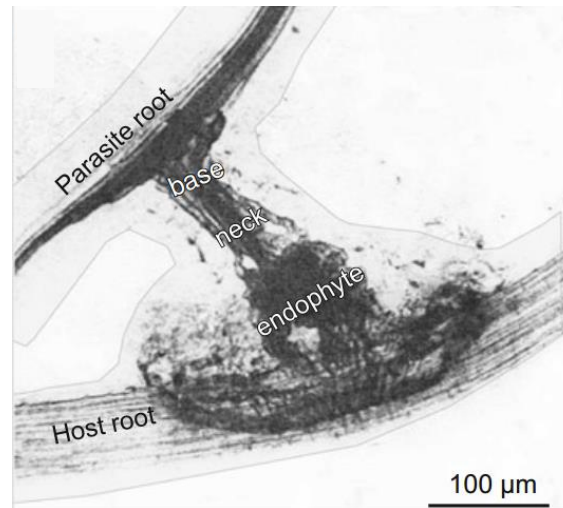
**Figure 7. Structures des principaux stimulants de germination des plantes parasites (d'après Joel *et al.*, 2013).**

Le 5-deoxystrigol, le strigol, le sorgolactone et l'alectrol appartiennent à la famille des strigolactones (en vert). Le 2-PEITC appartient à la famille des isothiocyanates et le DCL aux sesquiterpènes lactones (en bleu). Le stimulant synthétique de germination *rac*-GR24 est représenté en rouge.

le processus s'achève avec l'émergence de la radicule à travers les structures qui l'entourent (Bewley *et al.*, 2012).

Ce sont ainsi des molécules émises par la plante hôte qui vont induire la germination des graines de *P. ramosa* dans le sol (**Figure 6.B** et **Figure 7**). L'identification de ces stimulants de germination a fait l'objet de recherches intensives pour les différents genres de plantes parasites. Il est désormais établi que la majorité des stimulants de germination appartiennent notamment à la famille des strigolactones (SL), qui sont une famille de phytohormones. Ces composés font partie d'un groupe de lactones terpénoïdes produits à partir de caroténoïdes *via* des caroténoïdes isomérases et dioxygénases et conduisant à la formation du carlactone. Les SL sont désormais connues pour contrôler plusieurs processus développementaux au sein de la plante tels que la ramification des parties aériennes et des racines, la senescence foliaire, ou la participation à la croissance secondaire des jeunes pousses. Leur rôle s'étend également à la communication rhizosphérique avec l'établissement d'interactions biotiques, en tant que signaux dérivés des racines permettant la mise en place des symbioses mycorhiziennes (Yoneyama *et al.*, 2009; Seto *et al.*, 2014). C'est le cas du 5-deoxystrigol (**Figure 7**) qui fut identifié à partir d'extraits racinaires de *Lotus japonicus* comme composé inducteur de la ramification des hyphes mycéliens chez les champignons mycorhiziens arbusculaires, ou du sorgolactone, principale molécule active des extraits racinaires de sorgho (Akiyama *et al.*, 2005; Gomez-Roldan *et al.*, 2007; Yoneyama *et al.*, 2009).

Les SL sont ainsi identifiées comme les principaux stimulants de germination depuis 50 ans pour les genres *Orobanche* et *Striga* (Ćavar *et al.*, 2015). De nombreux composés en quantités variables ont ainsi pu être détectés parmi des extraits issus d'une large diversité de plantes mono ou dicotylédones hôte ou non-hôtes. C'est le cas du strigol, un stimulant de germination pour *Striga lutea*, qui fut isolé en 1966 à partir d'extraits d'une espèce non hôte le coton (*Gossypium hirsutum* L.), mais aussi le sorgolactone et l'alectrol, séparés des extraits de sorgho ou de niébé (*Vigna unguiculata* L.) (**Figure 7** ; Yoneyama *et al.*, 2009; Ćavar *et al.*, 2015). Des composés autres que les strigolactones sont également perçus comme des stimulants de germination chez certaines plantes parasites. *P. ramosa* est ainsi capable de germer en réponse à des produits de dégradation des glucosinolates, les isothiocyanates, présents dans la rhizosphère des Brassicacées (colza, *Arabidopsis thaliana*) (Auger *et al.*, 2012). De même, l'espèce *O. cumana* reconnaît également les sesquiterpènes lactones comme le costunide et le dehydrocostus lactone (DCL), présents dans la rhizosphère du tournesol (**Figure 7**). Ceci traduit une adaptation poussée de la réponse germinative chez ces espèces vis-à-vis de leurs hôtes respectifs. Si l'existence de spécificités de perception des stimulants de germination est mise en évidence, de récents résultats menés au LBPV ont



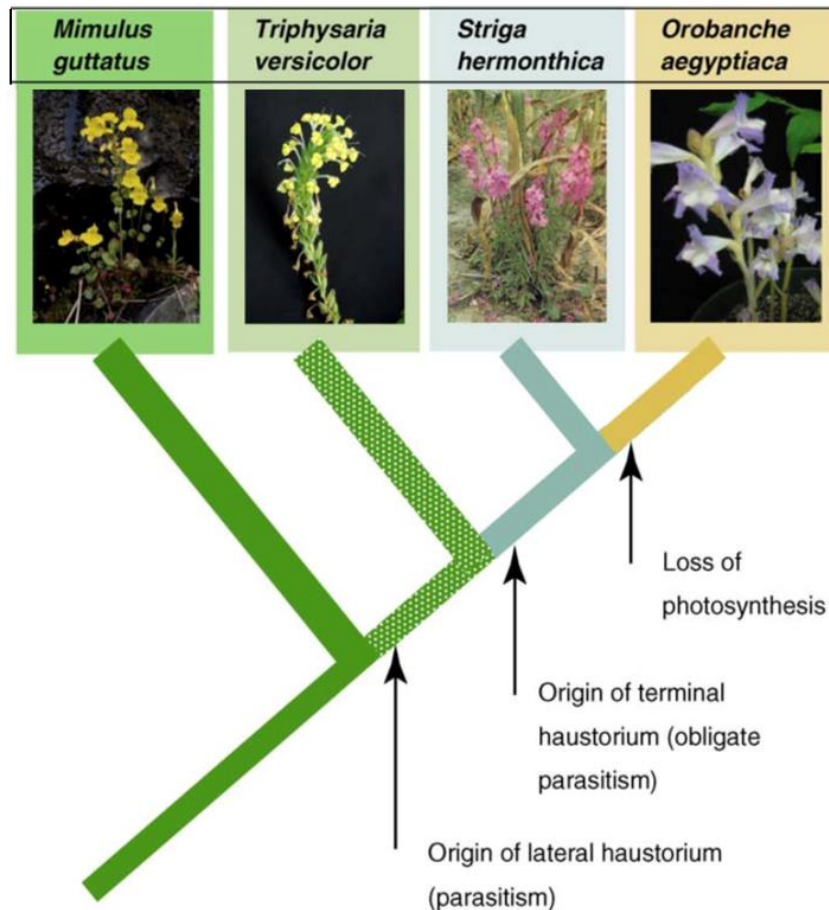
**Figure 8. Connexion vasculaire entre le parasite et la plante hôte (Joel *et al.*, 2013).**

Coupe longitudinale de la connexion vasculaire entre la plante parasite hémiparasite facultative *Rhaphicarpa fistulosa* (Scrophulariaceae) et son hôte le millet perlé (*Pennisetum americanum* L.). La connexion au xylème est permise par l'intermédiaire de l'haustorium.

permis de montrer que la perception des SL était un processus présent à la fois chez les plantes parasites mais aussi chez *Arabidopsis*, faisant intervenir la CYP707A, une hydroxylase impliquée dans la dégradation de l'acide abscissique (Lechat *et al.*, 2012; Lechat, 2014; Brun *et al.*, 2019). Cependant, l'existence d'une seconde voie de signalisation canonique chez *Arabidopsis* impliquant des karrikins (stimulants de germination chez de nombreuses plantes), le récepteur KARRAKIN INSENSITIVE 2 (KAI2), les F-box protéines MORE AXILLARY BRANCHES 2 (MAX2), SMAX1 et le facteur de transcription WRKY33, suggèrent que la perte de germination spontanée des plantes parasites est liée à une induction exacerbée de CYP707A (Brun *et al.*, 2019).

- **Phase parasitaire**

Après la germination de la graine, la racine forme un organe invasif hautement spécialisé et spécifique des plantes parasites, l'haustorium (**Figure 6.C**). Cette étape qui est également inductible par des molécules exogènes provenant de l'hôte, marque le commencement de la phase parasitaire et débute avec la formation de structures haustoriales précoces à l'apex de la racine (Yoshida *et al.*, 2016). Ces organes vont produire des substances adhésives permettant au parasite de se fixer aux racines de l'hôte (Yoshida *et al.*, 2016). Après contact avec la plante hôte, l'haustorium en développement pénètre les racines de l'hôte. Cet envahissement du cortex racinaire est permis à la fois par des pressions mécaniques dues à l'expansion cellulaire des cellules de l'épiderme (ou cellules intrusives) de la racine, et à une dégradation enzymatique de la paroi cellulaire de l'hôte par des cellulases ou hémicellulases (arabinofuranosidase, xylosidase), des enzymes pectinolytiques (pectines méthylestérases, polygalacturonases), des peroxydases ou des protéases. Ces enzymes dégradent la lamelle moyenne de la paroi cellulaire de l'hôte et ainsi facilitent la progression des cellules intrusives du parasite dans la racine hôte (Veronesi *et al.*, 2007). La maturation de l'haustorium commence ainsi avec la différenciation des cellules de l'épiderme en cellules intrusives qui avec leur forme caractéristique allongée, vont se développer jusqu'à atteindre les tissus vasculaires de la plante hôte (tissus phloémiens) (Stephens, 1912; Olivier *et al.*, 1991). La connexion du parasite au réseau vasculaire de l'hôte (**Figure 8**) est ensuite permise par la mise en place d'un continuum symplasmique par des plasmodesmes interspécifiques entre le parasite et l'hôte, permettant la diffusion des nutriments (Hood *et al.*, 1998; Hibberd and Dieter Jeschke, 2001). Le parasite agit ainsi comme un organe puits en détournant les phytohormones et les photoassimilats de la plante hôte tels que l'auxine et le saccharose (Péron *et al.*, 2011). Ces nutriments vont ainsi transiter par l'intermédiaire de l'haustorium et s'accumuler dans un organe de réserve correspondant à un tubercule différencié. Ce dernier agit alors comme un puits surnuméraire de l'hôte en accumulant principalement des hexoses, des acides aminés solubles (asparagine, aspartate) et de l'amidon (Abbes *et al.*, 2009).



**Figure 9. Apparition de l'haustorium chez les orobanches (d'après Westwood *et al.*, 2010).**

Le passage du caractère autotrophe au caractère parasitaire est représenté ici par l'acquisition d'un haustorium latéral se formant sur les racines secondaires et qui se retrouve sur les racines secondaires d'hémiparasite facultative comme *T. versicolor*. Le second évènement correspond au passage d'une hémiparasite facultative à une hémiparasite obligatoire comme *S. hermonthica* se traduisant par la formation d'haustorium terminal à l'apex des racicules de graines germées. Et enfin le dernier élément concerne le passage d'une hémiparasite obligatoire à une holoparasite obligatoire comme *P. aegyptiaca* qui a perdu la capacité à réaliser la photosynthèse (d'après Westwood *et al.*, 2010).

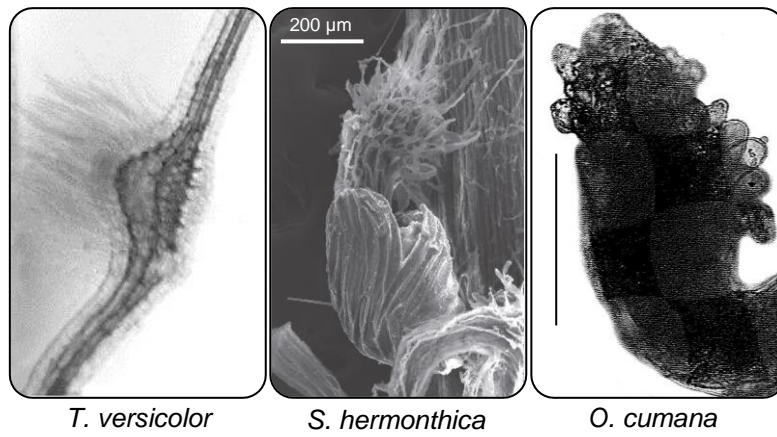
Des transporteurs de saccharose de type SUT (Sucrose Transporters), des invertases et des saccharoses synthétases (SuSy), sont impliqués dans la relocalisation de ces photoassimilats de l'hôte vers le tubercule (Péron, 2010). De nombreuses racines adventives non fonctionnelles se développent ensuite à la surface du tubercule pour donner naissance au phénotype caractéristique « spider » (Péron *et al.*, 2011). Après plusieurs semaines de développement du tubercule, des tiges achlorophylliennes se développent et forment des hampes qui émergent du sol. Celles-ci prennent la forme d'épi florifère ramifié et se déploient jusqu'à 30 cm de hauteur avant de développer des fleurs bleues violacées (**Figure 2.L**). Chaque plant d'orobanche rameuse est alors capable de produire plusieurs centaines de milliers de graines favorisées par une très petite taille (environ 200 µm) et dont la persistance dans le sol peut atteindre 20 ans (Gibot-Leclerc *et al.*, 2006; Joel *et al.*, 2007).

Le cycle de vie de *P. ramosa* est ainsi hautement coordonné avec sa plante hôte, ce qui rend difficile la gestion de cette espèce au champ (Westwood *et al.*, 2010).

### **C. Méthodes de lutte**

Le contrôle des orobanches (dont *P. ramosa* et *O. cumana*) et des pertes de rendements qu'elles occasionnent dans de nombreux pays de l'Europe de l'Ouest est particulièrement difficile de par leur taux de reproduction très élevé avec la libération de milliers de graines par plante favorisant leur expansion, si bien que pour le moment aucune méthode de lutte n'est disponible contre ces bioagresseurs.

A ce jour, la gestion de ces parasites intègre majoritairement des pratiques culturales telles que celles mises en place en France avec notamment des rotations de culture incluant des espèces non-hôtes, des cultures associées, ou des changements temporels de semis. De même, un contrôle par des herbicides peut être employé mais les traitements chimiques sont difficiles à mettre en place et s'avèrent généralement ne pas être assez sélectifs envers le parasite (Pérez-De-Luque *et al.*, 2009). Enfin, il existe également des stratégies génétiques basées sur la sélection classique et la production de variétés d'hôtes tolérantes ou résistantes au parasite. Des variétés tolérantes de colza et résistantes de tournesol ont ainsi pu être proposées avec notamment l'introgession de gènes de résistances spécifiques, mais ces dernières ne permettent toutefois pas d'enrayer l'expansion de ces bioagresseurs, et favorisent même l'émergence de nouvelles races plus agressives dans les régions fortement impactées. C'est le cas d'*O. cumana* avec le Tournesol dont le grand nombre de graines d'orobanche offre une grande variabilité génétique et a conduit à la sélection de races virulentes qui ont surmonté la résistance du Tournesol (Pérez-De-Luque *et al.*, 2009). Il est donc urgent d'identifier de nouvelles cibles moléculaires chez l'orobanche pour la sélection de nouvelles variétés de plantes hôtes à résistance durable.



**Figure 10. Haustorium latéral et terminal.**

Haustorium latéral de la plante hémiparasite *T. versicolor* (Yoder, 1999). Haustorium terminal de l'hémiparasite *S. hermonthica* (Yoshida *et al.*, 2016) et de l'holoparasite *O. cumana*, barre d'échelle = 0,2 mm (Joel and Losner-Goshen, 1994).

Quelle que soit l'origine taxonomique des plantes parasites, l'haustorium est une caractéristique commune qui apparait comme l'élément clé de la relation parasitaire. Aussi, la compréhension des différentes étapes de l'haustoriogenèse est cruciale pour envisager des méthodes de lutttes durables en agissant sur cette phase clé du développement parasitaire.

## II. L'organe clé du parasitisme : l'haustorium

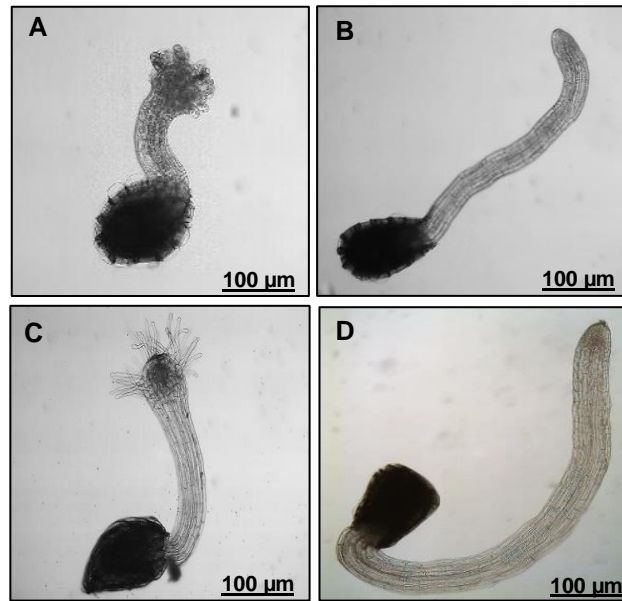
### 1. Caractéristiques de l'haustorium

#### A. Evolution de l'organe parasitaire

Au cours de l'évolution des orobanches, c'est la formation de l'haustorium qui est considérée comme l'évènement évolutif majeur du parasitisme (**Figure 9**). En effet, cet organe est associé à la transition de l'autotrophie vers l'hétérotrophie en permettant à la plante parasite d'accéder aux nutriments de la plante hôte. Notamment, il apparait que la structure et la localisation de l'haustorium diffère selon le degré de dépendance de la plante parasite pour sa plante hôte. L'haustorium serait donc le fruit d'une évolution qui se serait déroulée de manière indépendante 12 fois au sein des Angiospermes (Westwood *et al.*, 2010). Cela permet notamment de distinguer deux types d'haustorium chez les *Orobanchaceae* : l'haustorium latéral et l'haustorium terminal (**Figure 10** ; Kuijt, 1977). Le premier, le plus ancestral également appelé haustorium secondaire, est présent chez l'ensemble des plantes hémiparasites facultatives telles que *Triphysaria versicolor* ou *Phtheirospermum japonicum* et quelques parasites obligatoires comme la cuscute. Il se caractérise par l'émergence d'extensions latérales au niveau de la zone d'élongation des racines secondaires ou des tiges en formant de multiples haustoria (Kokla and Melnyk, 2018). A maturation, l'haustorium latéral permet la formation de ponts xylémiens entre l'hôte et le parasite pour le prélèvement d'eau et de nutriments (Yoshida and Shirasu, 2012). Le second ou haustorium primaire, considéré comme le stade de développement le plus avancé, est observé uniquement chez les parasites obligatoires comme *P. ramosa* ou *S. hermonthica* en se formant juste après l'étape de germination des graines (Westwood *et al.*, 2010). Un unique haustorium terminal est alors initié à l'apex de la radicule, stoppant ainsi sa croissance et permettra en supplément de se connecter au système phloémien de la plante hôte pour les holoparasites tel que *P. ramosa* (Joel *et al.*, 2013).

#### B. Les structures haustoriales précoces

Dans chacun des cas, les haustoria sont des organes multicellulaires et hémisphériques qui apparaissent sous forme de structures arrondies et gonflées attachées à la surface de l'hôte (Estabrook and Yoder, 1998; Hood *et al.*, 1998; Kokla and Melnyk, 2018).



**Figure 11. Structures haustoriales précoces chez *Phelipanche ramosa* et *Striga hermonthica*.**

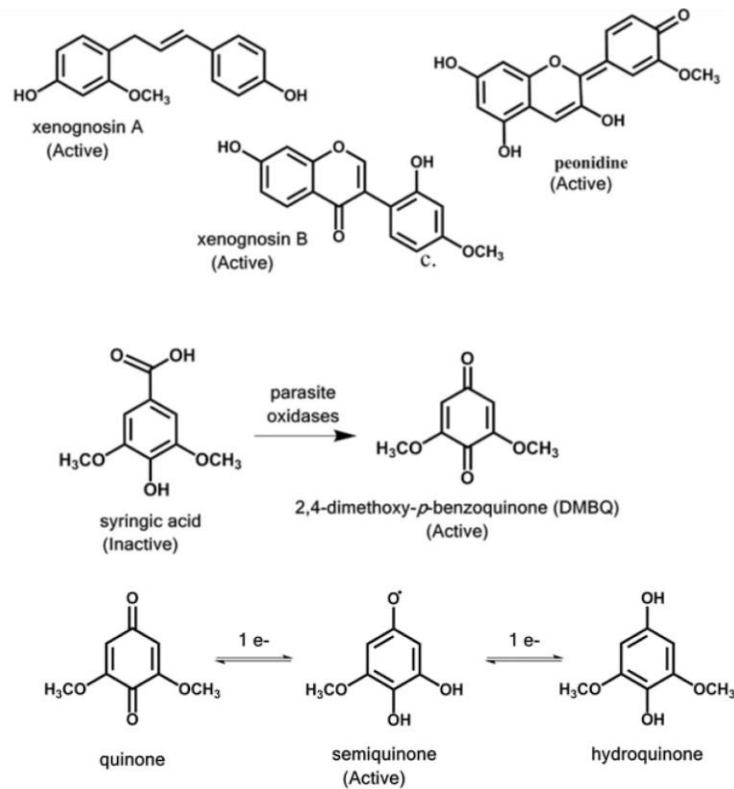
**A.** Formation de papilles chez *P. ramosa* après un traitement *c/tZ* ( $10^{-7}$  M) sur une graine pré-germée. **B.** Graine germée de *P. ramosa* sans haustorium. **C.** Développement de poils haustoriaux chez *S. hermonthica* après un traitement *c/tZ* ( $10^{-7}$  M) sur une graine pré-germée. **D.** Graine germée de *S. hermonthica* sans haustorium. Les observations ont été réalisées à la loupe optique.

Le développement de l'haustorium débute par l'initiation de structures haustoriales précoces ou EHS (Early Haustorial Structures ; Goyet *et al.*, 2017). Tout d'abord survient un arrêt de l'élongation de la racine ou de la radicule accompagné d'une expansion cellulaire radiale des cellules situées dans le tissu sous-jacent de l'extrémité radiculaire. Puis, ces cellules épidermiques vont croître jusqu'à former un renflement pendant que les cellules corticales supérieures se différencient et se spécialisent dans la pénétration des tissus de la plante hôte (Hood *et al.*, 1998; Kokla and Melnyk, 2018). Chez les hémiparasites, ces cellules épidermiques s'allongent pour donner des poils haustoriaux (**Figure 11.C**) tandis que chez les holoparasites (*Orobanche* et *Phelipanche*) elles prennent la forme de structures plus courtes appelées papilles sécrétrices (**Figure 11.A** ; Ishida *et al.*, 2011). Ce processus de développement précoce s'avère différent entre les plantes parasites obligatoires et facultatives. En effet, chez les plantes hémiparasites facultatives, l'extrémité de la racine est capable de reprendre sa croissance après environ 12 heures d'arrêt de l'élongation. Il sera ainsi possible de former plusieurs haustoria latéraux successifs. Au contraire pour les genres *Striga* et *Orobanche*, la formation d'EHS est un processus irréversible aboutissant à un haustorium unique et terminal et ce n'est que lorsque celui-ci envahit une plante hôte que des haustoria secondaires peuvent se former à partir de racines latérales (Tomilov *et al.*, 2005).

L'haustorium dérive ainsi de l'expansion des cellules rhizodermiques périphériques et en cela ressemblent aux poils absorbants et aux trichomes des plantes non parasites qui sont également issus de l'accroissement d'une seule cellule épidermique (Chang and Lynn, 1986; Mendoza and Alvarez-Buylla, 2000; Joel *et al.*, 2013; Goyet *et al.*, 2017). Ainsi, la morphologie des poils haustoriaux est particulièrement similaire à celle des poils absorbants des plantes autotrophes. Ces derniers, tout comme les poils haustoriaux des plantes parasites, se développent dans la zone de différenciation de la racine en formant des excroissances tubulaires à partir des cellules épidermiques (Mendoza and Alvarez-Buylla, 2000; Cui *et al.*, 2016). Ainsi la similitude entre les EHS des plantes parasites et les poils absorbants et les trichomes spécialisés des plantes autotrophes suggère que des mécanismes de régulation similaires seraient impliqués lors de la formation de ces organes (Cui *et al.*, 2016; Wada *et al.*, 2019).

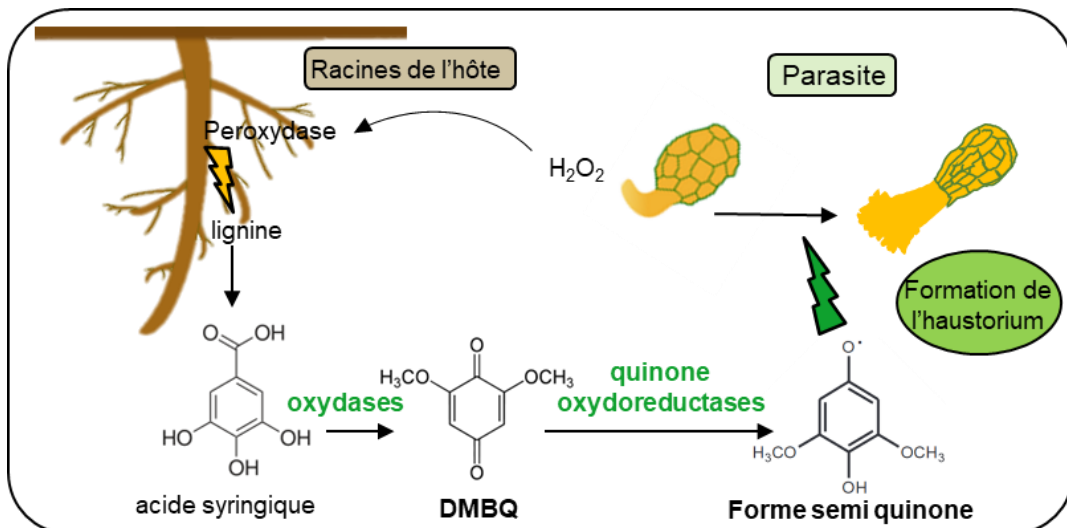
## 2. Les molécules inductrices de l'haustorium (HIF)

Alors que la morphologie de l'haustorium a été bien décrite au cours de différentes études, les connaissances en ce qui concerne les événements moléculaires inhérents au développement des EHS chez les holoparasites sont encore parcellaires (Ishida *et al.*, 2011). Des études menées chez les plantes hémiparasites (*Striga sp.*, *T. versicolor*) ont cependant



**Figure 12. Principaux HIF décrits chez les plantes hémiparasites (d'après Joel *et al.*, 2013).**

Structure des formes actives les xénognosines A et B et la péonidine, inductrices d'haustorium chez les hémiparasites. Le DMBQ issu de l'oxydation de l'acide syringique par les quinones réductases du parasite est la forme active. L'oxydoréduction de la quinone permet de former des intermédiaires actifs comme la semiquinone



**Figure 13. Mécanisme d'induction de l'haustorium chez les hémiparasites de racines.**

Les graines pré-germées de la plante parasite produisent du peroxyde d'hydrogène. Ce composé oxydatif déclenche l'action de peroxydases de la plante hôte qui dégradent la lignine et induisent la libération d'acide syringique. Celui-ci est converti en DMBQ après l'intervention d'oxydases du parasite. Le DMBQ est perçu par le parasite après une étape de réduction faisant intervenir les quinones réductases QR1 et QR2 du parasite et conduisant à la formation d'EHS chez la plante parasite.

montré que les premières étapes de la formation des EHS sont déclenchées par des molécules inductrices (HIF, Haustorium Inducing Factor), présentes au voisinage du système racinaire de l'hôte (Tomilov *et al.*, 2005).

### A. Les composés phénoliques

Les HIF décrits jusqu'alors appartiennent principalement à la famille des composés phénoliques et ont pu être identifiés à travers le fractionnement biochimique des extraits de plante hôte (**Figure 12**). Ainsi, la première caractérisation de molécules inductrices d'haustoria a été initiée avec la découverte de flavonoïdes, les xenognosins A et B, séparées à partir d'extraits foliaires de la légumineuse *Astragalus gummifer*. En plus de fournir l'origine du terme « xenognosin » désignant un signal de reconnaissance de l'hôte, elles ont permis de révéler pour la première fois l'implication de phénols spécifiques dans l'induction haustoriale (Lynn *et al.*, 1981; Steffens *et al.*, 1982). C'est ainsi que des travaux ultérieurs portant sur *T. versicolor* ont mis en évidence l'activité haustoriogène d'un autre flavonoïde de la famille des anthocyanidines, la péondine, qui fut identifiée dans les sécrétions de grains de maïs (Albrecht *et al.*, 1999). Par la suite, des études de l'induction haustoriale chez *S. asiatica* ont déterminé l'implication de polyphénols issus de la paroi cellulaire de l'hôte dans l'haustoriogénèse, en particulier avec la découverte de quinones spécifiques libérées par oxydation de la lignine de la paroi des cellules de l'hôte (Keyes *et al.*, 2000). C'est le cas du 2,6 dimethoxy-1,4-benzoquinone (DMBQ), qui fut le seul composé directement isolé et identifié suite à l'abrasion des racines de sorgho ou après une co-incubation des racines avec *S. asiatica* (Chang and Lynn, 1986). Ce composé est ainsi capable d'induire des EHS chez les hémiparasites *Striga*, *Phtheirospermum*, *Triphysaria* et *Agalinis sp* (Cui *et al.*, 2018b). La libération du DMBQ est provoquée par celle de peroxyde d'hydrogène par la plante parasite. Ce composé oxydatif déclenche alors l'action de peroxydases de la plante hôte qui dégradent la lignine et libèrent ainsi plusieurs composés phénoliques incluant l'acide syringique, le précurseur du DMBQ. C'est l'oxydation de l'acide syringique par des oxydases provenant du parasite qui permet la formation du DMBQ. Ce dernier est ensuite perçu par le parasite après une dernière étape de réduction faisant intervenir les quinones réductases QR1 et QR2 provenant du parasite et déclenchant la formation des EHS (**Figure 13** ; Bandaranayake *et al.*, 2010). Ce mécanisme d'haustoriogénèse s'appuie donc sur un modèle de réactions d'oxydoréduction dans lequel plusieurs intermédiaires sont capables d'initier la formation des EHS (Bandaranayake *et al.*, 2010). C'est notamment le potentiel d'oxydoréduction des quinones qui conditionne leur capacité à induire des haustoria, en nécessitant un pouvoir oxydant important situé autour de 300 mV (Estabrook and Yoder, 1998; Wada *et al.*, 2019). Si de nombreux composés phénoliques simples ont pu être identifiés comme des HIFs incluant l'acide syringique ou l'acide vanillique, ceux-ci présentent des activités inégales.

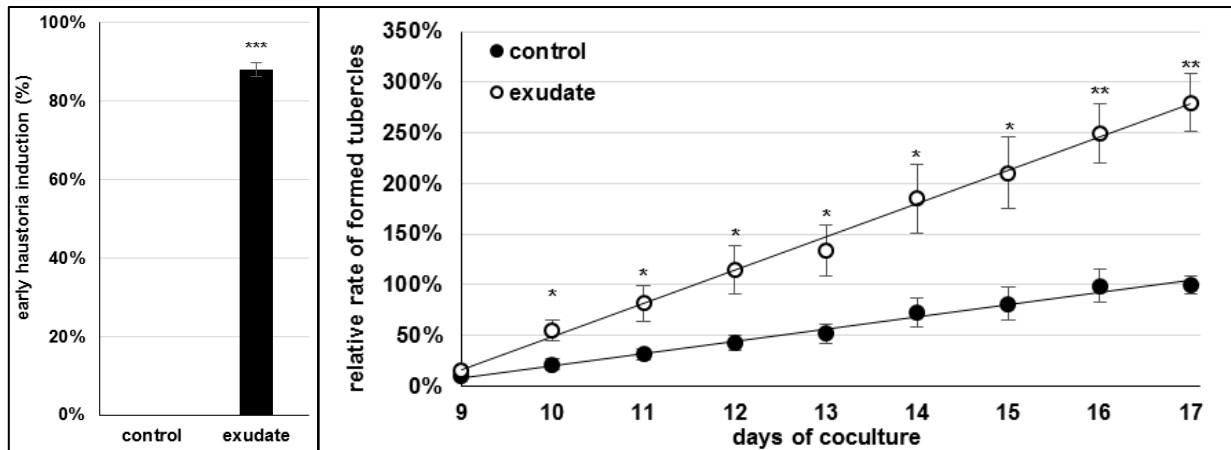


Par exemple l'initiation d'EHS en réponse à l'acide syringique nécessite un temps d'exposition plus long (environ 2 jours) et des concentrations plus élevées (50  $\mu\text{M}$ ) comparé au DMBQ (6 à 10 heures d'exposition au DMBQ à 1  $\mu\text{M}$  sont suffisantes) (Kim *et al.*, 1998; Albrecht *et al.*, 1999; Bandaranayake *et al.*, 2010). L'activité haustoriogène dépendra donc ici de l'oxydation enzymatique de l'acide syringique en DMBQ, le composé actif (Bandaranayake *et al.*, 2010). Malgré son efficacité démontrée chez de nombreuses plantes hémiparasites, le DMBQ ne peut toutefois pas être considéré comme un HIF universel puisqu'il ne permet notamment pas la formation d'haustorium chez les holoparasites *P. ramosa*, *P. aegyptiaca* ou *O. cumana* (Joel *et al.*, 2013; Yoshida *et al.*, 2016).

### **B. Les hormones végétales**

Outre les composés phénoliques, d'autres études ont mis en évidence le rôle des régulateurs de croissance dans l'interaction entre la plante parasite et sa plante hôte. Il est désormais établi que la formation des stades précoces de l'haustorium chez les hémiparasites requiert une régulation phytohormonale comprenant notamment l'action de l'auxine, l'éthylène (ET), ou les cytokinines (CK) (Lechowski and Bialczyk, 1996; Wrobel and Yoder, 2001; Jiang *et al.*, 2004, 2005; Tomilov *et al.*, 2005; Ranjan *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015; Ishida *et al.*, 2016; Goyet *et al.*, 2017, 2019).

L'auxine et de l'éthylène s'accumulent à l'apex racinaire du parasite *T. versicolor* et participent ainsi à l'organogenèse de l'haustorium précoce selon des mécanismes similaires à ceux observés chez les plantes autotrophes dans le cas de la régulation du développement des poils absorbants (Tomilov *et al.*, 2005). Des analyses transcriptomiques sur l'ensemble des stades de la formation de l'haustorium des espèces hémiparasitaires *Santalum album* et *P. japonicum* ont révélé une implication hormonale notamment au travers de l'expression de gènes de transport polaire de l'auxine, mais également de gènes de biosynthèse des gibbérellines (GA) ou des CK (Zhang *et al.*, 2015; Ishida *et al.*, 2016). En effet, si le ratio auxine / cytokinine est connu comme étant un élément régulateur de la morphogénèse végétale (et notamment racinaire) et du développement des nodules symbiotiques chez les légumineuses, il a également été montré que l'action de ces phytohormones conduisait à l'haustoriogenèse chez les hémiparasites (Tomilov *et al.*, 2005; Ishida *et al.*, 2016). Plus particulièrement, il a été observé que l'inhibition de l'activité de l'auxine conduisait à une diminution du nombre d'haustoria chez *T. versicolor*, tandis qu'une application exogène de cette hormone permettait d'augmenter la formation de ces structures haustoriales (Tomilov *et al.*, 2004, 2005). Par ailleurs Ishida *et al.* (2016), ont démontré que le gène *YUC3* codant pour une YUCCA (YUC, flavine monooxygénase) impliquée dans la biosynthèse de l'auxine, avait un rôle prépondérant dans l'haustoriogenèse de *P. japonicum*, démontrant l'implication de cette hormone dans ce



**Figure 14. Induction de structures haustoriales précoces (EHS) par les extraits de *B. napus* responsables de l'agressivité chez *P. ramosa* (d'après Goyet *et al.*, 2017).**

**A.** Les extraits rhizosphériques de *B. napus* induisent la formation d'EHS à l'apex des racines des graines germées de *P. ramosa*. **B.** Un pré-traitement aux extraits rhizosphériques de *B. napus* augmente l'agressivité des graines de *P. ramosa* à travers un taux relatif de tubercules formés supérieur au contrôle (HEPES 0,5 mM, PPM 0,05% p/v). Les moyennes  $\pm$  ES ( $n=6$ ) annotées avec des astérisques sont significativement différentes du contrôle ( $t$ -test, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  et \*\*\* $p < 0,001$ ).

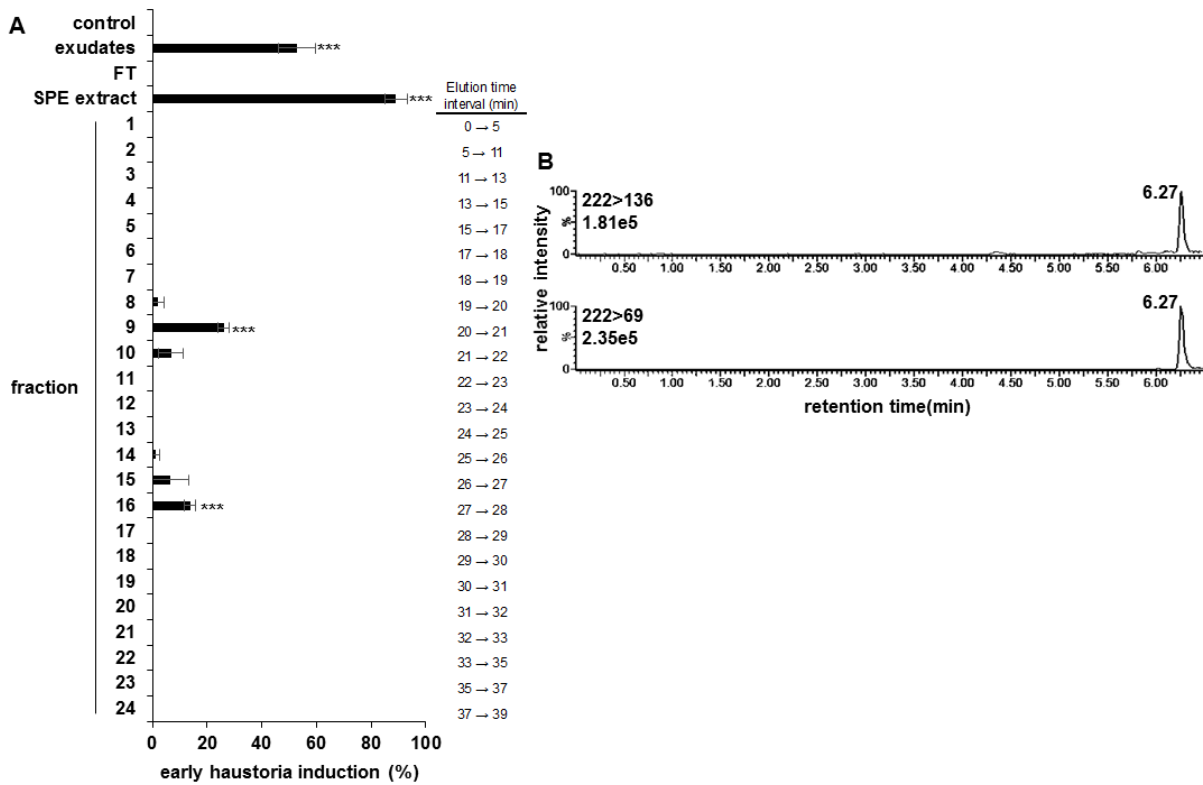
processus. Si l'auxine induit des haustoria chez les hémiparasites facultatifs *T. versicolor* ou *P. japonicum*, il a par contre été montré que cette hormone n'avait pas d'effet sur l'induction haustoriale des parasites obligatoires *S. asiatica* et *P. ramosa* (Keyes *et al.*, 2000; Goyet *et al.*, 2017). En revanche, un traitement par des CK exogènes permet d'induire des modifications structurelles de la racine à la fois chez *S. asiatica* et chez *T. versicolor*. Ces modifications qui prennent la forme d'un gonflement de l'apex et la formation de poils haustoriaux, suggèrent que cette hormone participe également à l'induction d'EHS (Keyes *et al.*, 2000; Wrobel and Yoder, 2001). Néanmoins, il a été avancé que les structures induites par les CK arboreraient un phénotype différent de celui observé après traitement au DMBQ, avec notamment des poils haustoriaux plus longs et parfois délocalisés, ainsi qu'un gonflement de la racine moins prononcé (Tomilov *et al.*, 2005).

### 3. L'induction haustoriale chez *P. ramosa*

La plupart des HIFs efficaces chez les hémiparasites sont ainsi apparentés aux composés phénoliques, incluant des flavonoïdes et des quinones. En revanche, il a été démontré que ces molécules n'avaient aucun effet sur la formation des EHS des espèces holoparasites comme *P. ramosa*, et par conséquent ne pouvaient pas être considérées comme des HIFs universels (Yoshida *et al.*, 2016; Goyet *et al.*, 2017). Il est donc fortement probable que la signalisation conduisant à l'induction haustoriale chez ces plantes résulte d'un mécanisme distinct de celui connu chez les plantes hémiparasites.

Jusqu'à récemment, l'induction des EHS chez les orobanches (*O. cumana* et *P. aegyptiaca*) était un phénomène observé *in vitro* uniquement de manière occasionnelle et en l'absence de plante hôte (Joel and Losner-Goshen, 1994). Néanmoins, en 2016, une étude publiée par Fernández-Aparicio *et al.* a démontré que la formation de l'haustorium chez les orobanches était également un phénomène inductible par des molécules exogènes. Ces travaux ont ainsi montré que deux phytotoxines fongiques, la sphaeropsidone et l'épi-sphaeropsidone issues de *Diplodia cupressi*, l'agent responsable du chancre du cyprès (*Cupressus sempervirens* L.), étaient capables d'induire des EHS chez *O. cumana* et *O. crenata*.

Les travaux de Goyet *et al.* (2017) ont démontré ensuite pour la première fois que le développement de structures haustoriales précoces chez *P. ramosa* était directement inductible par les extraits racinaires de sa plante hôte le colza (*B. napus*). Ces derniers contenaient des substances allélochimiques présentant une activité inductrice d'haustorium sur des graines germées de *P. ramosa* (**Figure 14.A**). De surcroît, il a été démontré qu'un pré-traitement des graines avec ces extraits augmentait l'agressivité du parasite envers la plante



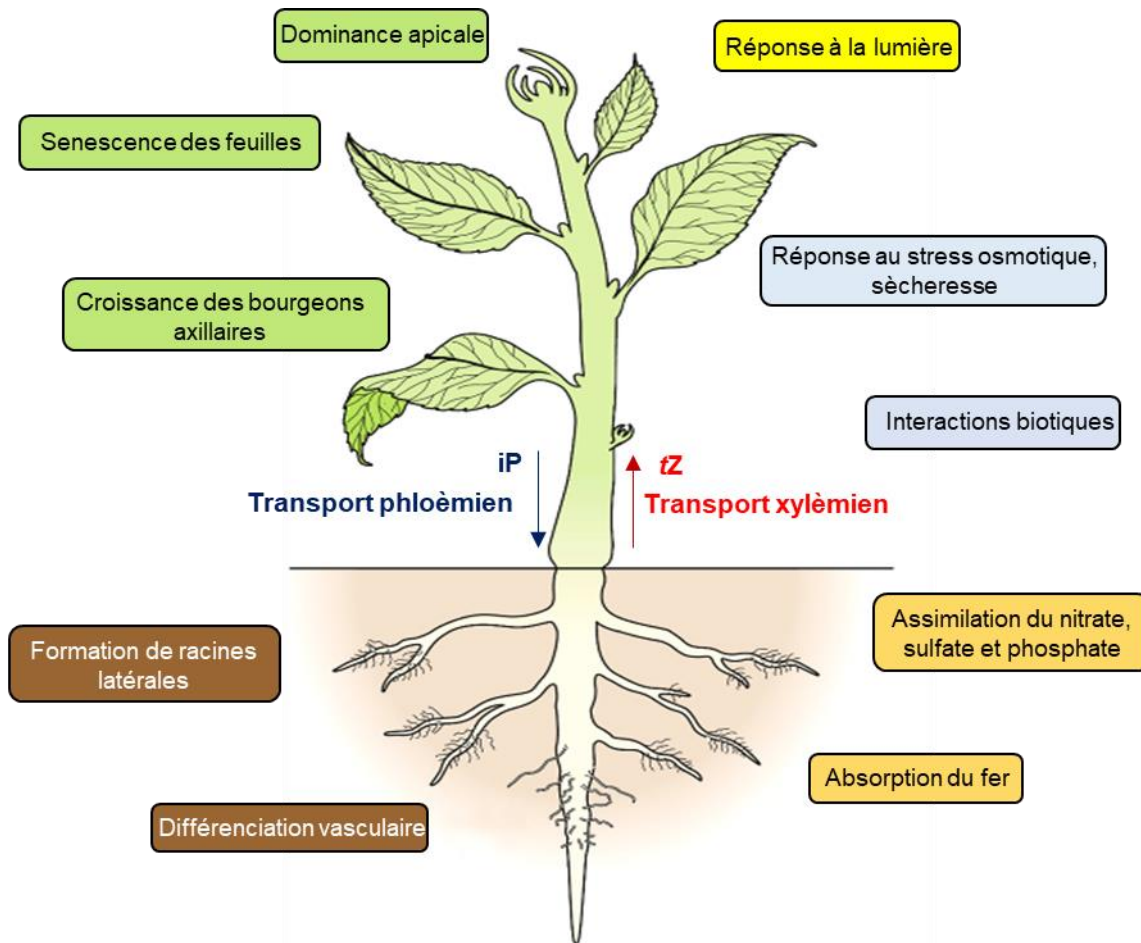
**Figure 15. Fractionnement des extraits de *B. napus* (d'après Goyet *et al.*, 2017).**

**A.** Profil d'activité haustoriogène des extraits après concentration de l'activité sur SPE inverse et fractionnement par HPLC. Les moyennes  $\pm$  ES ( $n=6$ ) annotées avec des astérisques sont significativement différentes du contrôle ( $t$ -test,  $***p < 0,001$ ). **B.** Analyse UPLC-ESI(+)-MS/MS de la fraction 9 correspondant à un signal caractéristique d'une cytokinine, la DHZ.

hôte en favorisant le nombre d'accrochages (**Figure 14.B**). De manière intéressante, une approche transcriptomique parallèlement réalisée au cours du développement haustorial précoce en réponse aux extraits racinaires de *B. napus* a souligné la présence de gènes différentiellement exprimés impliqués dans la signalisation hormonale. Dans le même temps, une stratégie de fractionnement bio-guidée par HPLC inverse des extraits racinaires de *B. napus*, a permis de révéler que l'activité inductrice d'haustorium était présente dans deux fractions (n° 9 et 16) (**Figure 15.A**). Une analyse UPLC-MS bioguidée de la fraction 9, de loin la plus active, a montré que l'acteur majoritaire de la formation des EHS chez *P. ramosa* appartenait à la famille des CK (**Figure 15.B**). Bien que le composé précisément impliqué n'ait pas été clairement identifié dans cette étude, il a été montré en parallèle que les CK étaient capables d'induire des structures haustoriales chez *P. ramosa*. Des essais biologiques utilisant un panel relativement exhaustif d'hormones exogènes ont révélé en effet que seules les CK étaient capables d'induire des EHS. De même, un pré-traitement des graines germées de *P. ramosa* avec la CK *cis-trans*-zéatine (*c/tZ*) induit une augmentation de l'agressivité de *P. ramosa*, comme observée avec les extraits bruts, alors qu'un traitement simultané avec un inhibiteur de la perception des CK, le 6-(2-hydroxy-3-méthylbenzylamino)-purine (PI-55) la diminue. Ces résultats mettent en lumière les CK en tant que molécules signales pour la formation des EHS de *P. ramosa*, tout en sachant que le fractionnement bioguidé des extraits racinaires du colza a révélé l'existence chez cette plante hôte d'un second signal haustorigène, de nature probablement différente d'une CK.

Ce récent travail constitue une avancée majeure dans la compréhension de la formation des EHS chez *P. ramosa*. Désormais, il est reconnu que les CK permettent non seulement la formation de structures semblables aux haustoria chez les hémiparasites *T. versicolor*, *P. japonicum* et *S. asiatica* mais aussi des haustoria chez l'holoparasite *P. ramosa* (Wrobel and Yoder, 2001; Keyes *et al.*, 2001; Goyet *et al.*, 2017). Cette réaction hormonale constituerait donc potentiellement un mécanisme d'haustorigenèse commun aux hémiparasites et aux holoparasites (Goyet *et al.*, 2019).

Les cytokinines représentent donc de sérieux candidats pour être les composés universels de l'induction haustoriale chez les plantes parasites. Aussi, la compréhension de ce mécanisme est un enjeu majeur pour appréhender l'étape clé de l'établissement de la plante parasite *P. ramosa* sur la plante hôte, et à terme, envisager des méthodes de lutte appropriées.



**Figure 16. Principaux rôles des cytokinines dans la plante (d'après Werner and Schmülling, 2009).**

Les CK participent pleinement à la régulation de la croissance de la plante à travers la germination, le développement des racines et des feuilles, la différenciation des méristèmes, la ramification, la senescence mais aussi la signalisation nutritionnelle. Elles sont également impliquées dans les réponses environnementales ou les interactions biotiques. Le transport actif des formes *tZ* s'effectue via le xylème (rouge) et le transport des formes *iP* via le phloème (bleu).

### III. Les cytokinines

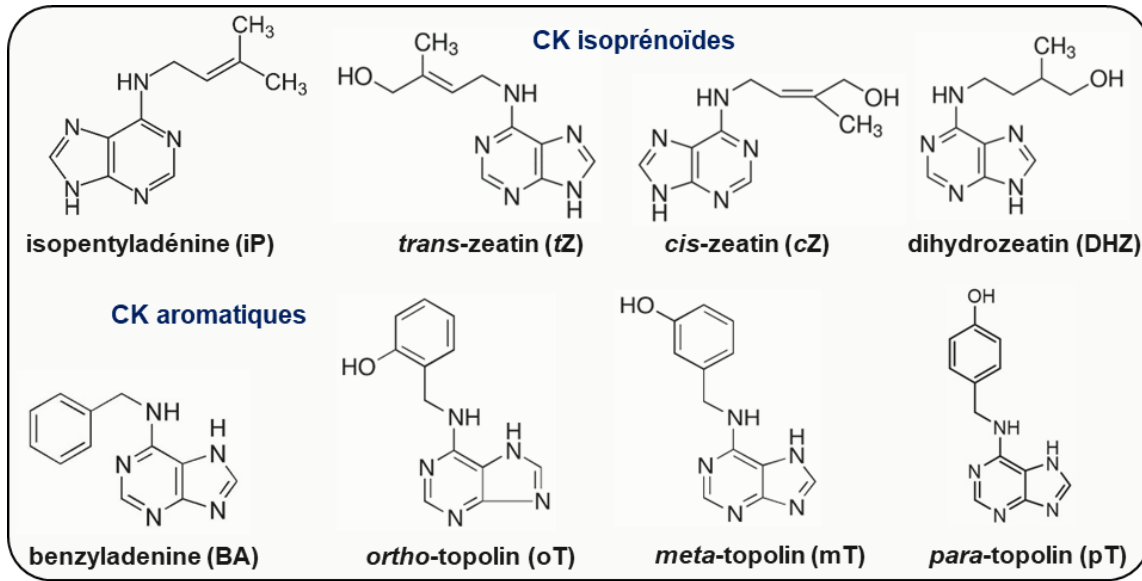
Les phytohormones telles que les cytokinines sont d'une importance capitale pour le bon fonctionnement des plantes en jouant un rôle crucial dans la régulation de processus physiologiques incluant le développement, la croissance, le transfert, la redistribution d'éléments nutritifs et les réponses aux stress biotiques et abiotiques (Cao *et al.*, 2016). Il apparaît désormais que les cytokinines jouent également un rôle dans la signalisation inter-plantes au niveau de la rhizosphère à travers la formation des EHS des plantes parasites.

#### 1. Rôles physiologiques et mode d'action

Découvertes dans les années 50 par Carlos Miller et Folke Skoog, les CK sont des hormones végétales mobiles originellement décrites comme des composés capables de promouvoir la division cellulaire (Skoog and Armstrong, 1970; Werner *et al.*, 2001; Argueso *et al.*, 2009; Sakakibara, 2010; Schaller *et al.*, 2014). En effet, leur nom dérive de la cytokinèse, un processus cellulaire conduisant à la séparation d'une cellule en deux et permettant donc une croissance continue des tissus (Miller *et al.*, 1956). Peu de temps après leur découverte, Miller et Skoog ont émis l'hypothèse du rôle concomitant des CK avec l'auxine dans la morphogenèse végétale, comme ayant une empreinte majeure sur la formation et la croissance des racines et des jeunes pousses (Werner *et al.*, 2001). Depuis, la multiplication d'études sur les rôles physiologiques des CK a permis de préciser leur implication dans divers processus développementaux et de réponses à l'environnement.

Les CK agissent au niveau cellulaire à de faibles concentrations de  $10^{-6}$  M à  $10^{-12}$  M, en contrôlant l'expression de nombreux gènes, le développement des chloroplastes et en stimulant la synthèse de métabolites secondaires (Brault and Maldiney, 1999; Romanov, 2002). Les CK participent ainsi à la régulation de la croissance des plantes en intervenant sur la germination, l'organogenèse des jeunes pousses, la différenciation des méristèmes, la ramification, la dominance apicale, mais aussi dans la senescence des feuilles et la signalisation nutritionnelle (**Figure 16** ; Sakakibara, 2006; Hirose *et al.*, 2007; Hart *et al.*, 2016).

La précision des rôles physiologiques des CK a été rendue possible par l'étude des conséquences de l'application exogène de celles-ci, ou de l'utilisation de plantes transgéniques présentant des teneurs endogènes plus importantes ou réduites en CK (Werner *et al.*, 2001; Aloni *et al.*, 2006). Ainsi, un changement des niveaux endogènes des CK entraîne une modification de l'architecture complète de la plante en affectant notamment sa croissance (Sakakibara, 2006; Hirose *et al.*, 2007; Stirk and Van Staden, 2010). Par exemple, des plantes transgéniques d'*Arabidopsis*, présentant une plus forte concentration en CK, produisent plus



**Figure 17. Structures des cytokinines naturelles.**

Les CK d'origine naturelle sont des dérivées d'adénine qui possèdent une chaîne latérale isoprénoïde ou aromatique en position N<sup>6</sup>. Les quatre isoformes naturelles des CK isoprénoïdes sont représentées (iP, tZ, cZ, DHZ) ainsi que les CK aromatiques les plus répandues chez les plantes (BA, oT, mT et pT).

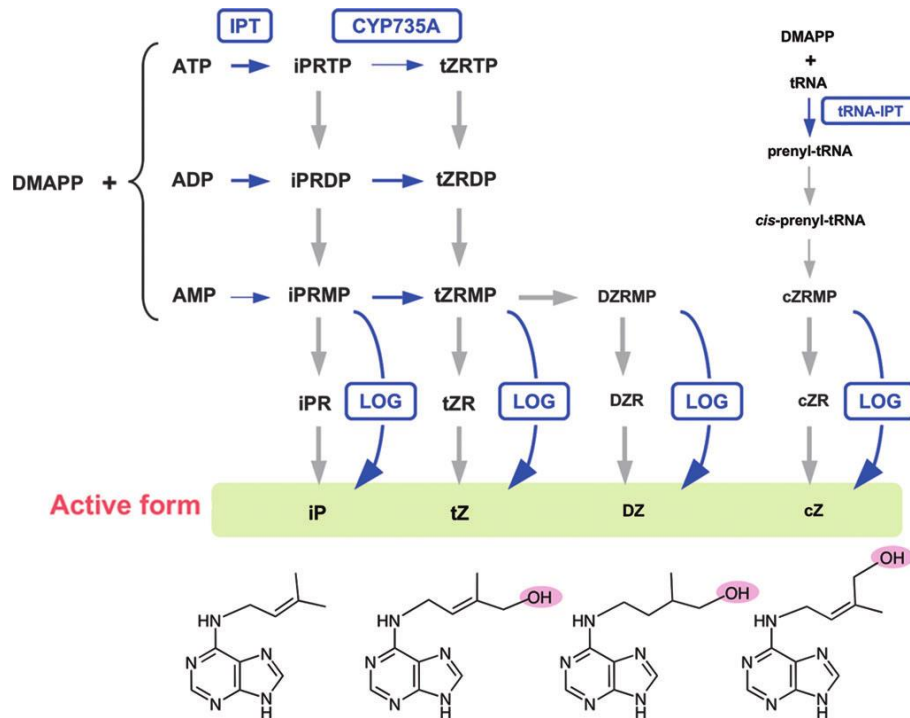
de cellules au niveau des feuilles en comparaison avec une plante témoin (Werner *et al.*, 2001). *A contrario*, chez des plantes transgéniques déficientes en CK, les racines latérales se forment davantage à proximité d'un méristème racinaire apical élargi et le nombre de ramifications des racines est plus important (Aloni *et al.*, 2006). Ces observations soulignent une des fonctions majeures des CK en tant que régulateur positif des méristèmes apicaux à travers la stimulation de la division cellulaire et à l'inverse, un régulateur négatif de la croissance des racines en promouvant la différenciation cellulaire (Schaller *et al.*, 2014).

Le rôle des CK dans la croissance des racines et des jeunes pousses est connu pour être étroitement lié avec celui de l'auxine (Saini *et al.*, 2013). En effet, celles-ci ont des rôles antagonistes concernant le développement des racines et la croissance apicale. Chez *A. thaliana*, il a été démontré que les CK favorisent la différenciation cellulaire en réprimant à la fois le transport et la signalisation de l'auxine. Ainsi une application de CK à des concentrations physiologiques conduit à l'inhibition de la formation de racines latérales et adventives qui sont à l'inverse favorisées par l'action de l'auxine (Aloni *et al.*, 2006). C'est donc la coordination de ces deux hormones qui permet de réguler la croissance des racines en assurant à la fois un maintien de la division et de la différenciation des cellules méristématiques (Saini *et al.*, 2013).

Les CK interviennent donc parmi divers processus physiologiques dans la plante et en particulier de manière continue sur la prolifération cellulaire. Cette dernière est essentielle pour permettre la régénération de la plante et participe aussi à son acclimatation face aux changements de l'environnement (Aloni *et al.*, 2006). Aussi, la croissance optimale des plantes va dépendre notamment de la distribution spatiale et temporelle de la coordination entre la biosynthèse des CK et leur catabolisme (Pacifici *et al.*, 2015).

## 2. Caractéristiques structurales et biosynthèse

C'est la kinétine (6-furfuryl aminopurine) qui fut la première substance à avoir été identifiée comme une CK en stimulant la prolifération de cellules *in vitro* de la moelle de tabac (Kang *et al.*, 2017). Cependant, ce composé n'est pas produit naturellement et aucune trace n'a été retrouvée chez les plantes. La première CK naturelle fut purifiée au début des années 1960, isolée à partir de l'endosperme de maïs et identifiée comme la *trans*-zeatine (*tZ*) (Sakakibara, 2010). Puis plusieurs composés présentant une activité « CK » permettant la division cellulaire ont pu être identifiés à partir de plusieurs espèces de plantes (Mok and Mok, 2001). La structure commune de ces composés a permis de définir pratiquement l'ensemble des CK naturelles comme étant des dérivés d'adénine substitués en position N<sup>6</sup> de leur chaîne latérale. C'est ainsi que les CK sont généralement classées en fonction de la configuration de leur chaîne latérale constituée soit par une chaîne dérivée de l'isoprène (CK isoprénoïdes),



**Figure 18. Principales voies de biosynthèse des cytokinines (Hirose et al., 2007).**

La voie de biosynthèse des CK isoprénoïdes fait intervenir ici le groupement isoprène le diméthylallyl diphosphate (DMAPP) auquel est ajouté une base adénosine phosphorylée (ATP, ADP, ou AMP) par des enzymes IPT (adenosine phosphate-isopentenyltransférases). Cette étape enzymatique conduit à la formation de l'isopentenyladenine riboside 5'-triphosphate (iPRTP), l'iP riboside 5'-diphosphate (iPRDP), l'iP riboside monophosphate (iPRMP). Ces composés peuvent être hydroxylés par deux enzymes monooxygénases du cytochrome P450 (CYP735A1 et CYP735A2) permettant la production des isoformes tZRTP, tZRDP, et tZRMP. Les CK sont transformées en formes actives iP et tZ par une réaction faisant intervenir la LONELY GUY (LOG). Une seconde voie de biosynthèse utilise des adénines prénylées issues de la dégradation des ARN de transfert (ARNt) par une ARNt-isopentenyltransférase (tRNA-IPT), en tant que précurseurs pour la synthèse de cZ.

soit par une chaîne aromatique (CK aromatiques) (Tarkowski *et al.*, 2009; Sakakibara, 2010; Svačinová *et al.*, 2012).

Les CK isoprénoïdes sont naturellement présentes sous quatre isoformes : l'isopentyladénine (iP), la *trans*-zéatine (*tZ*), la *cis*-zéatine (*cZ*) et la déhydrozéatine (DHZ) (**Figure 17**). Chez *Arabidopsis*, les formes les plus abondantes sont l'iP et la *tZ* (Sakakibara, 2006). Les CK aromatiques ont quant à elles un cercle benzyle attaché en position N<sup>6</sup> de la chaîne terminale adénine (**Figure 17**). La première forme aromatique à avoir été mise en évidence dans les feuilles de peuplier (*Populus alba* L.) est l'*O*-hydroxy(benzyladénine). Puis les topolines (*meta*-, *ortho*- et *para*-topoline) ont pu être identifiées (Stirk and Van Staden, 2010). De manière générale, ces composés sont plus rares que les CK isoprénoïdes et il y a peu de connaissances à leur sujet. D'autres dérivés synthétiques sont également connus pour avoir une activité CK comme les espèces de type phénylurée, sans pour autant avoir la preuve qu'ils sont présents dans les tissus végétaux. C'est le cas du diphenylurea (DPU), du *N*-phényl-*N'*-(2-chloro-4-pyridyl)urea (DPPU), ou du thiazuron (TDZ) qui sont des composés synthétiques stables et très actifs dans les biotests (Spíchal *et al.*, 2004).

En plus des bases libres, les CK isoprénoïdes et aromatiques possèdent une correspondance pour les nucléosides, les nucléotides ou les glycosides, indiquant la présence d'une voie métabolique pour la conversion de celles-ci (Sakakibara, 2006; Hirose *et al.*, 2007).

Depuis la découverte des CK et de leur rôle dans la prolifération cellulaire, il a longtemps été proposé que les tissus avec une haute activité méristématique comme les racines ou les bourgeons, étaient des lieux potentiels de biosynthèse des CK. Il s'avère toutefois que l'ensemble des tissus sont capables de synthétiser ces composés avec pour lieu de prédominance l'apex des racines dans la zone d'élongation au-dessus du méristème (Stirk and Van Staden, 2010; Muraro *et al.*, 2011). Les CK sont ainsi principalement synthétisées dans les racines des plantes avant d'être transportées dans les parties foliaires où s'accumulent les plus fortes concentrations en CK.

La voie de biosynthèse des quatre isoformes naturelles des CK fait intervenir l'ajout d'un groupement isoprène du diméthylallyl diphosphate (DMAPP) ou de l'hydroxyméthylbutényl diphosphate (HMBDP), à l'extrémité N<sup>6</sup>-terminale d'une base adénosine phosphorylée (ATP, ADP, ou AMP). Le DMAPP et le HMBDP sont tous deux des intermédiaires métaboliques qui proviennent respectivement des voies du mévalonate (MVA) et du méthylérythritol phosphate (MEP) pour le premier, et uniquement de la voie MEP pour le second. Lorsque le DMAPP est utilisé comme substrat pour l'ajout d'une base adénosine phosphorylée, il résulte en la production des isoformes iP, tandis que l'ajout à un groupement HMBDP conduit à la synthèse de formes zéatine (**Figure 18** ; Sakakibara, 2006).



Ces réactions sont catalysées par des enzymes IPT (adenosine phosphate-isopentenyl transferases). Il existe 7 gènes *IPT* impliqués dans la biosynthèse de CK chez *Arabidopsis* (*AtIPT1* et de *AtIPT3* à *AtIPT8*). Ceux-ci utilisent préférentiellement l'ADP ou l'ATP plutôt que l'AMP avec le DMAPP, produisant ainsi des isopentenyl ribosides 5'-diphosphate (iPRDP) ou l'isopentenyl riboside 5'-triphosphate (iPRTP) qui sont les produits initiaux majoritairement formés chez les plantes supérieures, ou de l'isopentényladenine riboside monophosphate (iPRMP) (Sakakibara, 2006; Hirose *et al.*, 2007). Ces isoformes iP sont par la suite hydroxylées par deux enzymes cytochromes P450 monooxygénases (CYP735A1 et CYP735A2) permettant la production des isoformes tZRDP, tZRTP et tZRMP (Sørensen *et al.*, 2018). Les nucléotides iP et tZ sont alors transformés en formes actives iP et tZ par déphosphorylation et déribosylation.

Les nucléobases iP et tZ peuvent également être formées de manière directe par l'intermédiaire des enzymes cytokinines-phosphoribohydrolases ou « LONELY GUY » (LOG). Celles-ci hydrolysent le groupement riboside de l'adénine des isoformes nucléotidiques correspondant pour former l'iP (groupement DMAPP) ou la tZ (groupement HMBPP) (Kuroha *et al.*, 2009; Schäfer *et al.*, 2015). Ces enzymes ont été découvertes lors de l'analyse de mutants *log* du riz (*Oryza sativa*) déficients dans la maintenance du méristème des jeunes pousses (Kuroha *et al.*, 2009). Désormais, il a pu être identifié chez *Arabidopsis* neuf gènes codants pour les LOG (LOG1 à LOG9) ainsi que sept protéines correspondantes avec activité phosphoribohydrolase (LOG1 à LOG5, LOG7 et LOG8) (Tokunaga *et al.*, 2012).

Une seconde voie de biosynthèse utilise des adénines prénylées issues de la dégradation des ARN de transfert (ARNt) par une ARNt-isopentenyltransférase (tRNA-IPT), en tant que précurseurs pour la synthèse de cZ. Ces composés formés peuvent être ensuite transformés en tZ (Mok and Mok, 2001; Sakakibara, 2006). Cette voie de biosynthèse ne semble pas majoritaire dans la mesure où, hormis dans le cas de la cZ, les ARNt ne contribuent pas à la synthèse de CK (Kieber and Schaller, 2014).

### 3. Transport

Après leur synthèse, les CK vont agir de manière locale ou être distribuées dans l'ensemble des compartiments de la plante vers leurs cellules cibles (Stirk and Van Staden, 2010). Cette relocalisation est possible soit par un transport à travers les éléments xylémiens ou phloémiens, ou par un transport sélectif. Le transport à longue distance des CK de leur lieu de synthèse majoritaire des racines vers les tiges s'effectue *via* le xylème principalement sous la forme tZR (*trans*-zeatine riboside) et par le phloème avec le type iP des tiges vers les racines



(Kieber and Schaller, 2014). Mais une remobilisation efficace des CK nécessite aussi l'action de transporteurs sélectifs à travers la membrane plasmique. Principalement, 3 types de transporteurs des CK ont été décrits : les purines perméases (PUP), les transporteurs de nucléosides (ENT, equilibrative nucleoside transporters) et la sous-famille G des transporteurs à ATP-binding cassette (ABCG) (Girke *et al.*, 2014; Durán-Medina *et al.*, 2017).

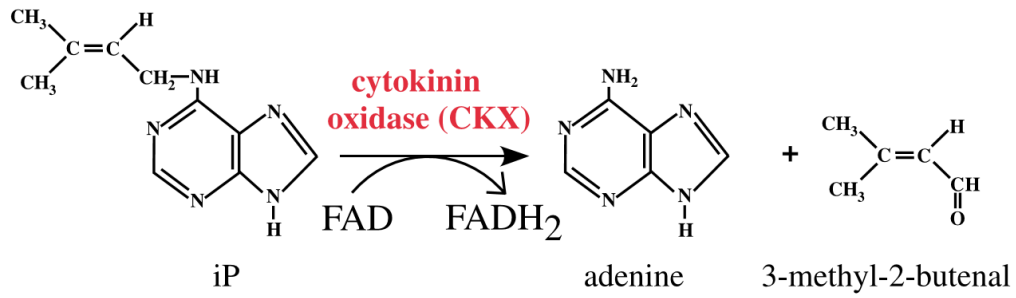
Les transporteurs PUPs sont localisés dans la membrane plasmique des cellules et autorisent ainsi le transport passif de plusieurs dérivés d'adénine de l'apoplasme vers le cytoplasme, avec une forte affinité pour les CK de type *tZ*. Ce sont deux gènes présents chez *Arabidopsis* *AtPUP1* et *AtPUP2* qui codent pour les transporteurs des CK. En particulier, il a pu être observé que l'expression d'*AtPUP2* était plus importante dans le phloème, permettant donc de préciser sa fonction pour le transport de longue distance des CK (Sakakibara, 2006).

La seconde famille de transporteurs, les ENTs, contient des protéines membranaires qui transportent les CK également de manière passive selon un gradient de concentrations (Kang *et al.*, 2017). Elles permettent ainsi le transfert des formes ribosides des CK telles que l'iPR (izopentyladénine riboside) et la *tZR* sur de longues distances. Il existe huit gènes codants pour les ENT chez *Arabidopsis* (*AtENT1* à *AtENT8*). Notamment ce sont des études menées sur la levure qui ont permis de démontrer que l'ENT6 et l'ENT8 d'*Arabidopsis* étaient capables de transporter l'iPR et la *tZR*, tandis qu'une perte de fonction chez le mutant *AtENT3* semblait entraîner une diminution de l'absorption des CK (Kieber and Schaller, 2014; Durán-Medina *et al.*, 2017; Kang *et al.*, 2017). Bien que ces derniers puissent jouer un rôle dans le transport à longue distance des CK, l'absence de phénotypes forts chez les mutants étudiés suggèrent qu'ils ne contribuent pas aux principaux processus régulant le développement des plantes (El-Showk *et al.*, 2013).

Enfin, les ABCG forment une sous-famille ABC comprenant un groupe de protéines qui sont les seules à participer au transport actif des CK à travers la membrane plasmique. Activées par l'hydrolyse de l'ATP, elles exportent les CK à partir de leur site de biosynthèse dans la racine et les chargent dans le xylème pour un transport sur de longues distances vers les jeunes pousses (Borghi *et al.*, 2015; Kang *et al.*, 2017). Ainsi, l'analyse du mutant *abcg14* présentait une diminution d'environ 90% de CK dans le xylème ainsi que des feuilles et des fleurs plus fines que leurs homologues de type sauvage (Kang *et al.*, 2017).

#### 4. Dégradation et conversion chimique

Les CK sont des hormones qui agissent à de très faibles concentrations dans la plante. Aussi les CK actives sont continuellement soumises à une fine régulation pour limiter leur quantité et ainsi leur action dans la plante à travers un mécanisme de dégradation.



**Figure 19. Mécanisme d'inactivation des cytokinines par les CKXs (Kieber and Schaller, 2014).**

Le clivage oxydatif irréversible du groupement N<sup>6</sup> de la forme active iP par les CK oxydases (CKX) est permis par le transfert de deux électrons vers le cofacteur FAD (flavin adenine dinucleotide). La dégradation oxydative de l'iP conduit à la production d'adénine et de 3-methyl-2-butenal.

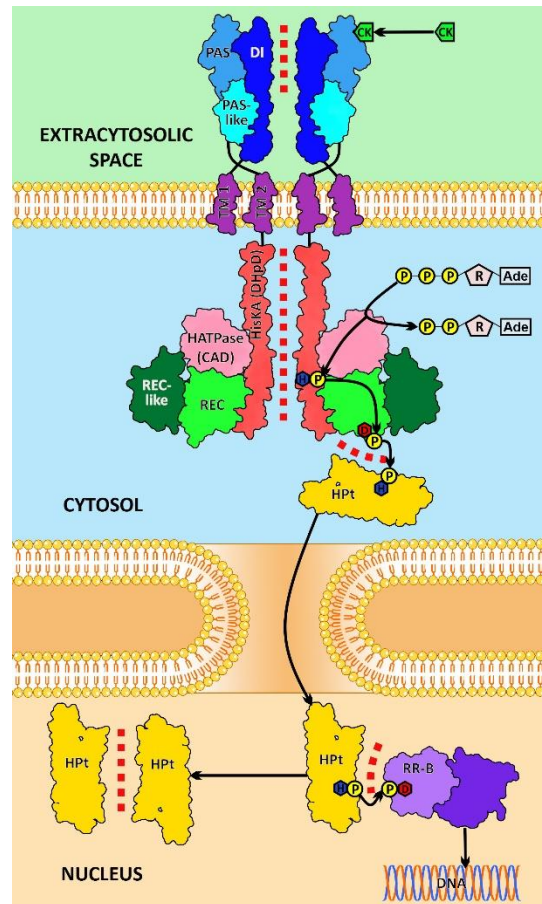
Ce processus joue un rôle homéostatique majeur pour la croissance optimale de la plante, en contrôlant l'accumulation des CK et leur distribution.

Des cytokinines déshydrogénases/oxydases (CKXs) contrôlent l'abondance des CK en catalysant un clivage oxydatif irréversible du groupement N<sup>6</sup> des formes actives iP, tZ et cZ en les dégradant en adénine et en 3-méthyl-2-butenal (**Figure 19** ; (Cedzich *et al.*, 2008; Kieber and Schaller, 2014). Les formes iP et tZ sont généralement considérées comme les CK les plus actives et sensibles aux CKXs, tandis que la cZ n'a que peu ou pas d'activité mais est un composé plus stable de par sa faible affinité pour les CKXs (Sakakibara, 2006; Stirk and Van Staden, 2010). De manière générale, les CKXs reconnaissent la double liaison entre le cycle purine et la chaîne latérale des CK isoprénoïdes ; de ce fait, les formes aromatiques ou la DHZ, qui arbore une liaison réduite, sont résistantes aux CKXs (Sakakibara, 2010). Il existe 7 gènes codants pour les CKXs chez *Arabidopsis* et qui s'expriment de manière spécifique dans les tissus végétaux, indiquant que la dégradation des CK est un processus finement régulé (Tomaz and Marina, 2010; Frébort *et al.*, 2011).

Par ailleurs, d'autres régulations des CK libres existent et permettent de désactiver ces dernières ou de les convertir sous des formes de stockage (Sakakibara, 2010). Ainsi la conjugaison des CK est possible par N-glycosylation, O-glycosylation et O-xylosylation. Dans le premier cas, des N-glucosyltransferases ajoutent de manière irréversible un glucoside de l'uridine 5'-diphosphoglucose sur les atomes N<sup>7</sup> et N<sup>8</sup>, majoritairement pour les CK isoprénoïdes. Les N-glucosides sont donc pourvus d'une activité moindre et ne sont métabolisés que rarement (Frébort *et al.*, 2011).

Les CK possédant un groupe hydroxyle sur la chaîne latérale sont capables de subir des O-glycosylation. C'est une O-glucosyltransferase qui inactive les CK par glycosylation de leur groupement hydroxyle (Frébort *et al.*, 2011; Kiran *et al.*, 2012; Kieber and Schaller, 2014). Cette réaction est réversible par une  $\beta$ -glycosidase et permet surtout la formation de composés de stockage de par leur stabilité et leur résistance face au clivage par les CKXs. C'est le cas des topolines aromatiques hydroxylées ou du TDZ hydroxylé qui se sont révélés être des substrats des O-glucosyltransferases (Frébort *et al.*, 2011). De la même manière, l'O-xylosyltransferase est spécifique de la conjugaison du xylose pour la formation de cytokinine-O-xylosides (Tomaz and Marina, 2010).

Enfin plusieurs voies de transformation des CK isoprénoïdes sont possibles par des modifications de leur chaîne latérale. C'est le cas de la *cis-trans* isomérase qui favorise la conversion de la cZ en tZ et inversement. D'autres mécanismes restent méconnus comme pour l'enzyme zéatine réductase, caractérisée chez le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) et le pois (*Pisum sativum* L.), qui permettrait le transfert irréversible de la tZ en DHZ en utilisant le



**Figure 20. Interaction moléculaire des cytokinines avec les récepteurs histidine kinases et transduction du signal (Arkhipov *et al.*, 2019).**

Les CK se lient au domaine extracellulaire des récepteurs histidines kinase et entraînent l'autophosphorylation du domaine histidine avec le transfert du groupement phosphate à des phosphotransmetteurs (HPs). La transmission de ce groupement à des RR de type B permet la transcription des gènes effecteurs des CK. CK: cytokinine, Ade: adénine, R: ribose, P: phosphate, D: aspartate conservé, H: histidine conservée, DI: domaine d'interface de dimérisation du capteur, PAS et PAS-like sont des sous-domaines du domaine CHASE, TM1 et TM2, les domaines transmembranaires, HisKA (DHpd): domaine histidine kinase A (dimérisation et phosphotransfert de l'histidine), HATPase (CAD): domaine adénosine triphosphatase (domaine catalytique et site de fixation de l'ATP), REC-like: domaine semblable au domaine receveur, REC: domaine receveur, HPt: histidine phosphotransfert (phosphotransmetteur), RR-B: response regulator de type B (facteur de transcription). La ligne en pointillé rouge indique les interactions entre protéines.

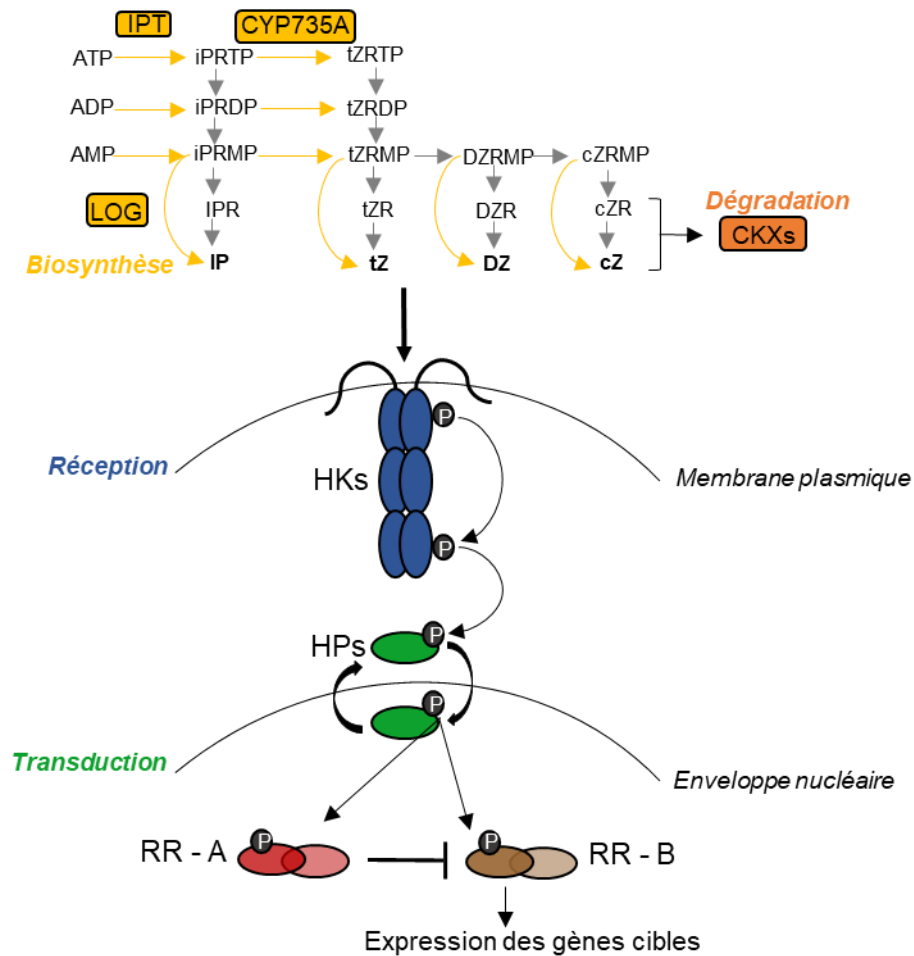
NADPH comme cofacteur. Cette réaction confère donc une stabilité à la base libre empêchant la dégradation par les CKXs (Frébert *et al.*, 2011). Egalement, la CK hydroxylase jusqu'ici partiellement caractérisée chez le chou-fleur (*Brassica oleracea* L.) catalyserait la conversion directe des formes iP en tZ (Tomaz and Marina, 2010).

## 5. Voie de signalisation des cytokinines

### A. Perception des cytokinines

L'abondante diversité des CK synthétisées ainsi que les nombreux processus mis en jeu pour les réguler finement montrent l'évidence d'un rôle spécifique pour chacune d'entre elles. Ces différences de fonctions se traduisent dès la perception des CK qui fait intervenir des acteurs impliqués dans divers processus biologiques (Spíchal *et al.*, 2004). Ainsi, les premiers interlocuteurs de la voie de signalisation des CK sont les récepteurs membranaires spécifiques de type histidine kinase (HK). Ce système s'appuie sur un modèle à deux composantes comprenant un censeur à activité histidine kinase qui perçoit le signal CK et provoque son autophosphorylation.

Chez *A. thaliana*, les CK sont ainsi perçues par trois récepteurs catalytiques, les histidines kinases AHK2, AHK3 et AHK4 (Suzuki *et al.*, 2001; Ueguchi *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2001; Lomin *et al.*, 2012). Celles-ci possèdent un domaine extracellulaire CHASE (cyclases/histidine kinases associated sensing extracellular) long d'environ 220 acides aminés, qui est situé à l'extrémité N-terminale de la molécule réceptrice et permet la liaison avec leur ligand. De chaque côté de ce domaine de fixation, on retrouve deux domaines transmembranaires terminant à l'extrémité C-terminale cytoplasmique par un domaine catalytique à activité histidine kinase, suivi d'un domaine pseudo-récepteur et récepteur (**Figure 20** ; Heyl *et al.*, 2012; Lomin *et al.*, 2012). Ce dernier participe à la transduction du signal en recevant puis transmettant un groupement phosphate issu du résidu histidine. Bien que le domaine pseudo-récepteur soit structurellement similaire au domaine receveur, celui-ci ne peut recevoir de groupement phosphate et son rôle n'a pu être déterminé pour le moment (Lomin *et al.*, 2012). Le composant central de la région histidine kinase comprend des sites permettant la dimérisation par deux hélices antiparallèles enroulées entre elles (domaine A) et le phospho-transfert avec un site conservé (H-box). Le domaine récepteur contient quant à lui un résidu d'aspartate accepteur conservé. Des études sur la configuration tridimensionnelle du domaine CHASE ont pu être réalisées tout d'abord par homologie avec des modélisations de protéines provenant de bactéries *Escherichia coli* ou *Klebsiella pneumoniae*. Puis des essais de « docking » moléculaire avec les CK ont permis de révéler que le domaine CHASE correspondait à un domaine de type PAS (Per-Arnt-Sim ; Henry and Crosson, 2011), dont la particularité est que le site de liaison recouvre entièrement l'hormone végétale



**Figure 21. Les acteurs de la voie de biosynthèse, transport, dégradation et signalisation des cytokinines.**

Les formes actives des CK nouvellement synthétisées sont perçues par les récepteurs HKs. Cette reconnaissance entraîne l'autophosphorylation du récepteur avec le transfert du groupement phosphate à des phosphotransmetteurs (HPs). La transmission du groupement phosphate à des facteurs de transcriptions RR de type B ou A permet la transcription des gènes effecteurs des CK. La dégradation des CK sous forme active est permise par les enzymes CKXs. IPT : Isopentenyl Transferase, CYP : Cytochrome, LOG : Lonely Guy, CKXs : Cytokinin Oxydases, HKs : Histidines Kinases, HPs : Histidines Phosphotransfers, RR-B/A : Response Regulator de type B ou A.

(Lomin *et al.*, 2012). L'ensemble de ces données a permis de dévoiler la configuration du domaine CHASE qui est généralement composé de deux hélices, une  $\alpha$ -hélice à l'extrémité N-terminale et une  $\beta$ -hélice du côté C-terminal. Celles-ci sont reliées toutes les deux par un pont disulfure qui permet de lui conférer une structure rigide et compact (Heyl *et al.*, 2012; Lomin *et al.*, 2012).

Si la conformation du domaine CHASE est variable selon le récepteur, ce sont les modifications structurales de la chaîne latérale des CK qui permettent une spécificité d'interactions avec les récepteurs HK (Sakakibara, 2006). Par exemple, les CK nucléobases comme l'iP ou la tZ sont les ligands les plus actifs pour ces récepteurs (Sakakibara, 2006). Celles-ci ont de par leur structure des spécificités de ligand avec leur récepteur, entraînant des réponses biologiques distinctes. Il existe donc des niveaux d'affinités différents selon les CK pour les trois AHK dont les gènes correspondants sont connus pour être exprimés différemment dans les tissus ou organes. Ainsi, le gène codant pour AHK4 s'exprime exclusivement dans les racines et présente une forte affinité avec la tZ, l'iP et la cZ. Le gène AHK3 quant à lui s'exprime dans les racines jusqu'aux feuilles mais est exclusivement spécifique de la tZ. Enfin, AHK2 possède une affinité similaire à AHK4 pour les mêmes CK mais le gène codant pour ce récepteur s'exprime aussi bien dans les racines que dans les feuilles et les fleurs. Ainsi, les gènes codants pour ces trois récepteurs ont pour point commun de s'exprimer dans les racines, mais de par leurs caractéristiques spécifiques, différents types de réponses peuvent être engagées en fonction du récepteur impliqué (Spíchal *et al.*, 2004).

### **B. Transduction du signal**

La transduction du signal des CK est un mécanisme décrypté notamment grâce à une identification des gènes impliqués dans ce processus, basée sur l'utilisation de mutants d'*Arabidopsis thaliana* (Heyl and Schmülling, 2003). Aussi, la perception des CK par son récepteur entraîne un changement dans la conformation de celui-ci en conduisant à l'autophosphorylation d'un résidu d'histidine (His) conservé dans le domaine kinase (Heyl *et al.*, 2007; Wulfetange *et al.*, 2011). La transduction du signal est ensuite déclenchée à travers le transfert du groupement phosphate *via* un acide aspartique conservé dans le domaine récepteur, vers un résidu His conservé des protéines HP (Histidines phosphotransfer) (Wulfetange *et al.*, 2011). Il existe 5 HP chez *Arabidopsis* qui agissent comme des régulateurs positifs de la signalisation des CK (Kang *et al.*, 2012). Les HP migrent ensuite du cytoplasme vers le noyau pour transmettre le groupement phosphate à des régulateurs de réponse (RR, response regulators), qui induiront la transcription de gènes de réponse aux CK (**Figure 21** ; Heyl and Schmülling, 2003; Kieber and Schaller, 2014).



Il existe environ 23 RR, qui sont classifiés en fonction de la chaîne C-terminale, selon deux types principaux identifiés chez *A. thaliana*, le type A (ARR-A) et le type B (ARR-B) (Kang *et al.*, 2012). Si la partie réceptrice est conservée chez l'ensemble des ARR avec des domaines similaires pour la phosphorylation, les ARR-A bénéficient d'une chaîne C-terminale réduite et les types B possèdent une chaîne plus longue (Argueso *et al.*, 2010). La chaîne terminale de ces derniers héberge notamment un domaine de liaison à ADN de type Myb, et fonctionne comme un régulateur positif du signal CK. En contraste, les ARR-A sont des régulateurs négatifs partiellement redondants de la signalisation par les CK et sont également contrôlés par les ARR-B. Les ARR-A sont donc rapidement et transitoirement induits par les CK tandis que les ARR-B ne sont pas directement régulés par ces hormones (Kang *et al.*, 2012). Ceux-ci sont d'ailleurs codés par des facteurs de transcription en aval des ARR-A et de la perception des CK (Heyl and Schmülling, 2003). En effet, la mutation des effecteurs de type B conduit à un phénotype similaire de ceux observés chez des mutants de récepteurs aux CK. De plus, des études menées chez *Arabidopsis* ont montré que certains ARR-B (ARR1, ARR2 et ARR10) étaient capables d'induire la transcription directe de plusieurs ARR-A indépendamment des CK exogènes. L'ensemble de ces données suggèrent que les ARR-B jouent un rôle central en limitant la signalisation des CK (**Figure 20** ; Heyl and Schmülling, 2003).

## 6. Les cytokinines dans l'environnement

La diversité structurelle des CK offre donc une richesse de fonctions au sein de la plante, et dont les mécanismes d'actions sont astucieusement initiés et régulés par une machinerie complexe et élaborée. Si les CK sont omniprésentes chez les plantes (angiospermes, gymnospermes, algues ou fougères), elles sont également conservées à travers les différents règnes du vivant. Elles sont ainsi présentes chez les microorganismes incluant les bactéries, les champignons ou les microalgues, ou dans le règne animal avec les insectes et les nématodes concernés par une phase parasitaire dans leur cycle de vie (Stirk and Van Staden, 2010). Beaucoup moins évidente, la présence de CK dans divers composants de l'environnement tel que l'eau ou le sol a néanmoins pu être relevée suggérant une propagation des CK par différentes sources. Ainsi la présence de CK dans le sol peut être due aux bactéries (Stirk and Van Staden, 2010). En effet, les populations microbiennes sont connues pour produire des CK utiles pour les interactions pathogène-plante comme par exemple les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote des genres *Frankia* et *Azospirillum*, ou les agents pathogènes du genre *Pseudomonas* qui peuvent ainsi diffuser des CK en grande quantité dans le sol. Bien que ce processus soit peu documenté, certaines études ont également pu mettre en avant l'existence d'une diffusion des CK à partir de racines des plantes directement dans



le sol (Stirk and Van Staden, 2010). C'est notamment une analyse biochimique successive des racines de pois et de leur milieu de croissance qui a révélé la présence de composés communs co-éluant avec la zéatine ou la zéatine riboside. Ces résultats démontrent ainsi que ces CK issues du pois ont bien été libérées par les racines au cours de leur croissance dans le milieu (Staden, 1976). A l'inverse, il a été montré que les racines de plants de tomate étaient capables d'absorber des CK radiomarquées intégrées à leur milieu de croissance et de les libérer une fois les plants transférés dans un nouveau milieu de culture non marqué (Davey and Van Staden, 1976). Cependant les informations sur ces phénomènes restent rares et les rôles d'un tel procédé dans la communication entre la plante et les microorganismes de la rhizosphère ou d'autres plantes demeurent mal compris.

Les CK sont donc régulièrement présentes dans l'environnement en étant capables de circuler entre les plantes et les organismes, ou des composants de la biosphère (Stirk and Van Staden, 2010). Ces composés semblent jouer un rôle majeur dans le contrôle de la communication avec d'autres organismes du sol et notamment les microorganismes de la rhizosphère pour la mise en place d'interactions symbiotiques ou parasitaires entre les plantes. Ainsi dans le cadre de l'interaction plante hôte - plante parasite, nous pouvons émettre l'hypothèse que les CK participent également à la mise en place de l'interaction entre la plante parasite et son hôte en contrôlant une étape clé du parasitisme, la formation des EHS.

#### **IV. Problématiques de recherche**

Le mode de vie hétérotrophe des plantes parasites repose donc sur le développement de l'haustorium, organe infectieux essentiel pour la fixation et l'invasion de la racine de l'hôte, la connexion au système vasculaire et la spoliation des ressources de l'hôte. Alors qu'il a été démontré que le développement de l'haustorium était initié suite à la détection de composés inducteurs notamment phénoliques dérivés de l'hôte dans le cas des plantes hémiparasites facultatives (*T. versicolor*, *P. japonicum*) et obligatoires (*Striga sp*), l'induction de la formation de haustorium demeure largement méconnue chez des plantes holoparasites telles que les genres *Orobanche* et *Phelipanche*.

Les travaux de Goyet *et al.* (2017) réalisés au LBPV ont été le point de départ de mon travail de thèse, en suggérant que les CK jouaient un rôle prépondérant dans la signalisation inter-plantes au niveau de la rhizosphère. Cependant, un certain nombre de questions demeure. Si les CK sont ainsi capables d'induire la formation d'EHS chez les holoparasites, sont-elles réellement exsudées par la plante hôte ou proviennent-elles d'un autre compartiment du sol (microbiotes endosphérique et rhizosphérique) ? S'agit-il d'un processus étendu à d'autres



plantes hôtes ? De plus, comment ce signal est-il perçu par la plante parasite et comment est-il intégré pour produire un organe spécialisé dans la colonisation de la plante hôte ? Enfin, d'autres interrogations se posent aussi concernant la nature du second signal haustoriogène identifié chez le colza (Goyet *et al.*, 2017), notamment au niveau de sa perception et de son intégration par l'orobanche.

La compréhension des mécanismes moléculaires conduisant à la mise en place de l'haustorium chez les plantes holoparasites a longtemps été entravée par l'absence de systèmes de validation fonctionnelles efficaces. En effet, chez les holoparasites, leur dépendance étroite à un hôte et les conditions spécifiques requises pour la germination des graines ne permettent pas d'envisager les méthodes de transformations génétiques classiquement utilisées et qui viseraient à aider à comprendre leur biologie unique. Si certaines méthodes notamment de trans-silencing ont été avancées (Aly *et al.*, 2009, 2014), ces dernières encore balbutiantes ne sont pas applicables aux stades précoces du développement des holoparasites. Aussi, si certains acteurs moléculaires ont déjà été mis en évidence comme étant possiblement impliqués dans la transduction du signal haustoriogène en réponse aux CK chez *P. ramosa*, leur rôle biologique dans ce processus particulier n'a pour l'instant pas pu être démontré (Goyet *et al.*, 2017). Le développement d'une méthode de transformation génétique de *P. ramosa* est donc un véritable challenge et des travaux allant dans ce sens ont été initiés lors de la thèse de V. Goyet (Goyet, 2017). Le premier chapitre de ce mémoire présente ainsi les avancées significatives réalisées dernièrement au cours de mes travaux de thèse et qui mettent en évidence l'intérêt d'une approche utilisant des microcals de *P. ramosa*, développés en absence de la plante hôte, et ce dans le but d'étudier spécifiquement la formation des EHS. Ce chapitre est présenté sous forme d'article accepté pour publication dans *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Journal of Plant Biotechnology*.

Le décryptage de la communication entre la plante hôte et la plante parasite conduisant à la formation des EHS est un questionnement central développé dans le deuxième chapitre de ce mémoire et qui s'attache à caractériser les signaux haustoriogènes de plusieurs plantes hôtes de *P. ramosa*. La mise en évidence de l'implication des CK dans l'interaction plante hôte et plante parasite y est démontrée plus avant à travers des approches biochimiques, avec l'identification formelle de ces composés dans les extraits rhizosphériques de plantes hôtes (à travers la fraction 9), ainsi que par des confirmations transcriptomiques avec l'analyse de l'expression de gènes marqueurs de la signalisation CK et de l'induction haustoriale. L'utilisation de mutants d'*Arabidopsis thaliana* invalidés pour la synthèse, le transport ou la perception des CK nous a de plus permis de confirmer le rôle de ces CK exsudées dans l'induction haustoriale, tout en précisant les mécanismes conduisant à l'exsudation de ces phytohormones dans la rhizosphère. Par ailleurs, si les CK sont les actrices



de la formation des EHS chez *P. ramosa*, la perception de ce signal par le parasite soulève de nombreuses questions quant aux acteurs moléculaires impliqués spécifiquement dans la signalisation et la traduction du signal conduisant à ce processus. Aussi, l'implication de chacun des récepteurs connus des CK (histidines kinases, HK) dans le processus de formation des EHS est analysée dans ce chapitre. Enfin, l'interaction du signal CK de la fraction 9 avec le second signal haustoriogène présent dans les extraits racinaires contenu dans la fraction 16, est analysée. L'identité des composés présents dans la fraction 16 est également recherchée grâce à des approches moléculaires, pharmacologiques et biochimiques.



# CHAPITRE 1



## Chapitre 1. Les microcals de *Phelipanche ramosa* traités aux cytokinines : un modèle efficace pour étudier la formation de l'haustorium chez les plantes holoparasites

### I. Introduction

L'induction haustoriale est un mécanisme bien décrit chez les plantes hémiparasites telles que *T. versicolor* ou *P. japonicum*, et deux décennies de recherches ont notamment montré que les étapes de ce processus sont déclenchées par des composés phénoliques dérivés de l'hôte. Cependant, l'identification et les caractérisations moléculaires des régulateurs clés impliqués dans le développement de l'haustorium restent rares. La difficulté principale dans ce cas précis étant de développer des outils génétiques dédiés à l'analyse fonctionnelle de gènes cibles chez les plantes parasites du fait de leur cycle de vie particulier (Ishida *et al.*, 2011). Malgré ces difficultés, certains acteurs impliqués dans la voie de transduction du signal haustorial ont pu être identifiés chez les hémiparasites facultatives *T. versicolor* et *P. japonicum*. En effet, ces deux espèces restent facilement cultivables en condition de laboratoire et des banques de transcrits pour différents stades de développement sont désormais disponibles (Westwood *et al.*, 2012; Ishida *et al.*, 2016). Ces espèces se positionnent ainsi comme des plantes parasites modèles pour des études fonctionnelles. Des méthodes de transformations génétiques médiées par *Agrobacterium* ont ainsi été développées avec succès chez *T. versicolor* et *P. japonicum* (Tomilov *et al.*, 2007; Bandaranayake *et al.*, 2010; Ishida *et al.*, 2011). C'est ainsi que Bandaranayake *et al.* (2010, 2012), ont pu démontrer, par une stratégie d'interférence à ARN, l'importance des gènes *QR1* et *QR2* codant pour des quinones réductases et du gène *Pirin* codant pour un facteur de transcription dans l'haustoriogenèse de *T. versicolor*. Chez *P. japonicum*, ce sont des approches par invalidation mais également de surexpression du gène *YUC3* (*YUCCA3*), codant pour une flavine monooxygénase impliquée dans la biosynthèse de l'auxine, qui ont permis de démontrer que ce gène et plus généralement cette hormone avaient un rôle prépondérant dans le développement de l'haustorium (Ishida *et al.*, 2016). Outre les protocoles de transformation génétique, une approche par mutagenèse a également pu être réalisée chez la plante parasite facultative *P. japonicum*. En effet, Cui *et al.* (2016) ont pu sélectionner des mutants déficients pour la formation de poils haustoriaux chez cette hémiparasite. Cette approche a notamment permis d'identifier des loci *hhd* (haustorial hair defective) impliqués dans la formation de ces structures. Le succès dans la mise en place et l'utilisation de ces méthodes d'études génétiques chez *T. versicolor* et *P. japonicum*, pour en apprendre plus sur les événements moléculaires associés à la perception du signal de l'hôte et au développement



de l'haustorium, réside ainsi principalement dans le caractère facultatif de leur relation avec l'hôte. D'autres stratégies ont néanmoins été testées avec succès chez l'hémiparasite obligatoire *S. hemonhica*. Une approche d'expression transitoire utilisant les virus recombinants VIGS (viral induced gene silencing) pour empêcher l'expression de gènes cibles par agro-infiltration des feuilles du parasite et plus récemment, la mise au point d'un protocole d'induction de cals chez cette plante s'avèrent ainsi prometteuses pour des études de validations fonctionnelles chez cette espèce (Kirigia *et al.*, 2014; Waweru *et al.*, 2019). Toutefois, ces approches ne sont pour l'heure pas adaptées à des études portant sur l'haustoriogenèse.

Même si des progrès importants ont ainsi pu être réalisés chez les hémiparasites, les études fonctionnelles visant à comprendre la formation de l'haustorium chez les plantes holoparasites ont longtemps été entravées par l'absence d'un système de transformation efficace, notamment dû au fait que ces parasites ont obligatoirement besoin d'un hôte pour se développer. Néanmoins, un système d'infection utilisant des cals d'orobanche, correspondant à des amas globulaires de cellules pas ou peu différenciées, permettrait d'obtenir une population du parasite homogène et stable dans le temps en culture *in vitro* et ainsi de s'affranchir de la plante hôte. Un tel système a déjà été utilisé par Fernández-Aparicio *et al.* (2011), Goyet (2017) et Libiaková *et al.* (2018), en permettant d'obtenir des cals transgéniques infectieux des parasites *P. aegyptiaca* et *P. ramosa* pour un gène rapporteur. Le ciblage d'un gène d'intérêt potentiellement impliqué dans la formation de l'haustorium pourrait alors être envisagé par un test d'agressivité des cals sur la plante hôte. Toutefois, bien que ces travaux aient démontré la possibilité de transformer des cals d'orobanche, ils se heurtent néanmoins à une limitation majeure en raison d'un trop faible nombre d'accrochages des cals et d'une production non maîtrisée de hampes florales et donc de graines une fois ces cals fixés aux racines d'une plante hôte.

La présente étude, publiée dans *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC, *Journal of Plant Biotechnology*), s'intéresse ainsi au développement d'une méthode efficace pour améliorer le taux d'accrochage et la régénération de *P. ramosa*, à travers l'utilisation de microcals infectieux. Ce travail a notamment démontré que des microcals, âgés d'un mois et produits à partir de graines germées, avaient une réponse transcriptionnelle similaire à celle de graines germées après un traitement à la *c/tZ*, comme l'a montrée la cinétique d'expression des gènes marqueurs de l'initiation de l'haustorium liés aux CK, incluant *PrRR5*, *PrCKX2*, *PrCKX4*, *PrTRN2* et *PrZFP6*. Par ailleurs, un traitement des microcals avec la *c/tZ* 48 heures avant l'infestation a engendré un accroissement par 4 du taux de fixation des microcals aux racines de tomate comparé à des microcals non traités, après 18 jours de coculture en mini-rhizotrons. Enfin, ces résultats soulignent également que l'augmentation de l'agressivité des



microcals avec un traitement *c/tZ*, suivi du transfert en pot des plants parasités de tomate, a permis d'améliorer sensiblement le rendement en graines obtenues à partir des plants régénérés de *P. ramosa*. En effet, les grandes quantités de graines récoltées après 10 semaines de co-culture montrent une capacité germinative en réponse au GR24 de plus de 90%, démontrant ainsi la viabilité des graines obtenues à partir de microcals. L'ensemble de ces résultats propose donc les microcals de *P. ramosa* traités aux CK comme un outil prometteur et adapté pour des études fonctionnelles sur les plantes holoparasites et en particulier sur l'haustoriogenèse.

## II. Article publié : Cytokinin treated microcalli of *Phelipanche ramosa*: an efficient model for studying haustorium formation in holoparasitic plants

Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)  
<https://doi.org/10.1007/s11240-020-01813-6>

ORIGINAL ARTICLE



### Cytokinin treated microcalli of *Phelipanche ramosa*: an efficient model for studying haustorium formation in holoparasitic plants

Estelle Billard<sup>1</sup> · Vincent Goyet<sup>1</sup> · Philippe Delavault<sup>1</sup> · Philippe Simier<sup>1</sup> · Grégory Montiel<sup>1</sup>

Received: 12 November 2019 / Revised: 19 March 2020 / Accepted: 20 March 2020  
 © Springer Nature B.V. 2020

#### Abstract

The ability of Orobanchaceae to establish a parasitic relationship is based on the development of a specific organ called haustorium. Previous studies in *Phelipanche aegyptiaca* and *P. ramosa* have underlined the interest of producing calli from germinated seeds as an efficient genetic transformation system, but they also pointed the need to improve the attachment rate of infectious calli to the host plant as well as the seed yield of the regenerated plants following attachment. It was previously shown that haustorium formation in *P. ramosa* is triggered by cytokinins. The present work demonstrates that one month-old microcalli produced from germinated seeds displayed a response to *c/tZ* similar to germinated seeds, as shown by the temporal expression profile of markers genes of cytokinin-related haustorium initiation, including *PrRR5*, *PrCKX2*, *PrCKX4*, *PrTRN2* and *PrZFP6*. In addition, a 48 h treatment of microcalli with *c/tZ* ( $10^{-7}$  M) before infestation triggered a 4-fold increase in the attachment rate of microcalli to tomato roots after 18 days in minirhizotrons when compared to untreated microcalli. Finally, it also outlines that increasing the aggressiveness of microcalli with a *c/tZ*



treatment followed by the transfer of parasitized tomato plants into pots significantly improved seed yield of regenerated *P. ramosa* plants. Indeed, high amounts of viable seeds which germinated at more than 90% in response to GR24 were harvested after a 10 weeks-co-cultivation period. According to these results, cytokinin treated *P. ramosa* microcalli thus appear to be a good tool for further functional studies in holoparasitic plants, especially on haustorium formation.

### **Key message**

Cytokinin treated microcalli show a high ability to attach to host roots and to regenerate seed-producing plants. They are of great interest for functional studies especially for studying haustorium formation.

### **Keywords**

Broomrape, *in vitro*, orobanche, parasitic plant, plant regeneration, tissue culture

### **Abbreviations**

*c/tZ*: *cis-trans*-zeatin

MS/MES: Murashige & Skoog medium containing Nitsch vitamins and MES buffer

PPM: Plant Preservative Mixture

## **1. Introduction**

Parasitic plants have developed unique features in the course of evolution leading them to adopt a heterotrophic lifestyle. Among these plants, the Orobanchaceae family regroups root parasitic organisms, including facultative and obligatory hemiparasites (which retain a certain level of photosynthetic abilities) and the obligatory holoparasites (devoid of chlorophyll). The holoparasites *Orobanche* and *Phelipanche sp.* (broomrapes) are considered as deadly pests in various regions of the world such as North Africa, Central and Southern Europe, and Asia as they attack many crops (including sunflower, tomato, tobacco, potato, and rapeseed) (Gibot-Leclerc *et al.*, 2012).

Among the specific traits developed by these plants in the course of their adaptation to their parasitic way of life, two of them are of outstanding interest. The first one is their ability to germinate only in response to host derived molecules (germination stimulants) which are found in host's rhizosphere (Joel *et al.*, 2013). The second trait is a morphological adaptation leading to the development of a specific organ called haustorium which is required for invasion of the host root, connection to the vascular system and spoliation of host's resources (Yoshida *et al.*, 2016). Obligatory parasites such as broomrapes develop terminal haustoria at the apex of the radicle of germinated seeds which cause a complete root growth arrest, a redirection of cellular



extension from longitudinal to radial (Joel and Losner-Goshen, 1994; Hood *et al.*, 1998) and also an extension of epidermal cells to form secretory papillae bearing a host-attachment function similar to that of haustorial hairs in hemiparasites (Baird and Riopel, 1985; Joel and Losner-Goshen, 1994; Fernández-Aparicio *et al.*, 2016a; Goyet *et al.*, 2017). Haustorium maturation occurs then when it reaches host tissues and the epidermal cells of the parasite haustorium apex differentiate into intrusive cells. These cells specialized for host invasion bear characteristic elongated shapes (Stephens, 1912; Olivier *et al.*, 1991) and grow inside host tissues toward host vasculatures as the attachment process completes.

Prehaustorium formation was shown to be triggered after a host derived chemical stimulation by so called Haustorium Inducing Factors (HIFs) as reviewed in (Goyet *et al.*, 2019). In holoparasitic plants such *Phelipanche ramosa*, cytokinins were shown to induce haustorium formation and gene expression analysis after treatment with host plant's root exudates or exogenous *ctZ* (*cis-trans*-zeatin) confirmed that plant hormone-related genes, including cytokinin-related genes (notably *PrRR5*, *PrCKX2* and *PrCKX4*), were up-regulated during prehaustoria induction.

Interestingly, the haustorium signal transduction pathway has been already well described in the facultative hemiparasitic plants *Triphysaria versicolor* and *Phtheirospermum japonicum* (Bandaranayake *et al.*, 2010; Cui *et al.*, 2016), mainly because efficient transformation systems allowing functional validation studies exist for these plants (Tomilov *et al.*, 2007; Ishida *et al.*, 2011). In the obligate hemiparasite *Striga hermonthica* Kirigia *et al.* (2014) have demonstrated the efficiency of viral induced gene silencing (VIGS) through leaf agro-infiltration as a rapid and powerful tool for functional genomics in already attached plants. However, this method is not adapted to study early development stages such as haustorium development although an efficient protocol for *Striga* callus induction was recently developed (Waweru *et al.*, 2019). In the case of holoparasitic plants, functional studies aiming to understand their unique biology have long been hampered by the lack of such an efficient transformation system and by the fact that these parasites require a host to grow. Recent studies in *P. aegyptiaca* and *P. ramosa* have proposed interesting transformation methods mediated by *Agrobacterium rhizogenes* (Fernández-Aparicio *et al.*, 2011; Libiaková *et al.*, 2018). These transformation methods take advantage of calli established from germinated *P. aegyptiaca* and *P. ramosa* seeds that can be subcultured, transformed and selected in absence of a host. Nevertheless, although these methods succeed in producing transgenic material, in the case of *P. aegyptiaca* it did not allow the regeneration of seed producing plants and in the case of *P. ramosa* no data are available regarding the amount of seeds recovered. Moreover, both methods are also hampered by a very low attachment rate of the calli to host roots (5 to 10%). In the idea of developing an efficient transformation system in holoparasitic plants, such a low attachment rate may in turn lead to low amount of transgenic seeds recovery. Interestingly, in a previous



work Zhou *et al.* (2004) have proposed that hormone treatments can trigger callus differentiation with the development of root-like structures and that these differentiated calli can in turn successfully infest host roots.

It is thus necessary to improve and to control callus attachment rate in order to develop efficient tools for functional studies regarding haustorium formation in holoparasitic plants. Based on the previously described *in vitro* callus system (Fernández-Aparicio *et al.*, 2011; Libiaková *et al.*, 2018), in the present work we develop a fast system using microcalli established from *P. ramosa* germinated seeds. We take advantage of the ability of *P. ramosa* germinated seeds to develop prehaustoria in response to *c/tZ* treatment to increase the aggressiveness of treated microcalli and thus their attachment rate to host roots. This treatment also triggers the same gene expression pattern shown to occur during haustorium development in *P. ramosa* germinated seeds. Moreover, we also show that the attached microcalli can regenerate healthy plants that produce viable seeds in large amounts.

## 2. Materials and methods

### A. Plant material

Seeds of *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel (branched broomrape, genetic group 1, Stojanova *et al.*, 2019) were collected in 2014 from mature broomrape flowering spikes in an oilseed rape field at Saint Martin de Fraigneau (France) and stored at 25°C in the dark before use.

*Solanum lycopersicum* (L.) cultivar Saint-Pierre (CAILLARD, Avignon, France) was chosen for co-cultivation experiments. Broomrape and tomato seeds were surface-sterilized according to Lechat *et al.* (2012) using 2.4% (v/v) sodium hypochlorite for 5 min and thoroughly rinsed three times for 1 min and three times for 5 min with sterile distilled water.

Surface-sterilized broomrape seeds were suspended in 10 mL incubation medium HEPES (1 mM Na/K phosphate buffer; pH 7.5, adjusted with KOH) and 0.1% (w/v) PPM (Kalys, Bernin, France), with a ratio of 10 mg seeds mL<sup>-1</sup>. Seeds were placed in the dark at 21°C for a 7 d-conditioning period (Lechat *et al.*, 2015).

Surface-sterilized tomato seeds were placed in a round Petri dish (150 x 15 mm, Dutscher, France), between previously autoclaved moistened filter papers (glass microfiber, 150 mm diameter, Macherey-Nagel, France) and incubated at 21°C for 7 days in a growth chamber (16 h light, 8 h dark).

### B. Microcallus production

Conditioned *P. ramosa* seeds were rinsed three times with sterile distilled water and suspended (2.5 mg mL<sup>-1</sup>) in 10 mL germination medium (HEPES 0.5 mM, pH 7.5, PPM 0.05% w/v, *rac*-GR24 10<sup>-7</sup> M (synthetic germination stimulant, kindly provided by Dr. Binne Zwanenburg, Radboud University, Nijmegen, The Netherlands). Fifty microliters of *rac*-GR24



treated seeds (around 25 seeds) were then distributed in 96-well plates (Cell Culture Multiwell Plate Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) and placed to germinate at 21°C in the dark for 4 days. One day after the radicle protrusion, the germination medium was removed from the wells and seeds were suspended in 100 µL of autoclaved MS medium (Murashige and Skoog, 1962) containing Nitsch vitamins and MES (MS/MES, Duchefa Biochemie, Netherlands), supplemented with sucrose 2% (w/v) and PPM 0.05% (w/v) (pH 5.7). The medium was renewed every week and microcalli were formed after one month at 21°C in the dark.

### **C. Co-cultivation bioassays**

Seven days old tomato plantlets were transferred onto filter paper and placed in cut square plates (120x120x17 mm, Greiner, France) containing a uniform layer of rockwool moistened with 50 mL of 50% (v/v) autoclaved Coïc medium pH 6.8 (Coïc and Lesaint, 1975; Labrousse *et al.*, 2004). These mini-rhizotrons were sealed and incubated vertically by keeping the root system in the dark at 21°C in a growth chamber (16 h light, 8 h dark, and 70% humidity) for 7 days, and supplied every 2 days with 20 mL of 50% (v/v) Coïc medium.

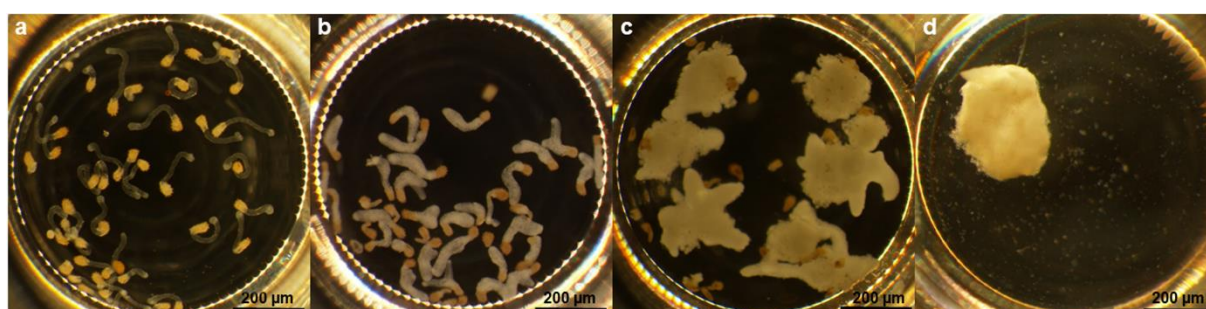
One month-old microcalli were incubated for 48 h in various concentrations of *cis-trans*-zeatin (*c/tZ* dissolved in 50% acetonitrile, Olchemin, Czech Republic) from  $10^{-5}$  M to  $10^{-8}$  M, diluted in filter sterilized buffer solution (0.5 mM HEPES, 0.05% w/v PPM) or incubated in filter sterilized buffer solution alone with 0.1% (v/v) acetonitrile (control). Therefore, about 10 microcalli per well (96-well plates) including three biological replicates per treatment were washed three times with 100 µL of sterile distilled water before adding 100 µL of *c/tZ* solutions.

After 2 days of incubation, 10 microcalli were placed in contact with primary and secondary roots of 15-d old tomato plants. One plantlet infected by 10 microcalli per plate and three plates per condition were used. Plates were placed at 21°C in a growth chamber (16 h light, 8 h dark and 70% humidity). The number of microcallus attachment was monitored daily during 18 days using a phloem-mobile fluorescent dye (6-carboxyfluorescein, Sigma Aldrich, 10 mM, pH 6.3). Droplets of carboxyfluorescein were applied on wounded host stems and fluorescent microcalli were observed using a fluorescence binocular equipped with a GFP2 filter: 480/40 nm excitation; 510 nm emission (Leica), showing functional phloem connections between host and parasite within the haustorium (Péron *et al.*, 2017).

Following attachment, calli formed tubercles and then underground stems. The number of attached microcalli per plant was assessed at the 30<sup>th</sup> day of co-cultivation. Then, parasitized tomato plants with roots intermingled in filter paper and rockwool were then transferred into sterilized 2 L plastic pots containing a mix of peat, sand and soil (1/1/1, v/v/v). They were taken back to the growth chamber and watered twice a week with blue Liquoplant (PLANTIN, France)

Table 1.1. Primer used for RT-qPCR analysis

Gene	Primer name	Forward and reverse primers 5' → 3'
<i>PrRR5</i>	<i>PrRR5_F</i>	TCCTTTATCGGTGTCGGTATCC
	<i>PrRR5_R</i>	GGCGGCAGCACCATAGG
<i>PrZFP6</i>	<i>PrZFP6_F</i>	ACGCACACAAGAAGGAGAGACA
	<i>PrZFP6_R</i>	TTCGGCTAGCCTGAATTTGC
<i>PrTRN2</i>	<i>PrTRN2_F</i>	AACGATGCAGCAGACATGGA
	<i>PrTRN2_R</i>	GCAGGAATAGCAGAGTTGTGTTG
<i>PrCKX2</i>	<i>PrCKX2_F</i>	CGTGTTTGCCAAAAGACTGACA
	<i>PrCKX2_R</i>	TCTTTCGTGGTTTTCCAATTAGG
<i>PrCKX4</i>	<i>PrCKX4_F</i>	AAATGCATGTCTGCGGACAA
	<i>PrCKX4_R</i>	TTCTATAATGGCATTGGCATCGT
18S	18S_F	CCAACTGCGCGCTAACCTA
	18S_R	CCGTCCTGCTGTCTTAATCGA

Figure 1.1. Induction of *P. ramosa* microcalli in 96-well plates under binocular.

**A.** Germinated seeds after 4-d incubation in 100  $\mu$ L of germination medium 0.5 mM HEPES at pH 7.5, PPM 0.05% (w/v) and  $10^{-7}$  M *rac*-GR24. **B.** Microcallus formation after 7 days and; **C** after one month, in 100  $\mu$ L of MS/MES supplemented with sucrose 2% (w/v) and PPM 0.05% (w/v) (pH 5.7). **D.** View from an isolated one month-old microcallus.

diluted at 3‰ (v/v). Floral shoots were counted after 10 weeks of co-cultivation for the treated condition and seeds were harvested to assess seed yield.

Viability of these seeds was assessed by a germination assay. They were surface-sterilized and incubated 4 days in germination medium as described above, using a negative control with 0.1% (v/v) acetonitrile in incubation medium and six biological replicates. Germination rates were assessed under binocular loupe (Olympus SZX10; Olympus Europa GmbH, Hambourg, Germany) using the methylthiazolyldiphenyltetrazolium bromide (MTT) according to the protocol described by Pouvreau *et al.* (2013). Seeds were considered to be germinated when the radicle protruded out of the seed coat.

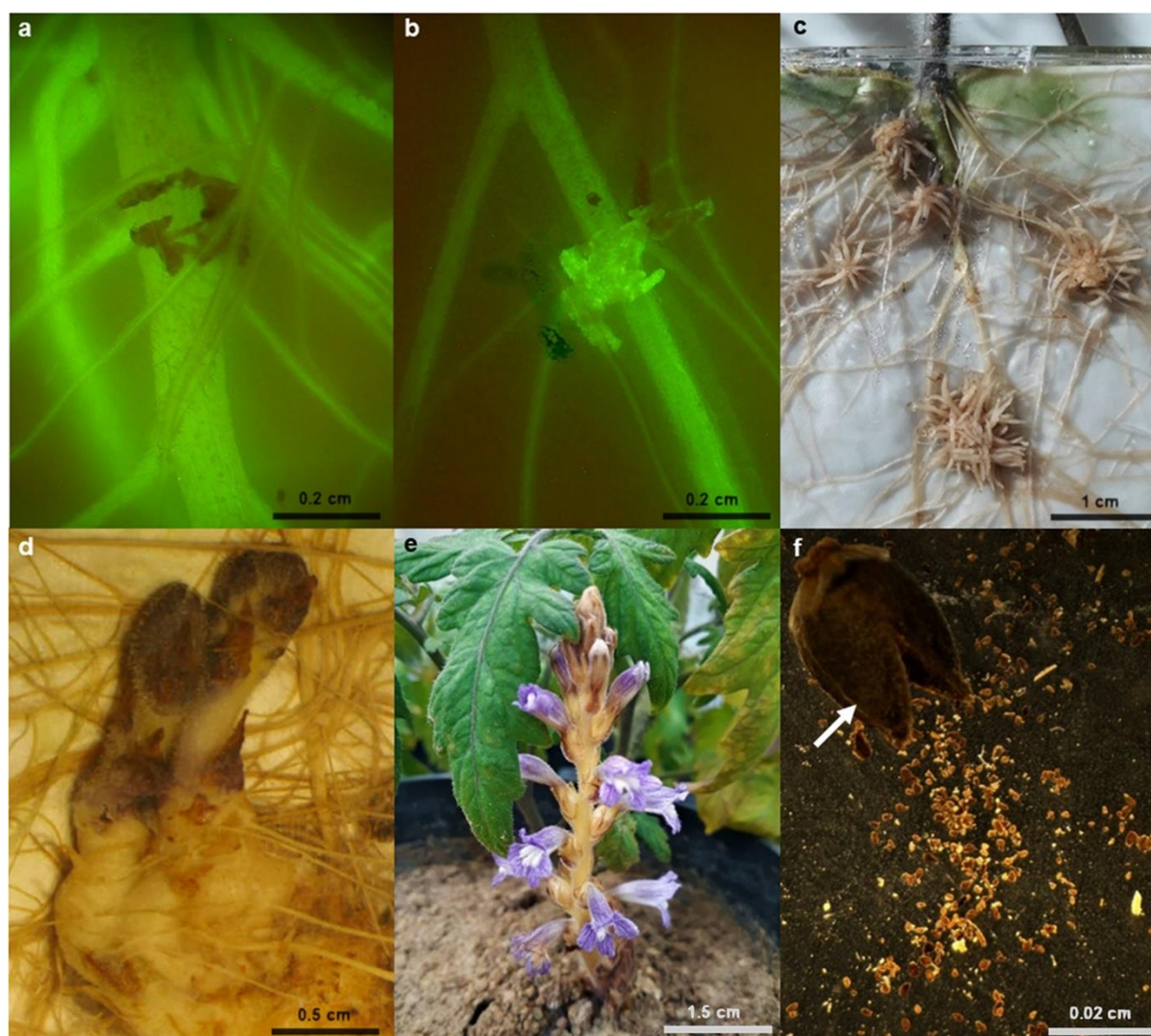
#### **D. Sample preparation for total RNA extraction and quantitative real-time PCR (RT-qPCR) analysis**

For molecular analyses, 10 mL of broomrape conditioned seeds (100 mg) were rinsed three times with sterile distilled water and suspended in 10 mL germination medium (HEPES 0.5 mM, pH 7.5, PPM 0.05% w/v, *rac*-GR24  $10^{-7}$  M) in tissue culture flasks (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), before being placed at 21°C in the dark for 4 days. Seeds were then rinsed three times and were treated with *c/tZ* ( $10^{-7}$  M) in 10 mL of buffer solution (0.5 mM HEPES, 0.05% w/v PPM) or with buffer alone supplemented with 0.1% (v/v) acetonitrile, and placed at 21°C in the dark. Seeds were collected per culture flasks after 0 h, 0.5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h and 48 h of treatment and frozen in liquid nitrogen.

Microcalli were produced in the same conditions as described above, in 96-well plates in MS/MES medium supplemented with sucrose 2% (w/v) and PPM 0.05% (w/v) (pH 5.7), with 10 microcalli per well. After one month, the medium was removed and microcalli were washed three times with 100  $\mu$ L of sterile distilled water before incubated in 100  $\mu$ L of *c/tZ* ( $10^{-7}$  M), diluted in buffer solution (0.5 mM HEPES, 0.05% w/v PPM) or incubated in buffer solution alone with 0.1% (v/v) acetonitrile (control). Microcalli were collected at the same kinetic times used for seeds, and frozen in liquid nitrogen (80 microcalli per treatment and kinetic time).

Total RNA was isolated from 100 mg treated seeds and 80 treated microcalli using the Nucleospin RNA Plant kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's instruction. Genomic DNA was removed from RNA samples by treatment with 6.8 U of RNasefree DNase I (Qiagen, Cat. No 79254) followed by a clean-up step with an RNA clean up XS spin column (Macherey Nagel) according to the manufacturer's instruction. RNA was quantified using a NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies).

cDNA was synthesized from 0.5  $\mu$ g of total RNA using SuperMIX qScript cDNA (Quanta) according to the manufacturer's instructions. cDNA was diluted 20 times and used in 25  $\mu$ L RT-PCR experiments with 12.5  $\mu$ L of PerfeCTa SYBR Green SuperMix (Quanta) and 0.3 mM of each primer, carried out on an Applied Biosystems 7300 real-time PCR system (Applied



**Figure 1.2. Co-cultivation steps of *P. ramosa* microcalli on *S. Lycopersicum* roots.**

**A, B,** Assessment of microcallus attachment using the phloem-mobile dye 6-carboxyfluorescein. **A.** Microcallus before attachment. **B.** Fluorescent microcallus attached to host root. **C.** Tubercle development from attached microcalli. **D.** Underground stem development. **E.** Shoot emergence and blooming. **F.** Capsule (arrow) from floral shoot releasing seeds.

Biosystems) as described in (Lechat *et al.*, 2015). Three technical replicates were performed per sample. Specificity of the PCR amplification was checked using a heat dissociation protocol (from 60°C to 95°C) after the final cycle of PCR. Fold change in RNA expression was estimated using threshold cycles. The amplicon of the constitutive 18S, which showed low cycle threshold variation (SD < 0.5 cycle threshold), was used as an internal control to normalize all the data. The gene-specific primers used for each amplification are presented in **Table 1.1**. A control experiment without cDNA was included for each PCR mix.

All the experiments were performed from three independent sets of microcallus production (three biological replicates).

### **E. Statistical analysis**

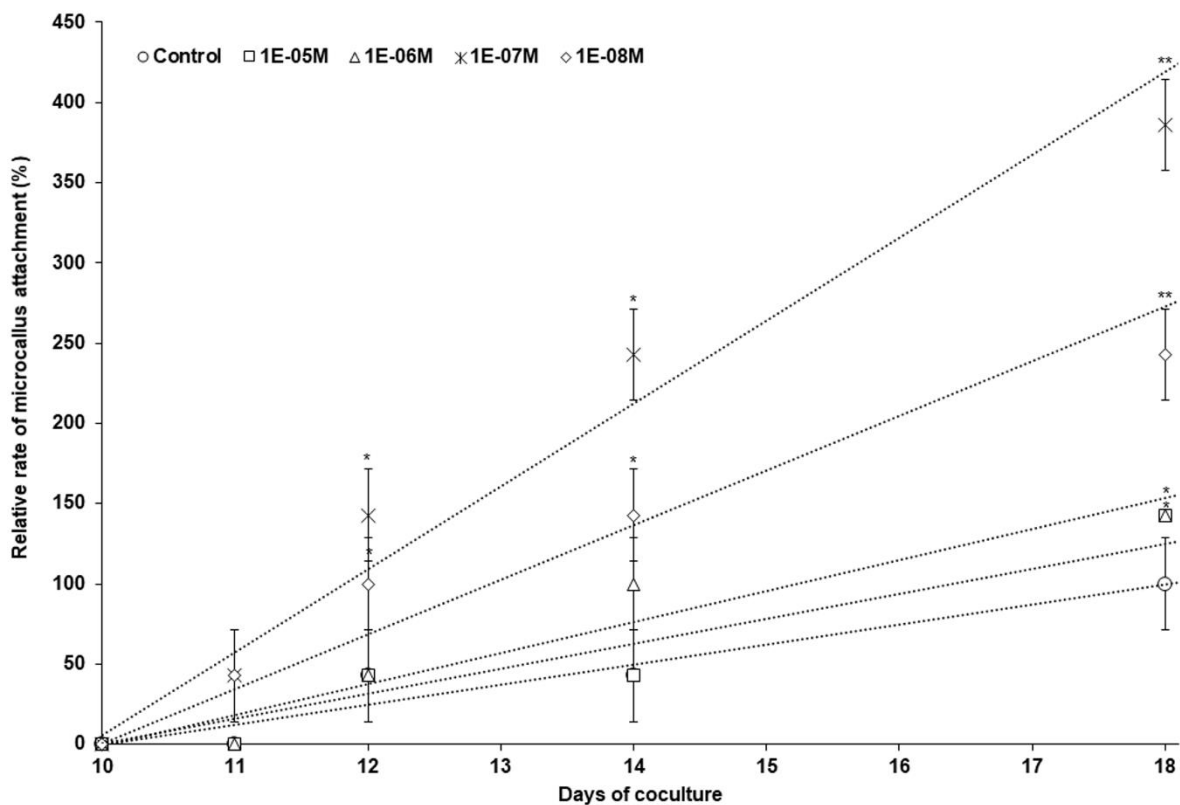
Statistical data analysis were performed using analysis of variance and multiple range tests at 95% confidence level. The R software was used (R software, [www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Student *t*-test was also performed to evaluate the impact of a cytokinin treatment on microcallus aggressiveness compared to untreated microcallus. Gene expression data for treated or untreated microcalli and seeds were subjected to analysis of variance (ANOVA) and pairwise comparisons (Tukey honestly significant difference). Controls used are the buffer solution alone with 0.1% (v/v) acetonitrile. Means are values  $\pm$  SE (n=3).

## **3. Results and Discussion**

### **A. Cytokinin treatments enhance the aggressiveness of *P. ramosa* microcallus**

*P. ramosa* germinated seeds were obtained 4 days after induction by the synthetic germination stimulant *rac*-GR24 ( $10^{-7}$  M) (**Figure 1.1.A**) and were then incubated in MS/MES medium, supplemented with sucrose 2% (w/v) and PPM 0.05% (w/v) (pH 5.7) (Fernández-Aparicio *et al.*, 2011). After 7 days, the whole germinated seed radicles turned white and began to swell to form cell clusters (**Figure 1.1.B**). After one month, globular shaped structures with a diameter of approximately 2 mm were observable (**Figure 1.1.C.D**). Although these structures were only one month old, they did resemble older calli described by Zhou *et al.* (2004) and Fernández-Aparicio *et al.* (2011) for both *P. ramosa* and *P. aegyptiaca* in respect of their white and compact texture with a globular shape (**Figure 1.1.D**) and were thus termed as microcalli. Some of them had an irregular shape suggesting a more differentiated state which resembles tubercle-like structures (**Figure 1.1.C**) (Zhou *et al.*, 2004).

In order to assess if these young structures could be used to infect host plants in the same manner as what was described for older calli (Fernández-Aparicio *et al.*, 2011), we used co-cultivation assays to monitor both the microcallus attachment to host root systems and the further development of tubercles. Cytokinins were previously shown to increase the overall aggressiveness of germinated seeds (Goyet *et al.*, 2017), we thus also performed pretreatment

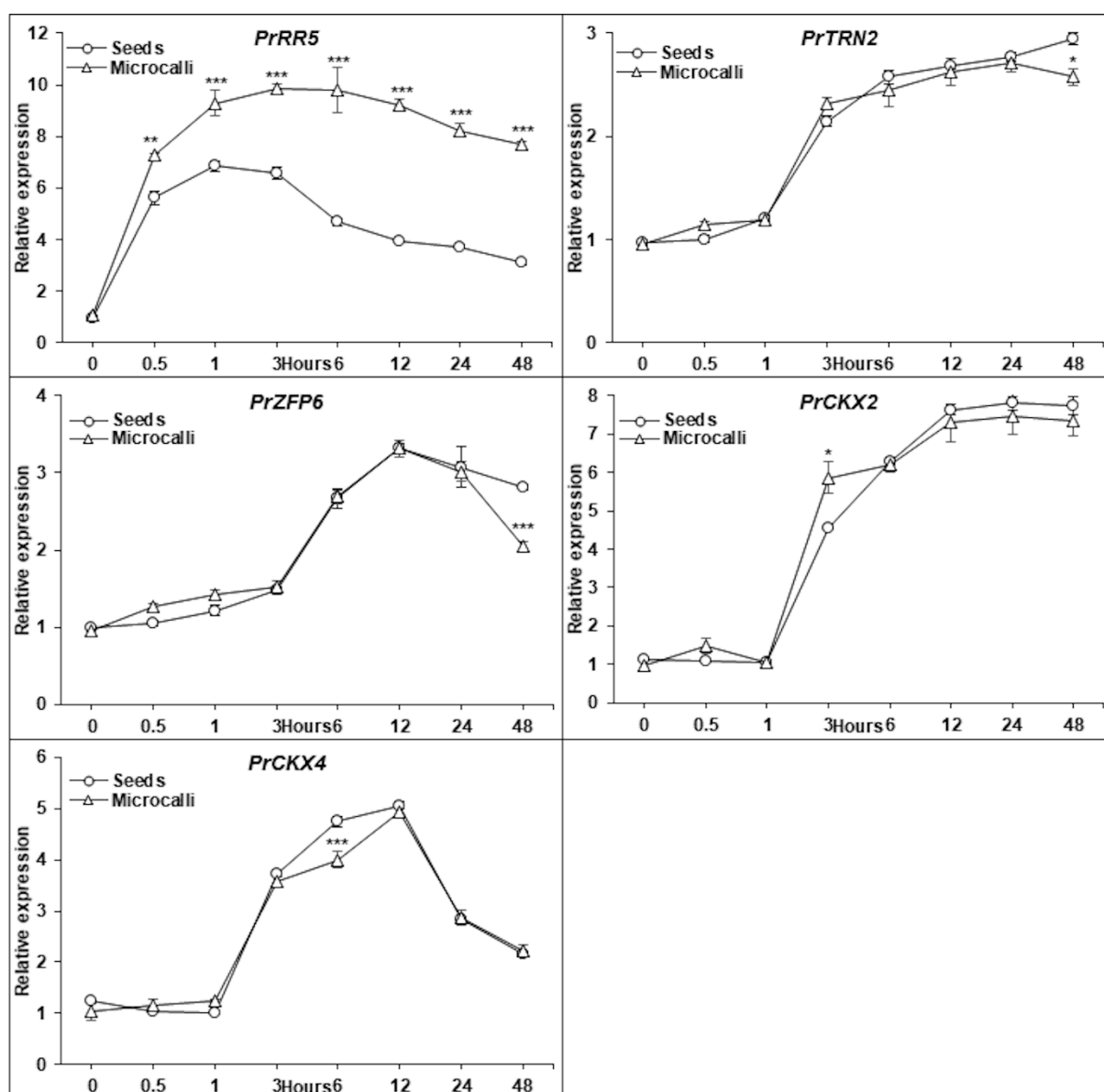


**Figure 1.3. Cytokinin pretreatments enhance microcallus aggressiveness.**

Microcalli were incubated for 48 h in various concentrations of *c/tZ* ( $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M) diluted in incubation buffer (0.5 mM HEPES, 0.05% w/v PPM), or in control solution (buffer solution supplemented with 0.1% v/v acetonitrile), before placing them in contact with *S. lycopersicum* roots in mini-rhizotrons. The number of attached microcalli was assessed during 18 days using the phloem-mobile dye 6-carboxyfluorescein under fluorescent binocular. Results were expressed as percentage of the maximum number of attached microcalli observed in control condition. One plantlet per plate with 10 microcalli and three plates per condition were used. Means are values  $\pm$  SE ( $n=3$ ) and means annotated with asterisks are significantly different from the control (*t*-test, \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ ).

with cytokinins to test if such a treatment can enhance microcallus aggressiveness in the same manner. Microcalli were thus treated or not with *c/tZ* concentrations of ranging from  $10^{-5}$  M to  $10^{-8}$  M for 48 h, placed in contact of *S. lycopersicum* roots and assayed in regards of their relative attachments rate to host's roots. The number of attachments was daily assessed during 18 days using the phloem-mobile dye 6-carboxyfluorescein revealing vascular connections between the host plant and the parasite and thus the occurrence of functional haustoria (**Figure 1.2.A.B**). The relative attachment rate was expressed as a percentage of the maximum number of attached microcalli in control conditions at the end of the assay (**Figure 1.3**).

The first microcallus attachments occurred on the 11<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> day of co-culture for each treatment. Interestingly, differences in the relative rate of microcallus attachment between cytokinin treated conditions and control conditions were observed from the 12<sup>th</sup> day and throughout the assay. This relative rate of attachment indeed appeared significantly higher in treated conditions (*c/tZ*  $10^{-7}$  M and  $10^{-8}$  M) from the 12<sup>th</sup> to the 18<sup>th</sup> day in contrast to the control condition (*t*-test, respectively  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ ). There were also significant differences at the 18<sup>th</sup> day of co-culture for other *c/tZ* concentrations ( $10^{-5}$  M and  $10^{-6}$  M) compared to the control condition (*t*-test,  $p < 0.05$ ) (**Figure 1.3**). Taken together these results show that microcalli can be quickly obtained from single seeds but they nevertheless show abilities to infect host roots as it was previously described for more developed calli (Zhou *et al.*, 2004; Fernández-Aparicio *et al.*, 2011; Libiaková *et al.*, 2018). Moreover, when microcalli were pre-treated with cytokinin at an optimal concentration of  $10^{-7}$  M, they displayed a significantly higher and faster relative attachment rate than untreated microcalli. This thus indicates that a pre-treatment with cytokinin clearly increases the aggressiveness of microcalli in the same manner as for germinated seeds (Goyet *et al.*, 2017). Fernández-Aparicio *et al.* (2011) and Libiaková *et al.* (2018) have reported fairly low attachment rates in the case of *P. aegyptiaca* and *P. ramosa* callus with respectively 10% and 5%. The cytokinin treatment applied in our system represents thus a significant improvement of the attachment efficiency compared to these previous studies. Indeed, the maximal rate was reached at the 18<sup>th</sup> day of the co-culture for the treated condition (*c/tZ*  $10^{-7}$  M), with a relative rate of  $386 \pm 29\%$  corresponding to an absolute rate of  $27 \pm 2\%$ . Moreover, after 4 weeks of co-cultivation we observed a high absolute rate of  $51 \pm 4\%$  for pretreated microcalli (**Figure 1.5**). Interestingly, Zhou *et al.* (2004) also proposed that hormones including auxin,  $\beta$ -indoleacetic acid, gibberellin or cytokinins (kinetin and 6-benzylaminopurine) could be used in culture medium. Although, the combined effects of auxin, kinetin and gibberellin allowed in this case the induction of callus formation and their subsequent differentiation, this did not lead to a sufficient attachment rate. Interestingly, in the obligate hemiparasitic plant *S. hermonthica* BAP treatment of calli mostly leads to shoot differentiation and no aggressiveness of these structures have been reported



**Figure 1.4. Cytokinin treatment triggers haustorium marker genes expression in *P. ramosa* seeds and microcalli.**

Expression of haustorium marker genes *PrRR5*, *PrTRN2*, *PrZFP6*, *PrCKX2*, *PrCKX4* was measured by RT-qPCR in *P. ramosa* germinated seeds and microcalli treated for 0 h, 0.5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h with *c/z* ( $10^{-7}$  M) or control (buffer solution 0.5 mM HEPES, 0.05% w/v PPM supplemented with 0.1% v/v acetonitrile). Data were normalized to the 18S reference gene and with gene expression in the control for seeds and microcalli for each kinetic time ( $\Delta\Delta Ct$ ). The threshold value control is set to 1. Three biological replicates were performed (three technical replicates each). Means are values  $\pm$ SE (n=3). Means for microcalli annotated with asterisks indicate statistical differences compared with germinated seeds (Tukey honestly significant difference \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ ).

(Waweru *et al.*, 2019). The method we propose therefore improves strongly (10-fold) the attachment of *P. ramosa* callus through the use of cytokinins compared to the highest rate reported in previous studies (Libiaková *et al.*, 2018). In addition, one month microcalli displayed a behavior similar to more developed calli (described by Fernández-Aparicio *et al.* (2011) as 3 month-old calli with a diameter of 2 cm) in regard of their ability to attach to a host plant. Our method thus shows that establishment steps of calli lines can be reduced from 3 to 1 month.

### **B. *c/tZeatin induces the same molecular response pattern in seeds and microcalli***

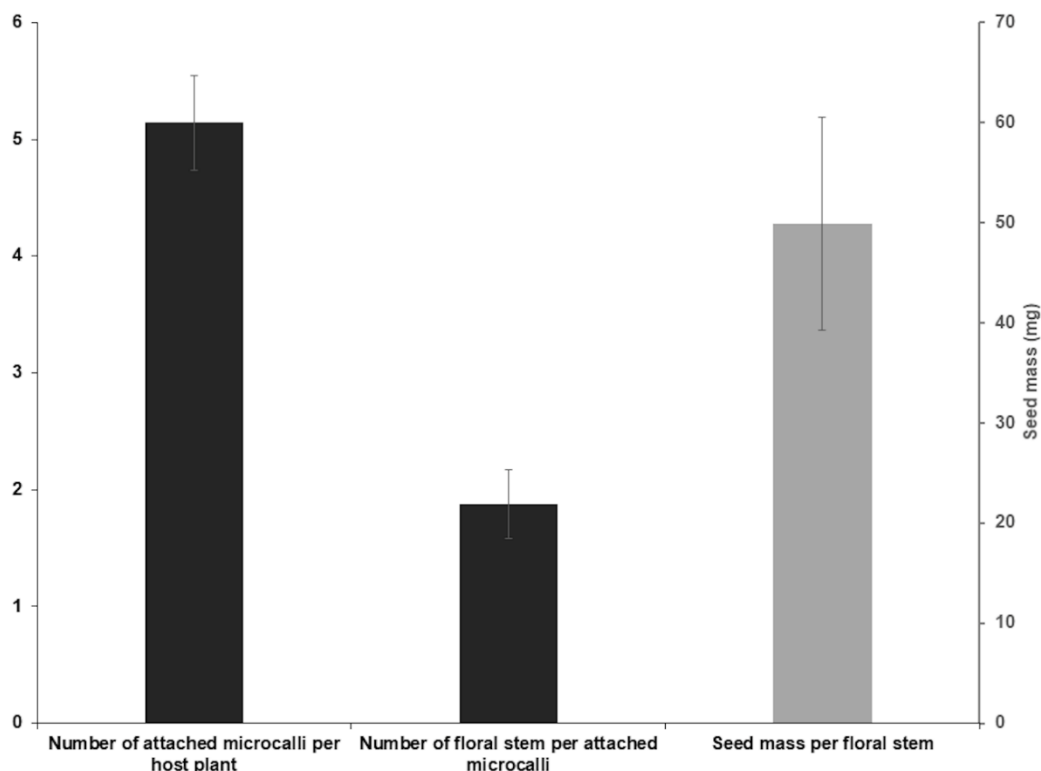
Using germinated seeds, (Goyet *et al.*, 2017) showed that haustorium induction in response to host root exudates was associated to an increase of the expression of cytokinin-related genes including *PrRR5*, *PrZFP6*, *PrCKX2* and *PrCKX4* but also of the tetraspanin gene *PrTRN2* which is differentially expressed during prehaustorium induction. These genes were thus proposed as marker genes of haustorium induction in response to this treatment. In the present study, the expression patterns of these marker genes were analyzed upon cytokinin treatment (*c/tZ*  $10^{-7}$  M during 0 h, 0.5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h and 48 h) in germinated seeds and microcalli (**Figure 1.4**).

Three hours of treatment were necessary to observe a transcript accumulation corresponding to *PrTRN2*, *PrCKX2* and *PrCKX4* genes in seeds and microcalli, while *PrZFP6* expression increased after 6 hours. Interestingly, only 30 minutes of treatment were required to trigger the overexpression of *PrRR5* in both materials which is consistent with its role as an early cytokinin response gene (Li *et al.*, 2013). All genes, except *PrRR5*, displayed an expression pattern with relative levels almost statistically equivalent in seeds and microcalli (Tukey honestly significant difference,  $p < 0.001$ ). However, treated microcalli displayed much higher expression levels of *PrRR5* (from  $7.3 \pm 0.1$  at 0.5 h to  $7.7 \pm 0.1$  at 48 h) compared to treated seeds ( $5.6 \pm 0.3$  and  $3.1 \pm 0.09$  respectively, Tukey honestly significant difference  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ ).

These results thus show that the molecular response pathway of CK-dependent haustorium formation, previously described in germinated seeds (Goyet *et al.*, 2017) is maintained in microcalli.

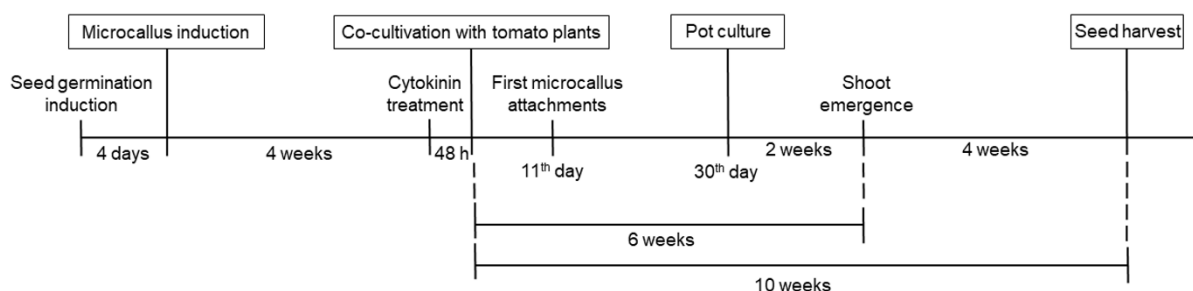
### **C. Fully grown plants producing viable seeds can regenerate from microcallus**

To date studies using the callus system in *P. aegyptiaca* and *P. ramosa* did not show a complete plant regeneration leading to seed production. By using co-cultivation assays, we tested if *c/tZ* treated microcalli can regenerate as a whole plant and produce viable seeds in large amounts. Treated microcalli (*c/tZ*  $10^{-7}$  M) attached to the host roots developed into tubercles with average diameters of 1 cm after 4 weeks of co-culture (**Figure 1.2.A.B.C.D**). In this condition, the average number of microcalli attached per host plant was  $5.1 \pm 0.4$  at the



**Figure 1.5. Attached microcalli pretreated with cytokinin regenerate healthy plants that produce viable seeds in large amount.**

The number of attached microcalli was assessed for 10 microcalli per plant at the 30<sup>th</sup> day of co-cultivation. The average number of floral shoots per microcallus and the average seed mass per floral stem was determined after 10 weeks of co-cultivation. Means are values  $\pm$ SE (n=6). The average germination percentage of seeds collected from mature floral shoots was  $92.5 \pm 0.76\%$  and was assessed using MTT staining (Pouvreau *et al.*, 2013), with six replicates per seed batch and a negative control with 0.1% (v/v) acetonitrile.



**Figure 1.6. Timeline of plant regeneration method using cytokinin treated microcalli.**

Four days are required to obtain *P. ramosa* germinated seeds after induction with *rac*-GR24 ( $10^{-7}$  M). Microcalli are then observed after 4 weeks of culture in MS/MES supplemented with sucrose 2% (w/v) and PPM 0.05% (w/v) (pH 5.7). Microcalli are incubated for 48 h with cytokinin (*c/tz*  $10^{-5}$  M to  $10^{-8}$  M) or in buffer solution with 0.1% (v/v) acetonitrile before being placed in contact with tomato roots. The first attachments are observed after 11 days of co-cultivation. Co-cultivation systems containing 30 days old tubercles developed from microcalli are transferred in pots filled with a mixture of peat, sand and soil (1/1/1 v/v/v). Floral shoot emergences are observed after 6 weeks of co-cultivation and a total of 10 weeks are required to harvest mature seeds.

30<sup>th</sup> day of co-cultivation (attachment rate: 50%) before the transfer of the whole co-cultivation system (without plastic Petri Dishes) in pots filled with a mixture of peat, sand and soil (1/1/1 v/v/v) (**Figure 1.5**). In these conditions and after only 2 weeks of pot cultivation, robust shoots emerged and bloomed (**Figure 1.2.E**). After 6 weeks of co-cultivation in pots, seeds were ready to be harvested (**Figure 1.2.F**). The average number of floral stems per attached microcalli was  $1.9 \pm 0.3$  and seed yield reached the mean value of  $49.9 \pm 10.6$  mg per shoot. Moreover, these seeds displayed high germination rates in response to the synthetic germination stimulant *rac*-GR24 ( $10^{-7}$  M) with a mean of  $92.5 \pm 0.8\%$  (**Figure 1.5**) which is very similar to seeds harvested from field grown *P. ramosa* plants ( $95 \pm 5\%$ ). Interestingly, Libiaková *et al.* (2018) also noticed tubercles formation after 4 weeks of inoculation and shoot emergence after 6 weeks in their conditions. However, this is the first time that a large amount of seeds obtained from regenerated Orobanche plants is recorded. These results thus demonstrate that attached microcalli treated with *c/tZ* ( $10^{-7}$  M) are able to achieve a complete cycle (from microcalli to production of viable seeds) within 10 weeks (**Figure 1.6**).

#### 4. Conclusion

In order to carry out functional studies in holoparasitic plants an efficient attachment and regeneration method is required. The study presented here shows that together with their ability to attach to host roots and develop vascular connections, the microcallus model is an efficient model which attachment abilities can be increased through the use of cytokinins as haustorium inducing factor. This thus shows that these microcalli can be used in further studies aiming at deciphering haustorium development and signalization. Since previous studies have shown that calli can be used to produce transgenic material (Fernández-Aparicio *et al.*, 2011; Libiaková *et al.*, 2018), microcalli may also be used in transgenic approaches aiming to silence haustorium related genes and this model also leads to the production of viable seeds which are required for the establishment of transgenic lines.

#### Acknowledgments

EB and VG were financially supported by PhD grants from RFI Objectif Végétal program (Region Pays de Loire, France) and the French Ministry of Education and Research, respectively. The authors also thank Johannes Schmidt and Sabine Delgrange for their technical support.

#### Author contributions

This work was supervised by PS and GM. PS, GM, EB, VG conceived the design experiments. EB, VG performed the experiments and analysed the data. EB, PS, PD, GM wrote the manuscript.



## Compliance with ethical standards

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest

### III. Conclusion

La présente étude démontre qu'au travers de leur capacité à s'attacher aux racines de l'hôte et à développer des connexions vasculaires, les microcals, dont les capacités d'accrochage peuvent être augmentées par l'utilisation de CK exogènes, constituent un modèle efficace pour stimuler l'haustoriogénèse. De manière intéressante, un traitement CK déclenche la même voie de réponse moléculaire que celle observée lors du développement de l'haustorium dans les graines germées de *P. ramosa*. Enfin, les microcals attachés sont capables de régénérer des plantes saines avec la production de graines viables en grande quantité. Ce travail a donc permis pour la première fois d'améliorer l'étape limitante de l'accrochage et de la régénération des cals en plante entière. Ces microcals peuvent ainsi être utilisés pour des études ultérieures visant à décrypter le développement et la signalisation de l'haustorium.

Des travaux précédents ayant démontré que les cals sont aptes à être utilisés pour produire du matériel transgénique, les microcals pourraient ainsi être utilisés dans des approches transgéniques visant à éteindre les gènes liés à l'haustoriogénèse (Fernández-Aparicio *et al.*, 2011; Libiaková *et al.*, 2018). Par ailleurs, ce modèle offre la possibilité de produire des graines viables qui sont nécessaires à l'établissement de lignées transgéniques. En particulier, les deux gènes *PrZFP6* (ZINC FINGER PROTEIN 6) et *PrTRN2* (TORNADO2) sont régulés de manière précoce après un traitement exogène avec des CK et participeraient spécifiquement à la formation de l'organe parasitaire (Goyet *et al.*, 2017). Ces deux gènes constitueraient ainsi de bons candidats pour une approche de validation fonctionnelle utilisant les microcals de *P. ramosa* traités aux CK. Il serait ainsi envisageable d'utiliser une stratégie d'inactivation de ces gènes par l'utilisation du système CRISPR-Cas9 et de transformer les microcals infectieux de *P. ramosa* à l'aide des constructions permettant la mise en place de cette technologie pour les gènes candidats retenus (Doudna and Charpentier, 2014). L'effet des mutations de chaque gène pourrait alors être vérifié par un test d'agressivité des microcals. Cette stratégie requiert toutefois la détermination d'un protocole de transformation des microcals efficient pour obtenir des individus entièrement transgéniques et homogènes génétiquement. La plupart des études réalisées jusqu'ici sur des cals d'orobanche se basent sur des transformations génétiques à l'aide de la souche MSU440 d'*Agrobacterium rhizogenes* (Fernández-Aparicio *et al.*, 2011; Goyet *et al.*, 2017; Libiaková *et al.*, 2018). Cependant, le choix de la souche d'*Agrobacterium* peut représenter un élément crucial qui peut influencer le



pourcentage de réussite de transformation, mais aussi affecter le développement de la plante si la virulence de la souche est trop importante. Par ailleurs, il est admis que *A. rhizogenes* perturbe l'équilibre hormonal en faveur de l'auxine, entraînant de ce fait la production de racines (Yamada, 1993). Ce dernier point peut donc constituer un biais dans la stratégie de transformation des microcals en représentant une source d'effets secondaires imprévisibles sur la formation de l'haustorium et sur l'interaction microcal/hôte (inhibition de la formation des EHS, faible taux de formation de hampes florales à partir des cals). Il est donc crucial de mettre au point une méthode de transformation des microcals de *P. ramosa* en testant au préalable différentes souches d'*A. rhizogenes* et aussi d'*A. tumefaciens*, de virulences variables, pour leur efficacité de transformation. Plusieurs souches existantes constituent ainsi de bon candidats pour ces tests comme la souche d'*A. rhizogenes*, Arqua I, de faible virulence qui n'a pas d'impact sur le phénotype racinaire, au contraire la souche K599 (NCPBP 2659) qui est plus virulente et peut entraîner une déformation des racines, et les souches d'*A. tumefaciens* LBA4404 ou EHA705 (Hoekema *et al.*, 1983; Quandt *et al.*, 1993; Hood *et al.*, 1993; Boisson-Dernier *et al.*, 2001; Kereszt *et al.*, 2007). En outre, Fernández-Aparicio *et al.* (2011) et Goyet, (2017) ont transformé des cals de *P. ramosa* en utilisant le gène rapporteur codant pour la protéine « Yellow Fluorescent Protein » (YFP), sous le contrôle d'un promoteur constitutif. La sélection en système bactérien est permise par la présence du gène *spec<sup>r</sup>* conférant la résistance à la spectinomycine et à la présence du gène *nptII* attribuant la résistance à la kanamycine pour la sélection *in planta* (Goyet, 2017). Ce vecteur s'avère intéressant pour réaliser les premiers tests de transformation des microcals en permettant une sélection visuelle par microscopie à épifluorescence. L'utilisation de ces différentes stratégies devraient permettre la mise au point d'un protocole de transformation génétique efficace des microcals.

Dans l'ensemble, cette étude constitue ainsi une avancée significative dans l'objectif de développer une méthode suffisamment robuste pour des études de validation fonctionnelle chez *P. ramosa*, qui permettra à terme d'en apprendre plus sur les mécanismes moléculaires inhérents à la formation de l'haustorium. Le développement d'un modèle génétique, bien qu'essentiel pour pouvoir mener des approches de biologie fonctionnelle chez l'Orobanche, n'a pas été fixé comme un objectif à ce travail de thèse en raison des nombreuses interrogations existantes encore sur le déterminisme moléculaire de l'induction haustoriale chez ces plantes parasites, dont l'étude est le point central de ces travaux de thèse (chapitre 2).



## **CHAPITRE 2**



## Chapitre 2. *Phelipanche ramosa* répond à un double signal haustoriogène contenu dans les extraits rhizosphériques des plantes hôtes

### I. Introduction

Au cours de leur évolution, les plantes parasites ont développé des caractéristiques uniques les conduisant à adopter un mode de vie hétérotrophe. Parmi les traits spécifiques développés par ces plantes lors de leur transition vers un mode de vie parasitaire, le développement d'un organe clé appelé haustorium représente à lui seul une adaptation morphologique remarquable. L'haustorium est ainsi essentiel pour la plante parasite afin de permettre l'invasion de la racine de l'hôte, la connexion au système vasculaire et l'exploitation des ressources de l'hôte (Yoshida *et al.*, 2016). Il a été montré que le développement de cet organe, et notamment la mise en place des structures haustoriales précoces (EHS, Early Haustorial Structures) chez certaines plantes parasites, était initié après la perception de molécules spécifiques exsudées par leurs plantes hôtes. Ces molécules, connues sous le nom d'HIFs, ont été caractérisées chez les plantes hémiparasites facultatives telles que *T. versicolor* ou obligatoires comme *S. hermonthica* et ont notamment pu être identifiées à partir du fractionnement biochimique d'extraits de plantes hôtes. Ainsi, les premières molécules inductrices d'haustoria découvertes, les flavonoïdes xenognosin A et B, ont été isolées à partir d'extraits foliaires de la légumineuse *Astragalus gummifer*. Par la suite, la forme quinone de l'acide syringique, le 2,6-diméthoxybenzoquinone (DMBQ), fut directement isolée et identifiée suite à l'abrasion des racines de sorgho (Chang and Lynn, 1986). La plupart des HIFs connus à ce jour ont donc ainsi été apparentés aux composés phénoliques. Ils induisent le développement des haustoria en faisant appel à un mécanisme d'oxydoréduction, incluant notamment les formes quinones de ces molécules (Bandaranayake *et al.*, 2010). Notamment chez *T. versicolor*, l'induction de l'haustorium par le DMBQ implique une signalisation comprenant les gènes *QR1* et *QR2* qui codent pour des quinones réductases, ainsi que le gène *Pirin* qui code pour un cofacteur de transcription (Bandaranayake *et al.*, 2010). Toutefois, si ces molécules de type phénolique sont actives chez les hémiparasites, elles n'ont aucun effet sur l'haustoriogénèse des espèces holoparasites comme *P. ramosa*, *P. aegyptiaca* et *O. cumana* (Yoshida *et al.*, 2016; Goyet *et al.*, 2017) et par conséquent, elles ne peuvent être considérées comme des HIFs universels.

Récemment, Goyet *et al.* (2017) ont toutefois pu montrer que la formation des EHS (papilles haustoriales) chez *P. ramosa* pouvait être induite par des substances présentes dans la rhizosphère de sa plante hôte, le colza. Un traitement des graines germées avec des extraits



rhizosphériques de *B. napus* permet en effet la formation d'EHS chez *P. ramosa* et augmente par la même occasion l'agressivité du parasite en favorisant le nombre d'accrochages et la formation de tubercules. Une analyse transcriptomique réalisée au cours du développement haustorial précoce en réponse aux extraits rhizosphériques de *B. napus* a dans le même temps mis en évidence la présence de transcrits différentiellement exprimés correspondants notamment à des gènes impliqués dans la signalisation hormonale. Une stratégie de fractionnement bio-guidée par HPLC inverse des extraits rhizosphériques de *B. napus* a permis de révéler que l'activité inductrice d'haustorium était présente dans deux fractions (9 et 16). Ces résultats, couplés à une analyse UPLC-MS bioguidée, ont alors pu montrer que la fraction 9 contenait des composés possédant des propriétés caractéristiques des CK sans pour autant permettre l'identification formelle de la ou des CK présentes. En revanche, aucune signature CK n'a pu être détectée dans la fraction 16 et aucun des standards CK ne co-élueait avec cette fraction lors de la chromatographie, suggérant que les fractions 9 et 16 ont des propriétés chimiques distinctes. De manière intéressante, l'ensemble des CK testées *in vitro* s'avèrent être capables d'induire des papilles haustoriales chez *P. ramosa*, avec des niveaux d'activités relatifs à la forme de leur squelette et à la présence ou non de résidus ribosides ou glucosides. Une analyse transcriptomique chez *P. ramosa*, en réponse à un traitement avec les extraits rhizosphériques de *B. napus*, ou une application exogène de CK (*c/tZ*), a de plus montré que les gènes *PrRR5*, *PrCKX2* et *PrCKX4* liés à la signalisation CK étaient surexprimés pendant la formation des papilles. Le gène *RR5* (Response Regulator 5) est surexprimé en réponse aux CK et code pour un régulateur de réponse de type A qui interviendrait dans la boucle de rétrocontrôle négatif de la réponse à ces molécules (Paul *et al.*, 2016). Les gènes *PrCKX2* et *PrCKX4* (cytokinines dehydrogenases/oxidases) codent pour des enzymes de dégradation/séquestration des CK qui permettent de contrôler l'abondance des CK dans les tissus par clivage de ces dernières (Schmülling *et al.*, 2003). Il a notamment pu être démontré chez *A. thaliana* que les CK étaient capables d'induire une accumulation de la plupart des transcrits des *CKXs* (Werner *et al.*, 2006).

L'implication des CK dans l'haustoriogenèse de *P. ramosa* complète ainsi les données présentes dans la littérature et souligne le rôle des régulateurs de croissance dans le développement haustorial chez le parasite et son développement au sein de l'hôte (Tomilov *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2015; Spallek *et al.*, 2017). Il a ainsi été montré par exemple que l'auxine est capable d'induire la formation des haustoria chez les plantes hémiparasites *T. versicolor* ou *P. japonicum*, mais cette dernière a l'effet inverse sur l'haustoriogenèse de *P. ramosa* (Keyes *et al.*, 2000; Tomilov *et al.*, 2005; Ishida *et al.*, 2016; Goyet *et al.*, 2017). Les CK quant à elles, sont connues pour induire le développement haustorial chez l'holoparasite de tige *Cuscuta* uniquement en l'absence de lumière et de contact avec l'hôte, sachant que le



seul un contact avec l'hôte suffit pour induire l'haustoriogénèse chez ces espèces (Shimizu and Aoki, 2019). Chez les hémiparasites *T. versicolor*, *P. japonicum* ou *S. asiatica*, les CK induisent la formation de structures relativement semblables aux haustoria formés en réponse au DMBQ (Wrobel and Yoder, 2001; Keyes *et al.*, 2001). Cette réponse hormonale constituerait donc potentiellement un mécanisme d'haustoriogénèse commun aux hémiparasites et aux holoparasites. Aussi, la mise en évidence du rôle des CK dans l'haustoriogénèse chez *P. ramosa* soulève de nombreuses questions concernant les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de ce processus, ainsi que sur les acteurs clés mobilisés dans le détournement du signal par la plante parasite.

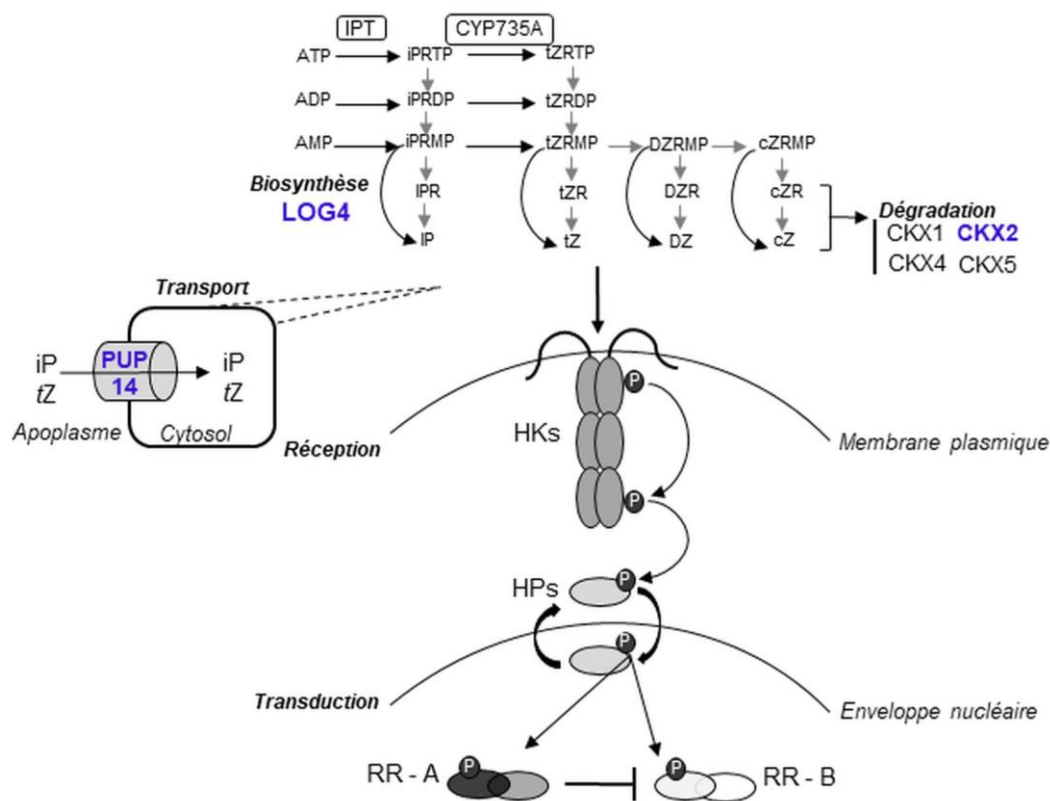
Notamment, l'haustoriogénèse déclenchée par les CK chez *P. ramosa* fait-elle intervenir les mêmes processus de perception que chez les plantes autotrophes en impliquant les récepteurs histidine kinase (HK) ? Initialement découvert chez les bactéries et les levures, le système de perception HK et de transduction caractérisé par une phosphorylation de l'histidine (His) vers l'aspartate (Asp) a ensuite été identifié chez les plantes autotrophes, comme *A. thaliana*, en étant impliqué dans perception des phytohormones telles que l'éthylène et les CK (Suzuki *et al.*, 2001). Ce sont ainsi trois protéines homologues, CRE1/AHK4, AHK2 et AHK3 qui ont été identifiées chez *A. thaliana* comme des récepteurs HK percevant les CK (Suzuki *et al.*, 2001; Ueguchi *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2001). De manière intéressante, ces protéines sont capables de reconnaître différentes CK en établissant des liaisons spécifiques au niveau de leur domaine extracellulaire CHASE (Romanov, 2002). L'utilisation de CK marquées a ainsi permis de révéler des spécificités de ligand pour chaque récepteur. La protéine AHK3 s'est ainsi révélée être spécifique de la *tZ* tandis que AHK4 se lie aussi bien à la *tZ* qu'à l'iP (Spíchal *et al.*, 2004). Cette spécificité de ligand conduit ainsi à des réponses physiologiques propres à chaque récepteur. Des approches par mutagénèse ont notamment permis de leur assigner des fonctions spécifiques dans la régulation de processus particuliers (Riefler *et al.*, 2006; Dautel *et al.*, 2016). Ainsi, AHK2 et AHK3 ont un rôle prédominant dans le contrôle quantitatif de la croissance des organes, avec des fonctions opposées dans les racines et les jeunes pousses (Riefler *et al.*, 2006). Il a également pu être mis en évidence que AHK4 et AHK3 étaient spécifiquement impliqués dans le développement vasculaire précoce et dans la différenciation cellulaire au niveau du méristème racinaire (Mähönen *et al.*, 2000). La plupart des mutations simples des AHK ont ainsi révélé des fonctions redondantes mais différenciées pour chaque récepteur, impliquant des spécificités de réponse pour chacun.

Goyet *et al.* (2017) ont pu démontrer que le 6-(2-hydroxy-3-méthylbenzylamino)-purine (PI-55), un inhibiteur compétitif de la BAP dont la cible est le récepteur AHK4, était capable d'inhiber la formation d'EHS chez *P. ramosa* en co-traitement avec la BAP, confirmant ainsi l'implication de ce récepteur dans ce processus. En considérant les propriétés spécifiques des



CK à activité haustoriogène, certains récepteurs HK seraient susceptibles d'être plus spécifiquement sollicités lors de la perception de ce signal. Aussi, nous pouvons nous demander quels sont les récepteurs chez *P. ramosa* qui participent réellement à la perception des CK en induisant l'haustoriogenèse chez cette espèce ? Existe-t-il une forme d'adaptation de la plante parasite en comparaison avec les plantes autotrophes pour la perception de ce signal hormonal ?

D'autres analogies concernant des mécanismes moléculaires peuvent également être considérées entre les plantes parasites et les plantes autotrophes. En effet, chez les plantes parasites, nous savons que les EHS dérivent de l'expansion des cellules rhizodermiques périphériques (Chang and Lynn, 1986; Joel *et al.*, 2013; Goyet *et al.*, 2017). Une telle origine rapproche ainsi les EHS des poils absorbants et des trichomes des plantes autotrophes qui sont également issus de l'accroissement d'une seule cellule épidermique (Mendoza and Alvarez-Buylla, 2000). Il serait donc possible que des mécanismes de régulation et des acteurs moléculaires intervenant dans le développement de ces structures soient également impliqués dans le développement de l'haustorium. Une analyse transcriptomique utilisant une approche par microarray, réalisée par Goyet *et al.* (2017), a permis de mettre en évidence un pool d'environ 3000 séquences différentiellement exprimées en réponse aux extraits rhizosphériques de *B. napus*, contenant des gènes candidats potentiellement impliqués dans l'initiation des EHS. De manière intéressante, en se focalisant sur les gènes impliqués dans les voies de signalisation de réponse hormonale et plus particulièrement celle des CK, des gènes d'intérêt participant à la régulation des trichomes ou des poils absorbants ont pu être mis en avant. Notamment, deux gènes ont pu être identifiés comme étant surexprimés pendant le développement précoce de l'haustorium. Ainsi, le gène ZINC FINGER PROTEIN 6 (*ZFP6*), qui appartient à la voie de signalisation permettant la différenciation des trichomes (Zhou *et al.*, 2013), et le gène TORNADO2 (*TRN2*) qui aurait un rôle dans la formation de poils absorbants (Cnops *et al.*, 2000), ont été sélectionnés. Cependant, l'implication de ces gènes dans l'haustoriogenèse chez *P. ramosa* ainsi que les voies de signalisation empruntées restent à déterminer. De plus, il a été mis en évidence par Goyet *et al.* (2017) que les extraits rhizosphériques de colza contenaient un double signal haustoriogène, à travers la présence de deux fractions actives (n°9 et 16). La fraction 9 contiendrait des CK, tandis que la fraction 16 contiendrait des molécules avec des propriétés chimiques bien distinctes des CK. Ainsi, si ces deux fractions contiennent des molécules *a priori* différentes mais capables d'induire la formation d'EHS, nous pouvons donc nous demander quelle est l'origine et quelles sont les voies de signalisation empruntées par ces deux signaux, et s'il existe une interaction entre eux.



**Figure 2.1. Voie de signalisation des cytokinines et étapes ciblées dans l'étude pour la caractérisation de mutants et la lignée transgénique.**

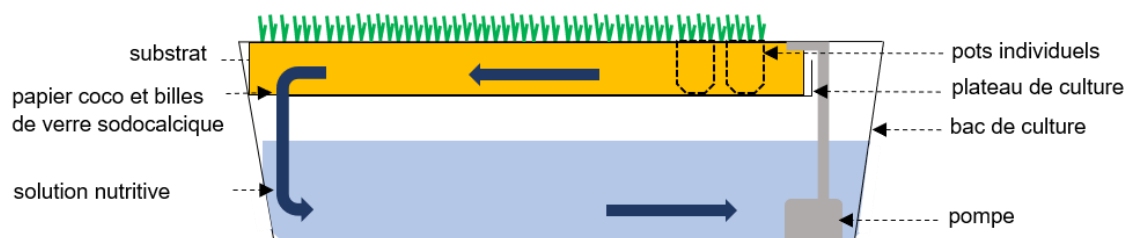
La biosynthèse des CK fait intervenir LOG4. La dégradation des CK sous forme active est permise par les enzymes CKXs faisant intervenir les gènes *CKX1*, *CKX2*, *CKX4* et *CKX5*. Le transporteur PUP14 permet l'internalisation des CK dans le cytosol. IPT : Isopentenyl Transférase, CYP : Cytochrome, LOG : Lonely Guy, CKXs : Cytokinine Oxydases, HKs : Histidines Kinases, HPs : Histidines Phosphotransfers, RR-B/A : Response Regulator de type B ou A. En violet, les étapes ciblées lors de notre étude.

**Tableau 2.1. Liste des mutants d'*A. thaliana* pour la biosynthèse et le transport des cytokinines ainsi que les couples d'amorces utilisés pour la confirmation moléculaire.**

Les graines des mutants *log4* et *pup14* dans le fond génétique de l'écotype sauvage Col-0 ont été commandées auprès de la banque de graines d'*Arabidopsis* NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, Nottingham, Royaume Uni). Ce sont des mutants d'insertion avec une résistance à la kanamycine.

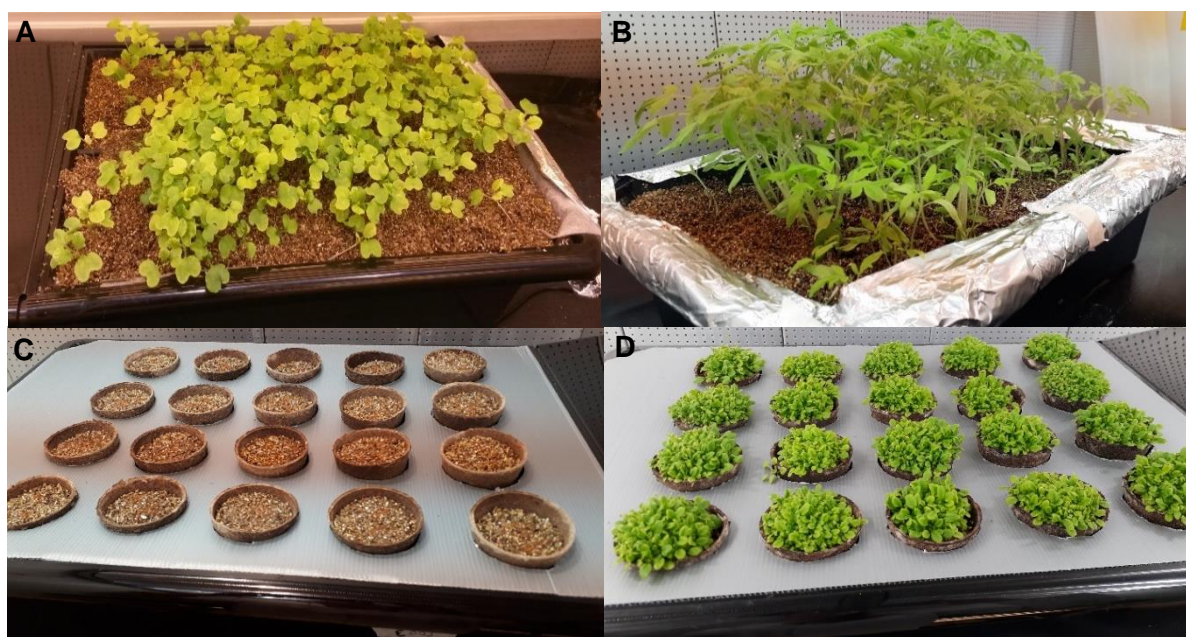
Rôle	Nom	Code NASC	Amorces forward and reverse 5'→ 3'	
Biosynthèse	LOG4	N543789	LOG4_LP	TGCATTTATGGATGTGTGTGC
			LOG4_RP	TTTGGCTTTTTGGCATATGAG
Transport	PUP14	N504230	PUP14_LP	ACTTGACCCTAAAGCAGGCTC
			PUP14_RP	TCAACCAATCAAAAACCAAGC

Les CK, notamment connues pour jouer un rôle crucial dans la signalisation intra-plante régulant des mécanismes physiologiques incluant la division cellulaire, la régulation de la domination apicale ou la transmission des réseaux nutritionnels (Novák *et al.*, 2008), apparaissent donc ici jouer également un rôle dans la signalisation inter-plantes au niveau de la rhizosphère. Compte tenu de la complexité de l'interface « rhizosphère » et du faible nombre de données bibliographiques dans ce domaine, la question de l'origine des CK présentes au voisinage des racines de la plante hôte se pose. Il est notamment important de savoir si elles sont bien issues de cette dernière. En effet, bien que des CK à activité haustoriogène aient pu être détectées dans la fraction 9 des extraits rhizosphériques du colza (Goyet *et al.*, 2017), la méthode de collecte de ces derniers ne permet pas d'exclure une origine microbienne pour les molécules de type CK retrouvées dans cette fraction. Les CK sont en effet connues pour être des molécules conservées chez les organismes présents dans la rhizosphère et peuvent être notamment produites par les bactéries ou les champignons (Stirk and Van Staden, 2010). Par ailleurs, si les CK sont réellement produites par la plante hôte, cela interroge également sur les mécanismes qui régissent alors l'accumulation de ces composés dans la rhizosphère. L'existence chez *Arabidopsis* d'une large diversité de mutants pour différentes étapes de la voie de synthèse et de transport des CK nous offre la possibilité de confirmer le rôle de ces CK potentiellement exsudées dans l'induction haustoriale, tout en précisant les mécanismes conduisant à l'exsudation de ces phytohormones dans la rhizosphère. Afin de clarifier l'origine des CK, des mutants de perte de fonction pour la biosynthèse et le transport ainsi qu'une lignée transgénique pour la dégradation des CK ont été choisis (**Figure 2.1**). Ainsi, si une altération de ces différentes étapes liée aux mutations se répercutait également sur l'exsudation des CK dans la rhizosphère, cela devrait se traduire par un changement dans l'activité d'induction haustoriale, reflétant ainsi l'origine des CK présentes dans la rhizosphère. Le mutant *log4*, dont l'enzyme correspondante est impliquée dans l'activation des CK au niveau des tissus racinaires (Kuroha *et al.*, 2009), a notamment été sélectionné pour cette étude. La perte de fonction de ce gène est connue pour entraîner une diminution de la production de CK actives (non conjuguées) dans la plante (Tokunaga *et al.*, 2012). Le mutant *pup14* impacté au niveau d'une purine perméase, qui autorise le transfert des CK actives depuis l'apoplasme vers le symplasme, a également été choisi. La mutation présente chez ce dernier pourrait alors permettre d'augmenter la quantité de CK dans le compartiment apoplastique et potentiellement son exsudation (Chang *et al.*, 2013a). Enfin, la lignée transgénique 35S:CKX2, possédant une dégradation/séquestration des CK modifiée, a également été utilisée. Cette dernière correspond à une lignée gain de fonction chez qui, de par la surexpression du gène codant pour CKX2, la quantité de CK actives dans la plante est affectée (Zürcher *et al.*, 2016).



**Figure 2.2. Dispositif expérimental pour la production des extraits rhizosphériques de *B. napus*, *S. lycopersicum* et *A. thaliana*.**

Système de culture hydroponique comprenant un plateau supérieur de culture et un système de recirculation de la solution nutritive. Pour les cultures de *B. napus* et *S. lycopersicum*, le substrat composé de vermiculite reposait sur du papier coco et des billes de verre sodocalcique laissant passer les racines. Les graines ont été semées directement dans une couche de vermiculite de 3 cm d'épaisseur. Les graines d'*A. thaliana* ont été semées dans des pots individuels poreux contenant un mélange de vermiculite et sable (1/1, v/v). Les plants ont été arrosés toutes les 6 heures pendant 30 min grâce une pompe de recirculation disposée dans le bac inférieur avec 5 L de Coïc 50% (v/v) (pH 6) pour les cultures de *B. napus* et *S. lycopersicum*, et 5 L de TT 50% (v/v) (pH 6) pour les plants d'*A. thaliana*. Le plateau de culture était légèrement incliné pour permettre l'écoulement des extraits rhizosphériques qui sont récupérés chaque semaine dans le bac inférieur. Le milieu était renouvelé 1 fois par semaine avec l'ajout de 5 L dans le bac inférieur.



**Figure 2.3. Culture hydroponique des plants de *B. napus*, *S. lycopersicum* et *A. thaliana*.**

Les graines de *B. napus* et *S. lycopersicum* ont été semées à raison de 400 graines par plateau dans une couche de vermiculite de 3 cm d'épaisseur. Les plants après 3 semaines de culture pour *B. napus* (A) et *S. lycopersicum* (B). Les graines d'*A. thaliana* (Col-0) ont été semées dans des pots individuels à raison de 2,5 mg/pot (C). Les plants d'*A. thaliana* (Col-0) âgés de 2 semaines (D) se sont développés dans un mélange de vermiculite et sable (1/1, v/v).

A travers ce chapitre, nous avons donc d'une part caractérisé le signal haustoriogène en déterminant s'il s'agit d'une réponse commune à d'autres plantes, tout en précisant les acteurs de la perception et les voies de réponses moléculaires participant à l'haustoriogenèse de *P. ramosa*. D'autre part, nous avons également déterminé l'origine des CK à activité haustoriogène présentes dans la rhizosphère de la plante hôte à travers l'utilisation de mutants et transformants d'*Arabidopsis*. Enfin, nous avons décrypté le double signal haustoriogène présent dans les extraits rhizosphériques de la plante hôte, ici *Arabidopsis*.

## II. Matériel et Méthodes

### 1. Matériel végétal

Les graines de *P. ramosa* (L.) Pomel et d'*Orobanche cumana* Wallr. ont été récoltées en 2014 et 2017 respectivement à partir d'hampes florales collectées dans un champ de colza (*Brassica napus* L.) à Saint-Martin-de-Fraigneau (Vendée, France) et dans un champ de tournesol (*Helianthus annuus* L.) à Longeville-sur-mer (Pays-de-Loire, France). Les graines d'une taille de 180 à 200 µm ont été sélectionnées par tamisage pour leur taux de germination maximum avant d'être conservées à l'obscurité à 25°C. Les graines de colza (*Brassica napus*) de la variété ES Aliénor (cultivar sensible, EURALIS, Lescar, France), et de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), de la variété Saint-Pierre (CAILLARD, Avignon, France), ont été choisies pour les tests d'exsudation et de co-culture.

Avant chaque utilisation, les graines ont été désinfectées en surface selon le protocole établi par Lechat *et al.*, (2012) comprenant une immersion de 5 min dans une solution d'hypochlorite de sodium 2,4% (v/v), puis 3 rinçages vigoureux de 30 s à l'eau distillée, suivis de 3 rinçages de 5 min à l'eau distillée.

Les graines désinfectées de *P. ramosa* ont ensuite été suspendues dans 10 mL de milieu d'incubation contenant 1 mM de tampon HEPES (pH 7,5, ajusté au KOH 1 M) et 0,1% (p/v) de PPM (Plant Preservative Mixture, Kayls, Bernin, France) avec un ratio de 10 mg de graines par mL. Les graines ont été ainsi conditionnées à l'obscurité à 21°C pendant un minimum de 7 jours (Lechat *et al.*, 2015) en tubes Falcon 50 mL (Dutscher, Brumath, France).

Les graines d'*A. thaliana* de type sauvage (écotype Columbia, Col-0) ont été gracieusement fournies par le Dr. David C. Nelson (University of California Riverside, États-Unis). Les graines des mutants *log4* et *pup14* dans le fond génétique de l'écotype sauvage Col-0 ont été commandées auprès de la banque de graines d'*Arabidopsis* NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, Nottingham, Royaume Uni) (**Tableau 2.1**). Les graines transgéniques 35S:CKX2 ont été gracieusement fournies par le Dr. Tomas Werner (Freie Universität Berlin,

**Tableau 2.2. Masses sèches de racines et volumes d'extraits rhizosphériques concentrés par SPE inverse pour les différents génotypes d'*A. thaliana*.**

Les racines ont été récoltées, déshydratées et pesées au terme des 7 semaines de culture. Les extraits rhizosphériques ont été récoltés et filtrés (0,22 µm). Le volume d'extraits concentrés par SPE inverse correspondait au mélange de la moitié des volumes récoltés pour les semaines avec la plus forte activité haustoriogène (semaines 4, 5, 6).

Génotype	Masse sèche racinaire (g)	Volume d'extraits rhizosphériques concentrés par SPE inverse (L)
Col-0	4,4	3,8
<i>log4</i>	8,1	2,0
<i>pup14</i>	1,8	2,6
35S:CKX2	3,9	3,8

**Tableau 2.3. Volumes des extraits rhizosphériques les plus actifs concentrés par SPE inverse chez *B. napus*, *S. lycopersicum*, *A. thaliana*.**

Les extraits rhizosphériques ont été récoltés et filtrés (0,22 µm). Le volume d'extraits rhizosphériques concentrés par SPE inverse correspond au mélange des semaines avec la plus forte activité haustoriogène : les semaines 3, 4, 5 pour *B. napus* et 4, 5, 6 pour *S. lycopersicum* et *A. thaliana*.

Culture	Volume d'extraits rhizosphériques concentrés par SPE inverse (L)
<i>B. napus</i>	11,0
<i>S.lycopersicum</i>	7,2
<i>A. Thaliana</i> (Col-0)	3,8

Allemagne) (Werner *et al.*, 2003). Les graines d'*A. thaliana* ont été désinfectés en surface par une immersion de 5 min dans de l'éthanol 70% (v/v) supplémenté avec 0,05% (p/v) de SDS (dodécylsulfate de sodium, Sigma-Aldrich, Etats-Unis), puis 5 min dans de l'éthanol seul à 90% (v/v). Les plants ont été ensuite cultivés dans un mélange stérile de tourbe et de sable (3/1, v/v) à 21°C le jour et 17°C la nuit, pour une photopériode de 16h/8h sous un éclairage de 100  $\mu\text{mol PAR/m}^2/\text{s}$ . Les siliques matures ont été séchées pendant quinze jours, permettant de collecter les graines qui ont été ensuite post-maturées au sec à l'obscurité et à température ambiante pendant 3 mois minimum avant leur utilisation (Brun *et al.*, 2019).

## 2. Production des extraits rhizosphériques

Les plants de colza, de tomate et d'*A. thaliana* ont été cultivés en hydroponie pendant 7 à 9 semaines en conditions de jours longs (16 h jour, 8 h nuit), pour une humidité relative de 75% le jour, de 70% la nuit et une température constante de 21°C. Le système d'exsudation est constitué d'un bac inférieur contenant le milieu nutritif surmonté d'un plateau de culture (système NFT GroTank 205 Nutriculture, 70x40x20 cm, Hydro&Culture, France) comprenant du papier film nutritif (Hydro&Culture, France). L'arrosage des plants sur le plateau de culture est permis par capillarité du film nutritif, lui-même imbibé grâce à une pompe de recirculation dans le bac inférieur fonctionnant 30 minutes toutes les 6 heures (**Figure 2.2**).

Pour les expériences d'exsudation de colza et de tomate en bacs hydroponiques, 400 graines désinfectées ont été directement semées sur le plateau supérieur dans une couche de vermiculite (CECOVAL, France) de 3 cm d'épaisseur reposant sur un tapis de billes de verre sodocalcique de 3 mm de diamètre (Dutscher, France) (**Figure 2.3.A.B**). Les graines d'*A. thaliana* ont été semées dans des pots individuels poreux de 6 cm de haut (JIFFY A/S, Danemark) contenant un mélange de vermiculite, sable (1/1, v/v), à raison de 2,5 mg de graines par pot et 20 pots par plateau (**Figure 2.3.C.D**). Les plants de colza et de tomate ont été arrosés avec 5 L de solution nutritive stérile de Coïc basique 50% (v/v) à pH 6,8 (Lesaint, 1981) et de TT 50% (v/v), pH 6 (Tadano and Tanaka, 1976) pour *A. thaliana*. Le milieu contenant les extraits rhizosphériques a été récolté chaque semaine dans le bac inférieur avant d'être remplacé par un nouveau volume de milieu nutritif stérile (5 L) correspondant. Pour les différents génotypes d'*A. thaliana*, la masse racinaire sèche a été évaluée en récoltant les racines en fin de culture avant de les déshydrater et de les peser (**Tableau 2.2**).

## 3. Purification bio-guidée des HIFs

Avant chaque test d'activité haustoriogène (fréquence hebdomadaire), la totalité des extraits rhizosphériques a été filtrée sur une membrane de 0,22  $\mu\text{m}$  (Durapore, Sigma-Aldrich,

**Tableau 2.4. Intervalles des temps d'éluion lors du fractionnement par HPLC inverse des extraits rhizosphériques de *B. napus*, *S. lycopersicum* et *A. thaliana* (d'après Goyet, 2017).**

Les extraits SPE produits à partir des extraits rhizosphériques ont été évaporés et solubilisés dans l'acétonitrile 50% (v/v) avant d'être fractionnés par HPLC inverse en 24 fractions avec un temps d'éluion compris entre 0 et 40 min.

Fraction	Intervalle de temps d'éluion (min)	Volume récolté (mL)
1	0 - 5	3
2	5 - 11	3
3	11 - 13	1
4	13 - 15	1
5	15 - 17	1
6	17 - 18	0,5
7	18 - 19	0,5
8	19 - 20	0,5
9	20 - 21	0,5
10	21 - 22	0,5
11	22 - 23	0,5
12	23 - 24	0,5
13	24 - 25	0,5
14	25 - 26	0,5
15	26 - 27	0,5
16	27 - 28	0,5
17	28 - 29	0,5
18	29 - 30	0,5
19	30 - 31	0,5
20	31 - 32	0,5
21	32 - 33	0,5
22	33 - 35	1
23	35 - 37	1
24	37 - 39	2

Etats-Unis). Les extraits rhizosphériques présentant le maximum d'activité haustoriogène ont été ensuite regroupés (**Tableau 2.2, Tableau 2.3**) avant d'être concentrés par extraction en phase solide inverse (SPE) en utilisant le kit Strata-x 33u Polymeric Reversed Phase (Phenomenex, Etats-Unis) selon le protocole du fabricant. Les composés actifs fixés par la colonne ont été ainsi élués avec 4 mL d'acétonitrile 100% (v/v) (Goyet *et al.*, 2017). L'éluât a été ensuite évaporé à l'aide d'un piège à vapeur rotatif R II Rotavapor (Buchi, Suisse). Enfin, le dépôt a été solubilisé dans un volume final de 100 µL d'acétonitrile 50% (v/v).

Le fractionnement des produits SPE a été réalisé par HPLC (High Performance Liquid Chromatographie) inverse (Hitachi Elite LaChrom HPLC, VWR, Etats-Unis) avec une colonne Kromasil C18, 5 µm, 250x4,6 mm (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) et une colonne de garde Kromasil C18, 5 µm (Sigma-Aldrich, Etats-Unis). Les solutions d'éluion utilisées étaient de l'eau ultra pure acidifiée avec 0,1% (v/v) d'acide acétique (solution A) et de l'acétonitrile pur acidifié avec 0,1% (v/v) d'acide acétique (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) (solution B). Les gradients d'éluion A : B ont été établis sur une durée de 50 minutes avec une colonne à 30°C selon (Goyet *et al.*, 2017). Quatre-vingt-dix µL des extraits rhizosphériques concentrés par SPE inverse ont été ainsi fractionnés en 24 fractions sur un palier de temps de 39 min selon leurs différents temps d'éluion (**Tableau 2.4**).

#### 4. Identification et quantification des composés actifs par UPLC-MS/MS

Les 24 fractions issues des extraits rhizosphériques d'*A.thaliana* Col-0 ainsi que le produit SPE correspondant ont été lyophilisés et transmis au LGR (Laboratory of Growth Regulators, Université Palacký, Olomouc, République tchèque) pour des analyses d'identification et de quantification des CK.

L'analyse de quantification des CK dans l'extrait SPE a été réalisée par spectrométrie de masse MS/MS en tandem quadripôle-temps de vol (QqTOF) (Antoniadi *et al.*, 2015). Un mélange de 20 µL de standards de CK marquées au tritium ( $[^3\text{H}]cZ$ ,  $[^3\text{H}]tZR$ ,  $[^3\text{H}]iPR$ ) a été spécifiquement ajouté à l'extrait brut avant la procédure de purification par SPE inverse afin de calculer le rendement de purification par les colonnes SPE. La quantité de chaque CK détectée dans l'extrait SPE a été exprimée en mol par gramme de matière racinaire sèche (mol/g MS).

L'identification des CK dans les 24 fractions a été réalisée par UPLC-ESI(+)-MS/MS avec l'utilisation d'un système Acquity UPLC® BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 150 mm, Waters (Millford, USA), couplé à un spectromètre de masse triple quadripôle Xevo™ TQD (Waters MS Technologies, UK) (Svačinová *et al.*, 2012). Chaque spectre de fragmentation obtenu est associé à une CK. Les données ont été exprimées selon la valeur de l'aire sous la courbe du

**Tableau 2.5. Facteurs de corrections appliqués aux données de quantification et d'identification des cytokinines dans les extraits rhizosphériques d'*A. thaliana*.**

Afin de déterminer l'activité haustoriogène relative de chaque CK, des facteurs de correction ont été appliqués sur les données de quantification et d'identification des CK dans les extraits d'*A. thaliana* (Col-0). Le premier facteur de correction prend en compte les concentrations efficaces de chaque CK pour lesquelles 50% de formation d'EHS est stimulée (EC50) par rapport à la CK la plus active, la *tZ* (Ec50  $1,1 \cdot 10^{-8} \pm 1,6 \cdot 10^{-9}$ ) (Goyet *et al.*, 2017). Le second facteur de correction tient compte de l'activité haustoriogène maximale des CK en étant basé sur la CK la plus active, la *tZ* ( $61 \pm 4\%$  d'EHS). L'activité haustoriogène (Ec50 et activité haustoriogène maximale) des composés iPR, iP9G, cZR, et cZ7G n'ayant pas été testée, les facteurs de corrections correspondants n'ont pu être déterminés.

Composés	Ec50	Facteur de correction Ec50	Activité haustoriogène maximale	Facteur de correction activité haustoriogène maximale
<i>tZ</i>	$1,1 \cdot 10^{-8}$	<b>1,0</b>	61	<b>1,0</b>
<i>tZR</i>	$4,3 \cdot 10^{-7}$	<b><math>2,5 \cdot 10^{-2}</math></b>	64	<b>1,2</b>
<i>cZ</i>	$9,8 \cdot 10^{-6}$	<b><math>1,1 \cdot 10^{-3}</math></b>	73	<b>1,2</b>
<i>cZR</i>	/	/	/	/
<i>cZ7G</i>	/	/	/	/
iP	$2,0 \cdot 10^{-6}$	<b><math>5,4 \cdot 10^{-3}</math></b>	90	<b>1,5</b>
iPR	/	/	/	/
iP7G	$5,5 \cdot 10^{-5}$	<b><math>2,0 \cdot 10^{-4}</math></b>	9	<b>0,1</b>
iP9G	/	/	/	/
DHZ	$4,7 \cdot 10^{-8}$	<b><math>2,3 \cdot 10^{-1}</math></b>	83	<b>1,4</b>
DHZOG	$1,1 \cdot 10^{-7}$	<b><math>1,0 \cdot 10^{-1}</math></b>	61	<b>1,0</b>
DHZ7G	$1,8 \cdot 10^{-6}$	<b><math>6,0 \cdot 10^{-3}</math></b>	55	<b>0,9</b>
K	$3,3 \cdot 10^{-5}$	<b><math>3,2 \cdot 10^{-4}</math></b>	91	<b>1,5</b>

pic chromatographique obtenu pour chaque CK en sélectionnant les données en aire sous la courbe qui sont supérieures à 3000 (seuil de significativité).

Pour révéler les CK impliquées dans l'activité haustoriogène, les données de quantification (extraits SPE) et d'identification (fractions UPLC) des CK ont été traitées par la suite séparément, en tenant compte de l'activité haustoriogène relative de chaque CK pour appliquer un facteur de correction. Pour cela, les concentrations efficaces de chaque CK pour lesquelles 50% de formation d'EHS est stimulée (Ec50) ont été prises en compte par rapport à la CK la plus active, la *tZ* (Ec50  $1,1 \cdot 10^{-8} \pm 1,6 \cdot 10^{-9}$ ), ainsi que l'activité haustoriogène maximale des CK en étant basé sur la *tZ* (pourcentage maximal d'induction des EHS de  $61 \pm 4\%$ ). L'application du facteur de correction aux données de quantification et d'identification a permis d'obtenir une activité haustoriogène relative des CK détectées dans les extraits et fractions (**Tableau 2.5**). En revanche, l'activité haustoriogène (Ec50 et activité haustoriogène maximale) de l'iPR, l'iP9G, la *cZR*, et la *cZ7G* n'ayant pas été testée, les activités haustoriogènes relatives correspondantes n'ont pu être déterminées pour ces composés.

Une analyse d'identification des composés présents dans la fraction 16 issue des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* a pu être réalisée par UPLC-MS/MS au laboratoire BBV (Biomolécules et Biotechnologies Végétales, Université de Tours, Tours, France), en comparaison avec une fraction non active (fraction 12 d'*A. thaliana*). Les extraits lyophilisés ont été de nouveau suspendus dans de l'acétonitrile 50% (v/v), puis centrifugés à 18000 g pendant 10 min à 18°C. Vingt-cinq  $\mu\text{L}$  de surnageant ont directement été utilisés pour les analyses UPLC-MS. Les analyses UPLC-DAD-MS ont été réalisées sur un système ACQUITY™ Ultra Performance Liquid Chromatography couplé à un détecteur UV à barrette de diodes (PDA, 200-500 nm) et à un spectromètre de masse triple quadripôle de type XEVO-TQD. Ce spectromètre de masse est équipé d'une source d'ionisation de type electrospray et est contrôlé par le logiciel Masslynx 4.1 (Waters, Milford, MA). La séparation des échantillons a été réalisée sur une colonne de type C18 Waters Acquity HSST3 (150 mm x 2,1 mm i.d., 1,8  $\mu\text{m}$ ) avec un débit de 0,4 mL/min à 55°C. Le volume d'injection a été de 5  $\mu\text{L}$ . Le solvant A était constitué d'eau acidifié avec 0,1% (v/v) d'acide formique tandis que le solvant B contenait de l'acétonitrile acidifié avec 0,1% (v/v) d'acide formique. Quatre gradients d'élution linéaires ont été testés en faisant varier le solvant B en 18 min de 5% à 50%, de 10% à 70%, de 40% à 80% et de 50% à 100%, afin d'assurer la séparation chromatographique optimale des analytes. Les métabolites ont été analysés simultanément en modes d'ionisation positive et négative. Les tensions de cône et de capillaire étaient respectivement de 30-50-80 V et 3000 V. Les débits de gaz de cône et de désolvatation étaient respectivement de 60 et 800 L/h. De plus, des spectres MS/MS d'ions fils de l'ion parent  $m/z$  425 ont été acquis en mode positif avec une tension de cône de 30 V et un ramp d'énergie de collision de 5 à 60 eV.

**Tableau 2.6. Liste des cytokinines testées pour leur activité haustoriogène (d'après Goyet *et al.*, 2017).**

Les composés proviennent de Olchemin (Olomouc, République Tchèque) hormis les composés iP, K, BAP, TDZ issus de Sigma-Aldrich (Etats-Unis). Les solutions mères ont été préparées dans 50% (v/v) d'acétonitrile pour une concentration de 10 µM.

Nom	Abréviation
<i>cis/trans</i> zéatine	<i>c/tZ</i>
<i>cis</i> zéatine	<i>cZ</i>
<i>trans</i> zéatine	<i>tZ</i>
<i>trans</i> zéatine riboside	<i>tZR</i>
<i>trans</i> zéatine-O-glucoside	<i>tZOG</i>
<i>trans</i> zéatine riboside-O-glucoside	<i>tZROG</i>
dihydrozéatine	DHZ
dihydrozéatine riboside	DHZR
dihydrozéatine-O-glucoside	DHZOG
dihydrozéatine riboside-O-glucoside	DHZROG
dihydrozéatine-7-glucoside	DHZ7G
isopentényl adénine	iP
isopentényl adénosine	iPR
isopentényl adénosine	iP7G
<i>meta</i> -topoline	<i>mT</i>
kinétine	K
6-benzylaminopurine	BAP
thidiazuron	TDZ

**Tableau 2.7. Liste des inhibiteurs pharmacologiques testés.**

Le PI-55 et le LGR-991 ont été gracieusement fournis par le Dr. Lukáš Spíchal (Université de Olomouc, République tchèque). L'ANA, l'ABA, le DPI, l'umbelliférone, le benzoate de potassium, l'acide ascorbique et le SHAM proviennent de Sigma-Aldrich (Etats-Unis). Les solutions mères ont été préparées dans 50% (v/v) d'acétonitrile pour une concentration de 10 µM.

Nom	Abréviation	Rôle
(6-(2-hydroxy-3-méthylbenzylamino)-purine)	PI-55	Dérivés de la BAP se fixant sur les récepteurs AHK3 et AHK4 (Spíchal <i>et al.</i> , 2009)
(6(2,5-Dihydroxybenzylamino)-purine)	LGR-991	
Auxine	ANA	Phytohormone
Acide abscissique	ABA	Phytohormone
Diphenyleneiodonium chloride	DPI	Inhibiteur du complexe NADPH oxydase
Benzoate de potassium	-	Fixateur d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Umbelliférone	-	Modulateur de peroxydase
Acide ascorbique	-	Fixateur de dérivé réactif de l'oxygène
Salicylhydroxamic acid	SHAM	Inhibiteur de peroxydase (Wada, Cui, Yoshida, 2019)

Enfin, une analyse par spectrométrie de masse à haute résolution a été réalisée sur un appareil de type Q-TOF.

### 5. Tests d'induction haustoriale chez *P. ramosa* et traitements chimiques

Les graines de *P. ramosa* conditionnées ont été rincées 3 fois dans l'eau distillée puis suspendues dans 10 mL de milieu d'incubation (HEPES 0,5 mM, pH 7,5, PPM à 0,05% p/v) pour un ratio de 2,5 mg de graines par mL. La germination des graines a été induite en tube de 50 mL par ajout de la strigolactone de synthèse *rac*-GR24 (fournie gracieusement par le Dr. Binne Zwanenburg et dissoute dans 50% v/v d'acétonitrile) pour une concentration finale de  $10^{-7}$  M.

Cinquante  $\mu$ L de graines ainsi traitées (environ 25 graines) ont été ensuite réparties en plaques 96 puits (Cell Culture Multiwell Plate Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Allemagne) avant d'être incubées à l'obscurité à 21°C pendant 4 jours.

Au terme des 4 jours d'incubation, la germination a été évaluée et le milieu ayant servi pour la déclencher a été retiré des puits avant de déposer 100  $\mu$ L des extraits biologiques ou des molécules à tester dilués dans le milieu d'incubation (HEPES 0,5 mM, pH 7,5, PPM à 0,05% p/v). L'activité haustoriogène a été évaluée pour des dilutions de  $5 \cdot 10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$  pour les extraits rhizosphériques, les produits SPE et les fractions et pour des concentrations de  $10^{-4}$  M à  $10^{-14}$  M pour les CK (solubilisées dans 50% v/v d'acétonitrile, **Tableau 2.6**). Pour les co-traitements, 50  $\mu$ L des inhibiteurs pharmacologiques (dissous dans l'acétonitrile 50% v/v) (**Tableau 2.7**), ont été ajoutés pour des concentrations de  $10^{-3}$  M à  $10^{-10}$  M à 50  $\mu$ L d'extraits biologiques ou de CK. La *cis-trans*-zéatine (*ctZ*) à  $10^{-7}$  M a été utilisée comme témoin positif de l'induction haustoriale et les contrôles négatifs ont été réalisés avec 0,1% d'acétonitrile dans le milieu d'incubation (HEPES 0,5 mM, pH 7,5, PPM à 0,05% p/v).

Les plaques ont été ensuite incubées à l'obscurité à 21°C pendant 3 jours au terme desquels le pourcentage de graines germées ayant développé des structures haustoriales précoces (EHS) a été évalué à l'aide d'une loupe binoculaire (Olympus SZX10 ; Olympus Europa GmbH, Hambourg, Allemagne). Afin de caractériser les mutants et la lignée transgénique d'*A. thaliana*, les masses racinaires sèches de chaque génotype ont été évaluées en fin de culture, après une incubation des systèmes racinaires à 80°C pendant 24 heures. Ces dernières nous ont ainsi permis de prendre en compte l'impact des altérations entraînées sur la croissance racinaire chez ces génotypes par rapport au phénotype de l'écotype sauvage Col-0 (**Tableau 2.2**). Afin de comparer les activités haustoriogènes des extraits rhizosphériques de ces différents génotypes d'*A. thaliana*, un facteur de correction a été appliqué au pourcentage d'EHS pour les mutants et les plants transgéniques. Pour cela, le ratio comprenant le volume

**Tableau 2.8. Ratios du volume d'extrait rhizosphérique récupéré par semaine sur la masse racinaire sèche récoltée pour chaque génotype d'*A. thaliana*.**

Le volume d'extrait rhizosphérique récolté chaque semaine a été divisé par la masse racinaire sèche récoltée en fin de culture. Le ratio obtenu pour chaque semaine d'exsudation a permis de calculer un facteur de correction par rapport à Col-0 à appliquer pour chaque mutant et la lignée transgénique d'*A. thaliana*.

<b>Ratio L/g</b>	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>	<b>S5</b>	<b>S6</b>	<b>Moyenne</b>
<b>Col-0</b>	0,64	0,59	0,58	0,61	0,46	0,63	<b>0,59</b>
<b>log4</b>	0,30	0,35	0,20	0,17	0,20	0,17	<b>0,23</b>
<b>pup14</b>	1,28	1,31	1,19	1,26	0,74	0,91	<b>1,12</b>
<b>325S:CKX2</b>	0,74	0,72	0,63	0,85	0,55	0,56	<b>0,68</b>

d'extrait récolté divisé par la masse racinaire obtenue en fin de culture a été calculé pour chaque génotype et pour chaque semaine d'exsudation (**Tableau 2.8**). Le facteur de correction à appliquer pour chaque génotype a ainsi été déterminé par rapport à chaque ratio obtenu pour Col-0. Un minimum de trois réplicas biologiques et de trois réplicas techniques a été réalisé.

## 6. Tests d'agressivité de *P. ramosa* en mini-rhizotron

Les graines de colza ont été placées en chambre de culture à 21°C pendant 7 jours (photopériode longue de 16 h/8 h), dans des boîtes de Petri rondes de 150 x 15 mm<sup>2</sup> de diamètre (Dutscher, France) sur du papier filtre humidifié avec 7 mL d'eau distillée. Les plantules de colza âgées de 7 jours ont été alors transférées sur le papier filtre d'un système de coculture en mini-rhizotron composé d'une boîte de pétri carrée (120x120x17 mm, Greiner, France), comprenant une ouverture sur la partie haute (pour le développement des parties aériennes) et d'un bloc de laine de roche (ATLANTIC VERT, France) utilisé comme substrat inerte, et ce à raison d'une plantule de colza par mini-rhizotron. Les boîtes ont été scellées sur 3 côtés et placées à la verticale en maintenant le système racinaire à l'obscurité dans une chambre de culture à 21°C (photopériode 16 h/8 h, 70% d'humidité) pendant 7 jours supplémentaires et arrosées tous les 2 jours avec 20 mL de Coïc 50% (v/v) pH 6.8.

Les graines germées de *P. ramosa* ont été incubées pendant 48 h avec les fractions actives 9 et 16 ( $10^{-2}$  M) d'*A. thaliana* (Col-0) ou la *c/tZ* ( $10^{-7}$  M), diluées dans le milieu d'incubation (HEPES 0,5 mM, pH 7,5, PPM à 0,05% p/v), ou dans le milieu d'incubation additionné de solvant (0,01% v/v d'acétonitrile). Après 2 jours d'incubation, 20 mg de graines de *P. ramosa* pré-traitées ont été distribuées par mini-rhizotron sur les racines de colza alors âgées de 15 jours. Une répétition de cinq mini-rhizotrons par condition a été réalisée. Les minirhizotrons ont été placés à 21°C (photopériode de 16 h/8 h, 70% d'humidité). Le nombre de tubercules formés par rapport au témoin, reflétant le développement d'un haustorium fonctionnel, est évalué quotidiennement pendant 19 jours grâce à l'utilisation du traceur phloémien la 6-Carboxyfluoresceine (10 mM, pH 6.3, Sigma-Aldrich, Etats-Unis) révélant la connexion phloémienne entre l'hôte et le parasite (Péron *et al.*, 2017). Les gouttes de Carboxyfluoresceine ont été déposées sur les feuilles abrasées de colza et la fluorescence des tubercules a été suivie à l'aide d'une loupe binoculaire à fluorescence équipée d'un filtre GFP2 : excitation 480/40 nm, émission 510 nm (Leica, France).

## 7. Extraction d'ARN et d'ADN génomique

Dix mL de graines de *P. ramosa* conditionnées (100 mg) ont été rincées trois fois avec de l'eau distillée stérile puis suspendues dans 10 mL de milieu de germination (HEPES

Tableau 2.9. Liste des couples d'amorces utilisés en qPCR.

Gene	Primer name	Forward and reverse primers 5' → 3'
<i>PrRR5</i>	<i>PrRR5_F</i>	TCCTTTATCGGTGTCGGTATCC
	<i>PrRR5_R</i>	GGCGGCAGCACCATAGG
<i>PrZFP6</i>	<i>PrZFP6_F</i>	ACGCACACAAGAAGGAGAGACA
	<i>PrZFP6_R</i>	TTCGGCTAGCCTGAATTTGC
<i>PrTRN2</i>	<i>PrTRN2_F</i>	AACGATGCAGCAGACATGGA
	<i>PrTRN2_R</i>	GCAGGAATAGCAGAGTTGTGTTTG
<i>PrCKX1</i>	<i>PrCKX1_F</i>	CCTAATGTGACTGCCTCAACAACAAA
	<i>PrCKX1_R</i>	CGATGGTGTTCGGAAGAT
<i>PrCKX2</i>	<i>PrCKX2_F</i>	CGTGTTTGCCAAAAGACTGACA
	<i>PrCKX2_R</i>	TCTTTCGTGGTTTTCCAATTAGG
<i>PrCKX4</i>	<i>PrCKX4_F</i>	AAATGCATGTCTGCGGACAA
	<i>PrCKX4_R</i>	TTCTATAATGGCATTGGCATCGT
<i>PrCKX5</i>	<i>PrCKX5_F</i>	AAACGGGCAGGCCATGATA
	<i>PrCKX5_R</i>	CCACGTGAACCGCTCATCT
<i>PrQR1</i>	<i>PrQR1_F</i>	GAAACCTTCAAACCTGGTGACAA
	<i>PrQR1_R</i>	AAACCGCCTCCTGTAAGATGAC
<i>PrQR2</i>	<i>PrQR2_F</i>	CCCGCCAAAGCGTAGTGA
	<i>PrQR2_R</i>	CCATCAGCCTCGGCAAGTT
<i>PrPirin</i>	<i>PrPirin_F</i>	GGTGAGGGTATATTTGGGAATTCA
	<i>PrPirin_R</i>	CGGAACCAAGAACAACAATGTG
18S	18S_F	CCAACTGCGCGCTAACCTA
	18S_R	CCGTCCTGCTGTCTTAATCGA

0,5 mM, pH 7,5, PPM à 0,05% p/v, *rac*-GR24  $10^{-7}$  M) dans des flasques de culture (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, Etats-Unis) placées à 21°C à l'obscurité pendant 4 jours. Les graines ont été ensuite rincées trois fois et traitées avec les fractions actives 9 et 16 de colza, tomate ou Col-0, la *c/tZ* ( $10^{-7}$  M), diluées dans le milieu d'incubation (HEPES 0,5 mM, pH 7,5, PPM à 0,05% p/v) ou dans le milieu d'incubation avec 0,01% (v/v) d'acétonitrile et incubées à 21°C à l'obscurité. Les graines ont été alors collectées par flasque après 48 h de traitement ou selon une cinétique de traitement de 0 h, 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h et 48 h avant d'être congelées dans de l'azote liquide et stockées à -80°C jusqu'à utilisation.

Les ARN totaux ont été extraits soit à partir de 100 mg de graines pré-traitées comme décrit précédemment ou de de hampes florales individuelles pour *P. ramosa*, soit à partir de 100 mg de graines pré-germées pendant 3 jours avec le *rac*-GR24 ( $10^{-7}$  M) pour *O. cumana*, à l'aide du kit Nucleospin RNA Plant (Macherey Nagel) selon les instructions du fabricant. L'ADN génomique a été éliminé des échantillons d'ARN par traitement avec 6,8 unités Kunitz de DNase RNase-free (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les extraits ont été alors purifiés avec le kit RNA Clean-up XS (Macherey Nagel).

L'ADN génomique des différents génotypes d'*A. thaliana* a été extrait à partir de 100 mg de graines à l'aide du kit NucleoSpin Plant II (Macherey Nagel) selon les indications du fabricant.

La quantité et la qualité des ARN et des ADN ont été déterminées par spectrophotométrie (NanoDrop Spectrophotometer ND-1000, Labtech International Ltd, Rigmer, Royaume-Uni) avant stockage à -20°C jusqu'à utilisation.

## 8. Amplification par PCR et PCR quantitative en temps réel

Les ADNc ont été synthétisés à partir de 0,5 µg d'ARN totaux en utilisant le kit qScript cDNA SuperMIX (Quanta BioSciences Inc., Gaithersburg, Maryland, Etats-Unis) en suivant les instructions du fabricant. Les ADNc ont été dilués 20 fois et sont utilisés dans un volume total de 25 µL par réaction comprenant 12,5 µL de PerfeCTa SYBR Green SuperMix ROX (Quanta BioSciences Inc, Gaithersburg, Maryland, Etats-Unis) et 0,3 mM de chaque amorce spécifique. Chaque couple d'amorce a été créé à l'aide du logiciel Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Carlsbad, Californie, Etats-Unis) (**Tableau 2.9**). Les réactions d'amplifications quantitatives ont été réalisées dans un thermocycleur Applied Biosystem 7300 real-time PCR (Applied Biosystem, Carlsbad, Californie, Etats-Unis) avec des cycles de température de 95°C pendant 10 min, puis 40 cycles à 95°C pendant 15 s et 60°C pendant 1 min. La spécificité des amorces a été vérifiée en utilisant un protocole de dissociation (de 60°C à 95°C) après l'amplification finale. Les données d'expression ont été déterminées en utilisant les Ct (threshold cycle). L'amplicon du gène constitutif 18S présentant une variation très faible de Ct

**Tableau 2.10. Amorces utilisées pour le clonage moléculaire des récepteurs *HK3* et *HK4* pour les plantes parasites *P. ramosa* et *O. cumana*.**

Les amorces pour l'amplification complète des séquences codantes *HK3* et *HK4* de *P. ramosa* et *O. cumana* sont représentées en bleu.

Espèce	Gène	Nom	Amorces 5' → 3'	Tm
<i>P. ramosa</i>	<b>HK3</b>	PrHK3_Fwd (cut)	ATGGATGAGGTTATTGGGTCGGGT	60°C
		PrHK3_nested_Rev	GGCATCTGAATATCCATAAA	44°C
		PrHK3_ATG	ATGCATTTACTTCATATAATTGGATTTCG	52°C
		PrHK3_stop	TTAGTGATTCTCATCCGGCACC	60°C
	<b>HK4</b>	PrHK4_Fwd	ACACCACCAACTCTTCTGATCCGT	58°C
		PrHK4_nested_Rev	GTCATAGATTTTTGCACTTATAAACAACAT	54°C
		PrHK4_ATG_Fwd	ATGGGTGCGAAAAGGCAAGGGTATCA	66°C
		PrHK4_stop_Rev	TTATTCAGTTTTTGACGAGATGGG	54°C
<i>O. cumana</i>	<b>HK3</b>	OcHK3_ATG_Fwd	ATGAGTTTACTTGATATAATTGGATTGGG	57°C
		OcHK3_stop_Rev	TTAGTGATTCTCATCCGGCAGGGT	60°C
	<b>HK4</b>	OcHK4_ATG_Fwd	ATGGGTGAGAAAAGGCAAGGG	57°C
		OcHK4_stop_Rev	TCACTTGGTTTCGAAGAACTTGGC	58°C

(SD < 0,5 cycle) a été utilisé comme marqueur interne pour la normalisation des données ( $\Delta\Delta Ct$ ). Trois répliques biologiques incluant trois répliques techniques ont été réalisés pour chaque condition et un contrôle sans ADNc a été inclus pour chaque mix PCR. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel R ([www.rproject.org](http://www.rproject.org)).

La présence de l'ADN-T dans les graines de chaque mutant d'*A. thaliana* a été vérifiée par amplification PCR à partir de 250 ng d'ADN génomique dans un volume de 25  $\mu$ L par réaction à l'aide du kit Taq DNA Polymerase (New England Biolabs, Etats-Unis) selon les recommandations du fabricant. Le cycle de température pour chaque amplification utilisant les amorces spécifiques (**Tableau 2.1**) était 95°C pendant 5 min, 95 °C pendant 30 s, 58°C pendant 1 min, 68°C pendant 1 min pendant 35 cycles, suivis d'une élongation finale à 68°C pendant 5 min. Les fragments d'ADN génomique ont été visualisés par migration sur gel d'agarose à 1,5% (p/v) sous rayons UV (E-Box CX5.TS Edge, Vilber, France).

## 9. Clonage moléculaire des ADNc des gènes *HK*

Les séquences putatives *HK* de *P. ramosa* ont été identifiées sur la banque de transcrits des différents stades de développement de *P. ramosa* issue des travaux de thèse de Lechat (2014) et développée par Goyet (2017) en utilisant l'algorithme BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul *et al.*, 1990, 1997), et en recherchant les séquences nucléotidiques similaires aux récepteurs connus d'*A. thaliana*, *AHK2*, *AHK3* et *AHK4* (base de données TAIR <http://www.arabidopsis.org>, At5G35750, At1G27320, At2G01830). Les séquences *HK* d'*O. cumana* ont également été obtenues sur le transcriptome disponible en ligne (<https://www.heliagene.org/OclN23-20170413/>) mis au point par le Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (INRA, Toulouse, France), en utilisant l'algorithme BLASTN et en recherchant les séquences nucléotidiques similaires aux récepteurs connus d'*A. thaliana*. Des amorces spécifiques des séquences codantes *HK* de *P. ramosa* et *O. cumana* ont ainsi été créées pour les clonages moléculaires, en étant dessinées à la main ou à l'aide du logiciel en ligne Primer3 (v. 0.4.0), avant d'être produites par la société Eurofins MGW Operon (Ebersberg, Allemagne) (**Tableau 2.10**).

Les ADNc de *P. ramosa* et *O. cumana* ont été synthétisés à partir de 0,5  $\mu$ g d'ARN totaux en utilisant le kit qScript cDNA SuperMIX (Quanta BioSciences Inc.) suivant les instructions du fabricant. Puis 250 ng d'ADNc ont été utilisés comme matrice dans des réactions d'amplification par PCR dans un volume de 50  $\mu$ L par réaction à l'aide du kit Q5 High-fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Etats-Unis) selon les recommandations du fabricant, en suivant le cycle de température de 98°C pendant 10 s, 98°C pendant 10 s, 58 à 61°C selon les spécificités des amorces (**Tableau 2.10**) pendant 30 s, 72°C

**Tableau 2.11. Numéros d'accèsion des séquences HK.**

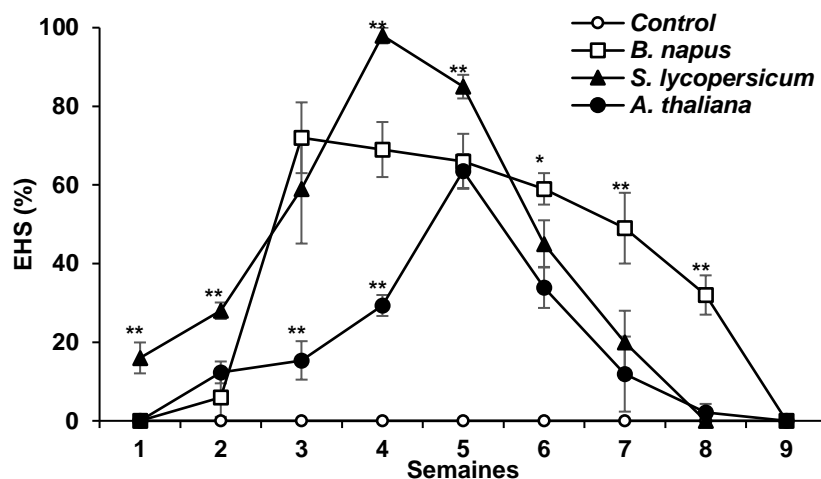
Les séquences des récepteurs HK ont été obtenues grâce à l'algorithme BLASTN (Altschul *et al.*, 1990, 1997), à partir des bases de données en ligne NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) et Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov>) pour les plantes autotrophes et la base de donnée du PPGP (<http://ppgp.huck.psu.edu>) pour les plantes parasites. Les séquences HK de *P. ramosa* sont issues du transcriptome des travaux de thèse de (Lechat, 2014) et développé par Goyet (2017) et celles de *O. cumana* proviennent du transcriptome en ligne (<https://www.heliagene.org/OcIN23-20170413/>) mis au point par le Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (INRA, Toulouse, France).

	Espèce	Récepteur			
		HK2	HK3	HK4	
<b>Plante non parasite</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5G35750	At1G27320	At2G01830	
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Solyc07g047770.2.1	Solyc05g015610.2.1	Solyc04g008110.2.1	
	<i>Solanum tuberosum</i>	/	PGSC0003DMT400084727	PGSC0003DMT400075775	
	<i>Medicago truncatula</i>	Medtr5g097410.1	Medtr3g085130.1	Medtr8g106150.2	
	<i>Oryza sativa</i>	LOC_Os10g21810.1	LOC_Os01g69920.1	LOC_Os03g50860.1	
	<i>Citrus clementina</i>	Ciclev10014068m	Ciclev10030589m	Ciclev10014137m	
	<i>Capsella rubella</i>	Carubv10006570m	Carubv10011949m	Carubv10016616m	
	<i>Oropetium thomaeum</i>	Oropetium_20150105_21073A	Oropetium_20150105_09813A	Oropetium_20150105_07985A	
	<b>Plante parasite</b>	<i>Phelipanche ramosa</i>	/	Pram_13349 Pram_00625	Pram_00096
		<i>Orobanche cumana</i>	/	OcIN23_s038g0210301	OcIN23_s028g0164401
<i>Striga hermonthica</i>		/	StHe2GB1_75370	StHe2GB1_9890	
<i>Phelipanche aegyptiaca</i>		/	OrAe62GB1_41450	OrAeBC5_3079.1	
<i>Lidenbergia philippensis</i>		/	LiPhGnB1_19205	LiPhGnB1_18976	
<b>Espèce extérieure</b>		<i>Physcomitrella patens</i>	Pp3c16_7610V3.1	Pp3c9_21840V3.1	Pp3c4_1360V3.1

pendant 1 min 45 s pendant 35 cycles, suivis d'une élongation finale à 72°C pendant 5 min. Les amplicons obtenus ont été visualisés par migration sur gel d'agarose à 1,5% (p/v) avant d'être purifiés à l'aide du kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel) selon les recommandations du fournisseur. Les fragments ont été ensuite insérés dans le vecteur pGEM-Teasy (Promega, Madison, Wisconsin, Etats-Unis) selon les recommandations du fabricant et les plasmides obtenus ont été insérés dans les bactéries compétentes *E. coli* XL1-Blue selon les instructions du fabricant. Les plasmides recombinants ont été purifiés et concentrés à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid (Macherey Nagel) avant d'être séquencés par la société Eurofins MGW Operon (Ebersberg, Allemagne) selon les amorces M13 (sens 5'-TGTAACGACGCGCCAGT-3' et anti-sens 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Pour *P. ramosa*, les extrémités 3' des séquences codantes *HK3* et *HK4* ont pu être confirmées grâce à un protocole de PCR RACE 3' (5' / 3' RACE KIT 2<sup>ND</sup> GENERATION, Sigma-Aldrich, Etats-Unis) en utilisant des amorces sens spécifiques (**Tableau 2.10**). La validation des extrémités 3' des séquences codantes *PrHK3* et *PrHK4* a permis de dessiner des amorces « nested » et ainsi de confirmer par étapes les séquences de *P. ramosa* en remontant vers l'extrémité 5'. En fonction des séquences obtenues de nouvelles amorces spécifiques ont été créées pour permettre l'amplification complète des séquences *HK* (**Tableau 2.10**). Les fragments ont été purifiés, clonés puis séquencés comme décrit précédemment. Les séquences complètes des récepteurs *HK* de *P. ramosa* et *O. cumana* obtenues après séquençage ont été vérifiées et comparées entre elles par des alignements de séquences à l'aide du logiciel Vector NTI 9.1.0 (Life Technologies Corporation).

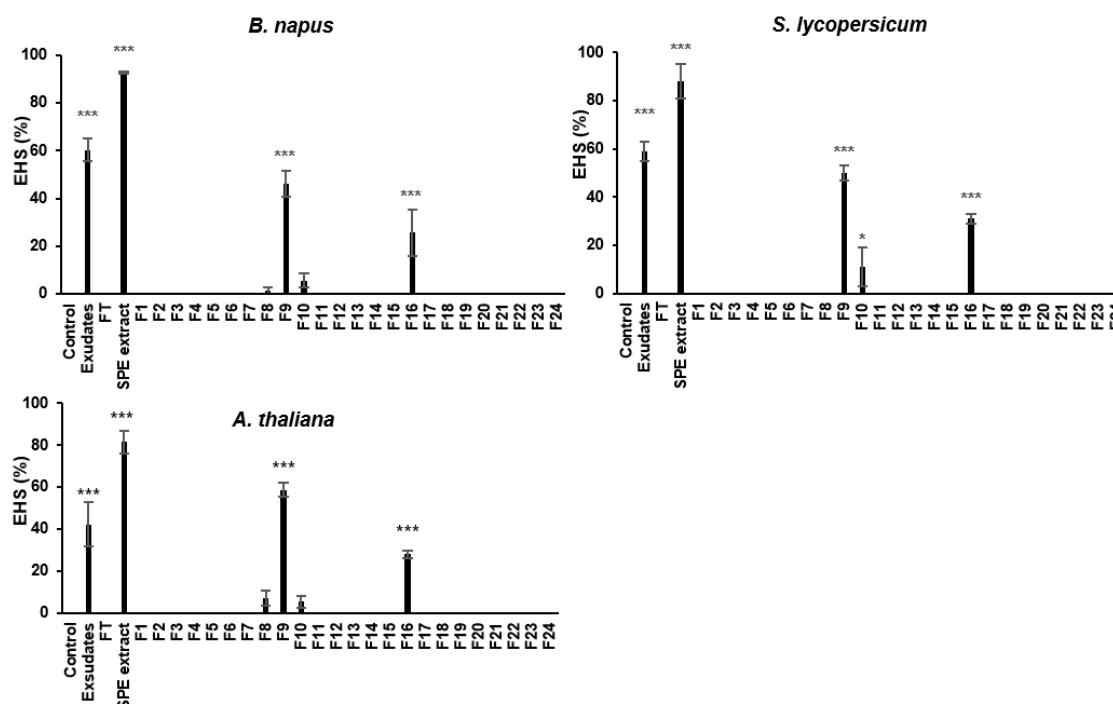
## 10. Analyse phylogénétique des domaines CHASE des récepteurs HK

Les séquences des récepteurs *HK* des espèces de plantes autotrophes *S. lycopersicum*, *S. tuberosum*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa*, *Citrus clementina*, *Capsella rubella*, *Oropetium thomaeum* et de l'espèce *Physcomitrella patens* ont été obtenues à partir des bases de données en ligne NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov>), en utilisant l'algorithme BLASTN recherchant les séquences nucléotidiques similaires aux récepteurs connus d'*A. thaliana*, *AHK2*, *AHK3* et *AHK4* (base de données TAIR <http://www.arabidopsis.org>, At5G35750, At1G27320, At2G01830). Les séquences *HK* des plantes parasites *S. hermonthica*, *P. aegyptiaca* et *Lidenbergia philippensis*, ont été obtenues sur la base de données en ligne du Parasitic Plant Genome Project (PPGP, <http://ppgp.huck.psu.edu>) grâce à l'algorithme BLASTN recherchant les séquences nucléotidiques semblables aux séquences *HK* des plantes non parasites. Les numéros d'accessions des séquences sont regroupés dans le **Tableau 2.11**. Les séquences de *P. ramosa* et *O. cumana* obtenues par clonage moléculaire ont été utilisées. Les séquences



**Figure 2.4.** Cinétique de l'activité haustoriogène des extraits rhizosphériques de *B. napus*, *S. lycopersicum*, *A. thaliana* évaluée sur 9 semaines d'exsudation.

Les extraits rhizosphériques ont été filtrés à 0,22  $\mu\text{m}$  et testés pour l'induction des EHS sur des graines pré-germées de *P. ramosa*. Les extraits ont été dilués à  $5 \cdot 10^{-1}$  dans la solution tampon (HEPES 0,5 mM, pH 7,5, PPM à 0,05% p/v) qui constituait le contrôle. Les moyennes sont représentées avec leur erreurs standards ( $n=6$ ). Les moyennes annotées avec des astérisques sont significativement différentes entre les plantes hôtes (Tukey-HSD, \*  $p < 0,05$  et \*\*  $p < 0,01$ ).



**Figure 2.5.** Activité haustoriogène des extraits rhizosphériques après concentration et fractionnement par HPLC inverse pour *B. napus*, *S. lycopersicum* et *A. thaliana*.

Le pourcentage d'EHS induit a été évalué après concentration par SPE inverse et après fractionnement par HPLC inverse (dilués 100 fois). Les extraits bruts dilués au demi et les produits SPE (SPE extract) dilués 100 fois dans le tampon (HEPES 0,5 mM, pH 7,5, PPM à 0,05% p/v) ont été utilisés comme témoins positifs, la solution tampon comme témoin négatif (control). Les moyennes sont représentées avec leur erreurs standards ( $n=3$ ). Les moyennes annotées avec des astérisques sont significativement différentes du contrôle négatif ( $t$ -test, \*  $p < 0,05$  et \*\*\*  $p < 0,001$ ).

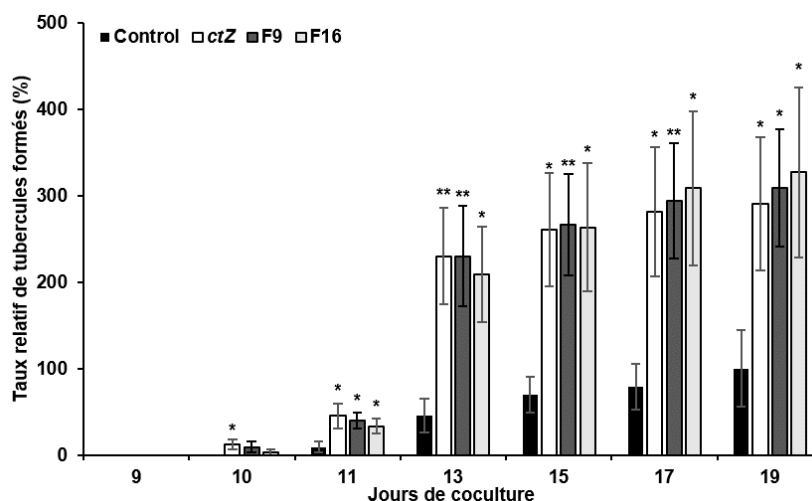
nucléotidiques des récepteurs transmembranaires HKs pour chaque plante ont été traduites à l'aide du logiciel MEGAX (Kumar *et al.*, 2018) et les séquences protéiques des domaines CHASE ont été recherchées dans l'ensemble de ces séquences. L'identification des domaines CHASE a été réalisée grâce à des alignements multiples (MUSCLE, MULTiple Sequence Comparison by Log-Expectation, Edgar, 2004), sur la base de la recherche de motifs de domaines CHASE fortement conservés. Ces motifs ont été extraits d'une séquence consensus présente dans l'étude menée par Steklov *et al.* (2013).

Les séquences putatives en acides aminés des domaines extracellulaires CHASE (cyclases/histidine kinases associated sensing extracellular) de chaque récepteur les espèces autotrophes *A. thaliana*, *S. lycopersicum*, *S. tuberosum*, *M. truncatula*, *O. sativa*, *C. clementina*, *C. rubella*, *O. thomaeum* et parasites *P. ramosa*, *O. cumana*, (dont les séquences ont été obtenues par clonage moléculaire), *S. hermonthica*, *P. aegyptiaca* et *L. philippensis* ont été comparées entre elles. L'arbre phylogénétique en résultant a été construit à l'aide du logiciel MEGAX (Kumar *et al.*, 2018) et incrémenté avec une espèce extérieure *P. patens* (outgroup), en appliquant la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean; Sneath and Sokal, 1973), selon un bootstrap de 1000 ré-échantillonnages (Felsenstein, 1985). Les distances évolutives ont été calculées selon la méthode de correction de Poisson (Zuckerandl and Pauling, 1965) et représentées par la longueur des branches dessinées à l'échelle.

### III. Résultats

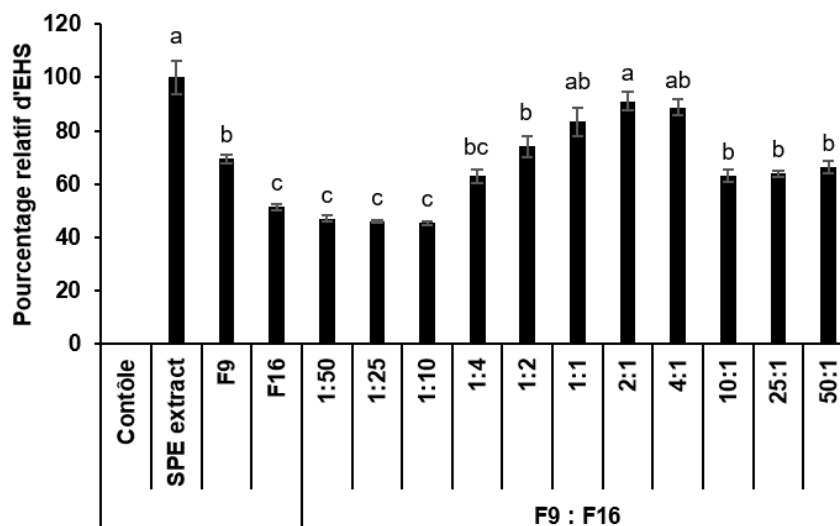
#### 1. Les extraits rhizosphériques de *B. napus*, *S. lycopersicum* et *A. thaliana* contiennent un signal haustoriogène commun

Goyet *et al.* (2017) ont montré que les extraits rhizosphériques de *B. napus*, contenaient des molécules à activité haustoriogène. Afin de vérifier si cette activité est spécifique du colza ou si un signal similaire existe chez d'autres plantes hôtes, l'activité haustoriogène des extraits rhizosphériques de *S. lycopersicum* (autre hôte majeur) et de la plante modèle *A. thaliana* (Col-0) a été évaluée chaque semaine pendant 9 semaines en même temps que de nouveaux extraits de *B. napus*. Les résultats présentés dans la **Figure 2.4** représentent le pourcentage de graines germées ayant développé des structures haustoriales précoces après traitement avec la dilution des extraits la plus active à  $5 \cdot 10^{-1}$  (n=6). Les extraits rhizosphériques de *B. napus*, *S. lycopersicum* et d'*A. thaliana* sont capables d'induire la formation d'EHS chez *P. ramosa* au cours des 7 semaines d'exsudation et les extraits rhizosphériques de *B. napus* et *A. thaliana* présentent une activité haustoriogène à partir de la 2<sup>ème</sup> semaine de culture (respectivement  $6 \pm 5\%$  et  $12 \pm 3\%$ ). Les extraits de *S. lycopersicum* sont quant à eux actifs



**Figure 2.6. Un traitement avec les fractions 9 et 16 d'*A. thaliana* augmente l'agressivité de *P. ramosa* de la même manière que les cytokinines.**

Les graines pré-germées de *P. ramosa* ont été incubées 48 h avec de la *ctZ* ( $10^{-7}$  M), ou la fraction 9 et 16 ( $10^{-2}$  M) d'*A. thaliana* (Col-0), dans la solution tampon (HEPES 0,5 mM, pH 7,5, PPM à 0,05% p/v), ou dans le contrôle seul (solution tampon supplémenté avec 0,1% v/v d'acétonitrile), avant de les placer en contact avec les racines de *B. napus* dans des mini-rhizotrons (20 mg par minirhizotron). Le nombre d'accrochages a été évalué pendant 19 jours en utilisant le traceur phloémien la 6-Carboxyfluoresceine sous la loupe à épifluorescence. Les résultats sont exprimés en pourcentage du nombre de tubercules formés dans la condition contrôle. Les moyennes sont représentées avec leur erreurs standards (n=5). Les moyennes annotées avec des astérisques sont significativement différentes du contrôle (*t*-test, \*  $p < 0.05$  et \*\* $p < 0.01$ ).



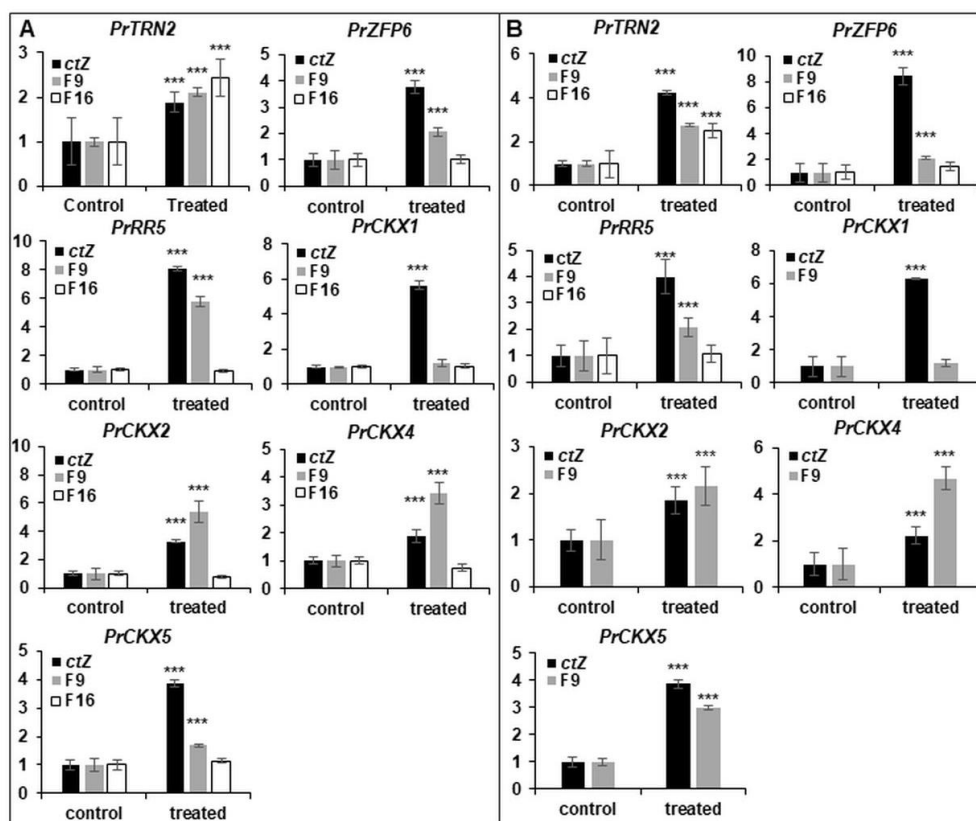
**Figure 2.7. Action synergique des fractions 9 et 16 issues des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana*.**

Les fractions 9 et 16 d'*A. thaliana* (Col-0) ainsi que le produit SPE ont été testés pour l'induction haustoriale à  $10^{-2}$  dans la solution tampon (HEPES 0,5 mM, pH 7,5, PPM à 0,05% p/v) constituant le contrôle. Puis les fractions ont été testées en mélange dans un volume final de 100  $\mu$ L par puits pour les proportions suivantes de F9 versus F16 : 1:4, 1:2, 1:1 ; 2:1, 4:1 et 1:10, 1:25, 1:50, 50:1, 25:1, 10:1. Les résultats sont exprimés en pourcentage relatif du nombre d'EHS formés par rapport à l'extrait SPE. Les moyennes sont représentées avec leur erreurs standards (n=12). Les moyennes annotées avec des lettres distinctes sont significativement différentes (Tukey-HSD,  $p < 0,05$ ).

dès la première semaine ( $16 \pm 4\%$ , Tukey-HSD,  $p < 0,01$ ). L'activité haustoriogène est maximale dès la 3<sup>ème</sup> semaine d'exsudation pour *B. napus* ( $72 \pm 9\%$ ), 4<sup>ème</sup> semaine pour *S. lycopersicum* ( $98 \pm 2\%$ ) et lors de la 5<sup>ème</sup> semaine pour *A. thaliana* ( $64 \pm 4\%$ ). Ces résultats mettent aussi en évidence une activité haustoriogène plus importante pour les extraits rhizosphériques de *S. lycopersicum* en comparaison avec ceux de *B. napus*, et *A. thaliana* (maximum d'induction haustoriale respectif de  $95 \pm 2\%$  contre  $72 \pm 9\%$  et  $64 \pm 4\%$ , Tukey-HSD,  $p < 0,01$ ). L'activité haustoriogène diminue par la suite rapidement à partir de la 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> semaine d'exsudation pour *S. lycopersicum* et *A. thaliana* avec une activité nulle observée à partir de la 8<sup>ème</sup> semaine, tandis que l'activité haustoriogène diminue plus lentement pour *B. napus* et devient nulle à la 9<sup>ème</sup> semaine. La cinétique de l'activité haustoriogène des extraits rhizosphériques de ces trois plantes indique ainsi que le pic d'activité haustoriogène s'étend de la 3<sup>ème</sup> semaine d'exsudation à la 6<sup>ème</sup> semaine. Les extraits rhizosphériques correspondants aux trois semaines les plus actives ont ainsi été regroupés entre eux pour chaque plante cultivée (semaines 3, 4 et 5 pour *B. napus* et semaines 4, 5 et 6 pour *S. lycopersicum* et *A. thaliana*, **Tableau 2.3**) avant d'être concentrés par SPE inverse puis fractionnés par HPLC inverse (**Figure 2.5**).

Le traitement d'un extrait par SPE permet de confiner et concentrer l'activité haustoriogène dans la fraction fixée (Goyet *et al.*, 2017). Ainsi, les produits SPE issus des extraits rhizosphériques de *B. napus*, *S. lycopersicum* et *A. thaliana* présentent une activité inductrice de la formation d'EHS atteignant respectivement  $93 \pm 0,3\%$ ,  $88 \pm 7\%$  et  $82 \pm 5\%$  pour la dilution la plus active à  $10^{-2}$  ( $n=6$ ). Le fractionnement bio-guidé des produits SPE pour chaque culture a montré l'existence de deux fractions actives, la fraction n°9 et la fraction n°16, à des temps de rétentions identiques chez les trois espèces (*t*-test,  $p < 0,001$ ). La fraction 9 est éluée entre 20 et 21 min pour un gradient comprenant 40% de solution A (eau ultra pure acidifiée avec 0,1% v/v d'acide acétique) et 60% de solution B (acétonitrile pur acidifié avec 0,1% v/v d'acide acétique) et présente la plus forte activité haustoriogène avec  $46 \pm 5\%$  pour *B. napus*,  $50 \pm 3\%$  pour *S. lycopersicum* et  $57 \pm 3\%$  pour *A. thaliana* (dilutions les plus actives à  $10^{-2}$ ). La fraction 16 est, quant à elle éluée entre 26 et 27 min pour un gradient correspondant à 100% de solution B et présente une activité inductrice de la formation d'EHS plus faible avec  $26 \pm 10\%$  pour *B. napus*,  $31 \pm 2\%$  pour *S. lycopersicum* et  $28 \pm 2\%$  pour *A. thaliana*.

Ces résultats mettent ainsi en évidence la présence d'un signal haustoriogène commun (profil global) contenu dans les extraits rhizosphériques de différentes plantes (*B. napus*, *S. lycopersicum*, *A. thaliana*), en révélant que l'activité haustoriogène est portée par deux mêmes fractions 9 et 16, quelle que soit la plante hôte étudiée. De plus, la cinétique d'exsudation des composés à activité haustoriogène s'avère relativement similaire, avec un pic d'activité de ces composés situé entre la 3<sup>ème</sup> et la 6<sup>ème</sup> semaine d'exsudation.



**Figure 2.8. Effet des fractions 9 et 16 des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* de *S. lycopersicum* sur l'expression des gènes de réponse aux cytokinines et des gènes marqueurs de la formation des EHS.**

L'effet de la fraction 9 et 16 d'*A. thaliana* (A), de la fraction 9 de *S. lycopersicum* (B), de la *ctZ* a été évalué sur l'expression des gènes *PrTRN2*, *PrZFP6*, *PrRR5*, *PrCKX1*, *PrCKX2*, *PrCKX4*, *PrCKX5*. L'effet de la fraction 16 de *S. lycopersicum* (B) a été évalué sur l'expression des gènes *PrTRN2*, *PrZFP6*, *PrRR5*. Les niveaux d'expression des gènes ont été évalués par RT-qPCR à partir de graines germées de *P. ramosa* traitées 24h avec la fraction 9 et 16 des extraits d'*A. thaliana* (A), ou la fraction 9 et 16 de *S. lycopersicum* (B), la *ctZ* ( $10^{-7}$  M) ou un contrôle (solution tampon HEPES 0,5 mM, pH 7,5, PPM à 0,05% p/v, supplémenté avec 0,1% v/v d'acétonitrile). Les données sont normalisées par rapport au gène de référence 18S et l'expression des gènes dans le contrôle pour chaque temps de cinétique ( $\Delta\Delta Ct$ ). La valeur seuil de contrôle est fixée à 1. Les données ont été obtenues sur la base de deux réplicas biologiques et de trois réplicas techniques. Les différences significatives par rapport au gène de référence 18S sont notées \*\*\* (*t*-test,  $p < 0,001$ ).

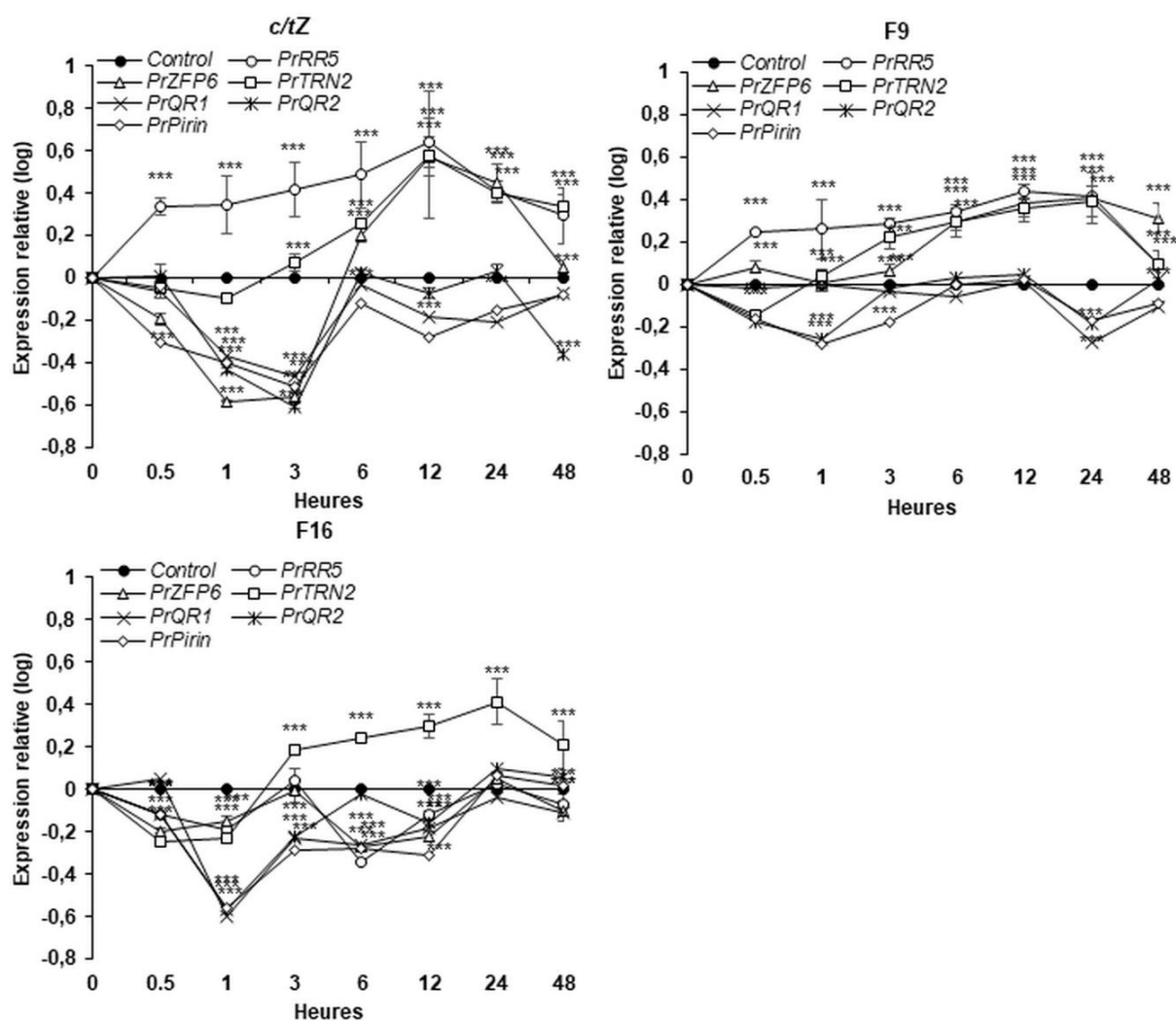
## 2. Les fractions 9 et 16 augmentent l'agressivité de *P. ramosa*

Goyet *et al.* (2017) ont mis en évidence qu'un traitement par des extraits rhizosphériques de *B. napus* ou avec de la *c/tZ* augmentait significativement l'agressivité de *P. ramosa* en favorisant le nombre d'accrochages des graines germées sur le système racinaire de *B. napus*. Afin de déterminer si un tel effet était également observable pour chaque fraction active (9 et 16) indépendamment, des tests de coculture entre la plante parasite et *B. napus* ont été effectués. Les graines germées de *P. ramosa* pré-traitées 48h avec la fraction 9 ou 16 d'*A. thaliana* ( $10^{-2}$ ), la *c/tZ* ( $10^{-7}$  M) ou un contrôle (solution tampon supplémentée avec 0,1% v/v d'acétonitrile) ont été déposées sur des racines de *B. napus*. L'accrochage des graines a ensuite été mis en évidence et évalué pendant 19 jours à l'aide du traceur phloémien, la 6-Carboxyfluoresceine, qui révèle les connexions vasculaires entre la plante hôte et le parasite et donc la présence d'un haustorium fonctionnel. Les taux d'accrochage des graines de *P. ramosa* sont exprimés en pourcentage relatif au nombre d'accrochages maximal obtenu dans la condition contrôle au 19<sup>ème</sup> et dernier jour (**Figure 2.6**). Dans ces conditions, les premiers accrochages apparaissent au 10<sup>ème</sup> et 11<sup>ème</sup> jour de coculture pour chaque traitement. Des différences significatives avec la condition contrôle sont observables dès le 10<sup>ème</sup> jour de coculture pour le traitement *c/tZ*, (taux relatif d'accrochage de  $12 \pm 6\%$ , *t*-test,  $p < 0,05$ ). Puis, les trois traitements apparaissent significativement différents du contrôle non traité à partir du 11<sup>ème</sup> jour, avec un taux relatif d'accrochage de  $45 \pm 9\%$  pour la *c/tZ*,  $39 \pm 9\%$  pour F9 et  $33 \pm 9\%$  pour F16 (*t*-test,  $p < 0,05$ ). Ces différences persistent ensuite tout au long de la coculture (*t*-test,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ). Au 19<sup>ème</sup> jour de coculture, le taux relatif d'accrochage des graines de *P. ramosa* atteint  $291 \pm 77\%$  du contrôle pour le traitement *c/tZ*,  $309 \pm 68\%$  pour le traitement F9,  $327 \pm 99\%$  pour le traitement F16 (significativement différents de la condition contrôle  $100 \pm 44\%$ , *t*-test,  $p < 0,05$ ).

Ces résultats démontrent donc que des pré-traitements avec les fractions 9 et 16 d'*A. thaliana* indépendamment sont capables d'induire la formation d'EHS fonctionnelles. Ces traitements augmentent alors l'agressivité du parasite de manière équivalente entre les fractions tout en étant similaire à un traitement avec la *c/tZ*.

## 3. Les fractions 9 et 16 ont un effet synergique

L'activité haustoriogène des extraits rhizosphériques des plantes hôtes testées dépend donc de l'activité relative des fractions 9 et 16. Cependant, la fraction 9 présente une activité haustoriogène plus importante que la fraction 16 tout en étant inférieure à l'activité des extraits rhizosphériques totaux purifiés sur SPE. Dans l'objectif de préciser les interactions entre ces fractions, un test de synergie des fractions 9 et 16 d'*A. thaliana* a été réalisé en ajoutant les



**Figure 2.9. Cinétique d'expression des gènes marqueurs de la formation des EHS après un traitement avec la fraction 9 et la fraction 16 des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana*.**

L'expression des gènes *PrRR5*, *PrZFP6*, *PrTRN2*, *PrQR1*, *PrQR2* et *PrPirin* a été évaluée par RT-qPCR à partir de graines germées de *P. ramosa* traitées pendant 0h, 0,5h, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h avec la fraction 9, la fraction 16 des extraits d'*A. thaliana* (Col-0), la *c/tZ* ( $10^{-7}$  M) ou un contrôle (solution tampon HEPES 0,5 mM, pH 7,5, PPM à 0,05% p/v, supplémentée avec 0,1% v/v d'acétonitrile). Les données sont normalisées par rapport au gène de référence 18S et l'expression des gènes dans le contrôle pour chaque temps de cinétique ( $\Delta\Delta C_t$ ). Les données sont exprimées en logarithme. Les données ont été obtenues sur la base de deux réplicas biologiques et de trois réplicas techniques. Les différences significatives par rapport au gène de référence 18S sont notées \*\*\* (*t*-test,  $p < 0,001$ ).

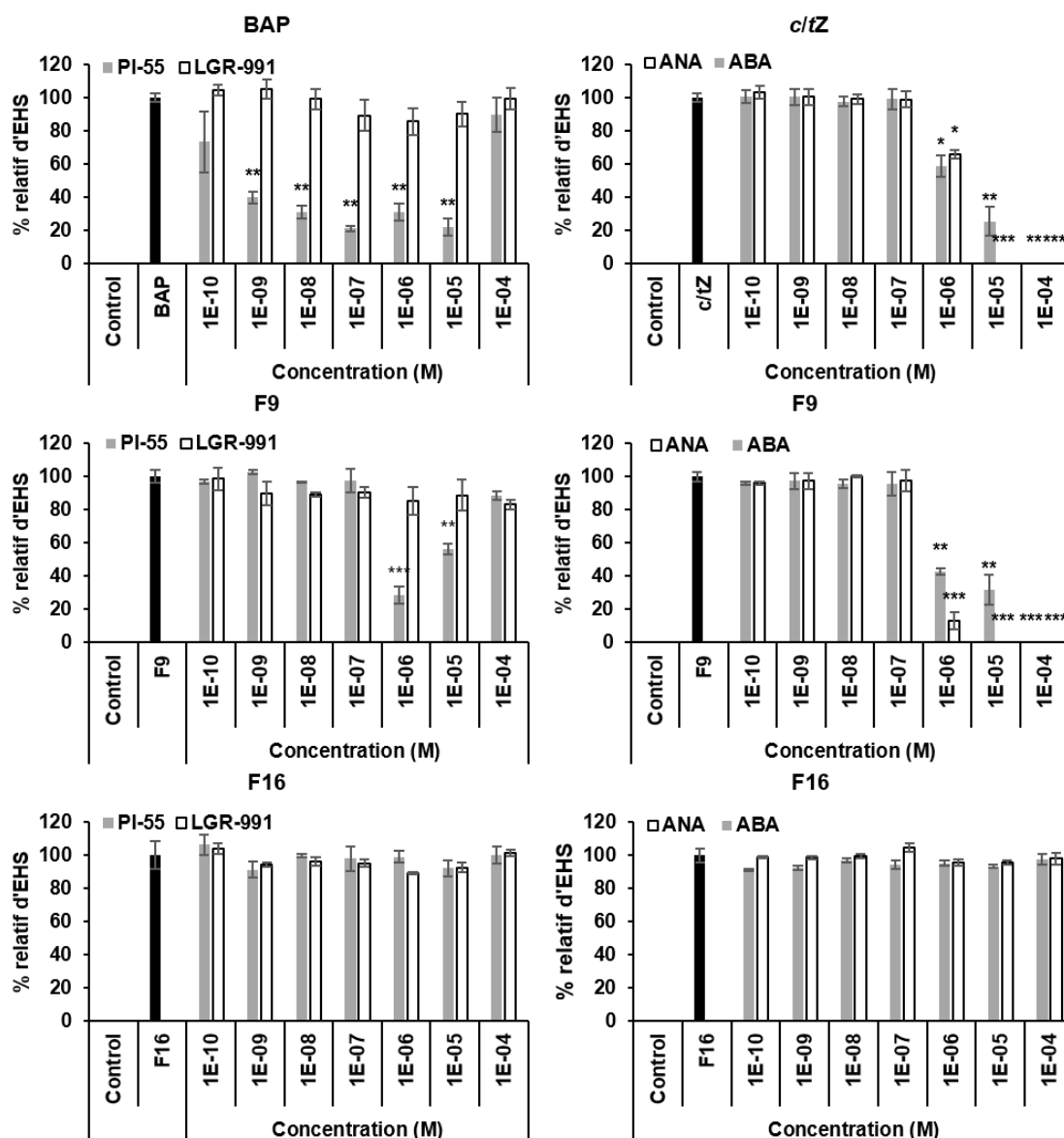
fractions en différentes proportions (F9 versus F16 : 1:4, 1:2, 1:1 ; 2:1, 4:1 et 1:10, 1:25, 1:50, 50:1, 25:1, 10:1 ; **Figure 2.7**).

Pour les ratios de 1:50, 1:25 et 1:10, l'activité haustoriogène du mélange F9:F16 n'est pas significativement différente de la fraction 16 seule ( $51,4 \pm 1,0$  % ; Tukey-HSD,  $p < 0,05$ ). Passé ce seuil, dès que l'on augmente la proportion de fraction 9 dans le mélange, l'activité haustoriogène augmente jusqu'à être significativement plus élevée que celle de la fraction 9 seule ( $69,5 \pm 1,7$  %) pour un ratio 1 :1. Le pourcentage d'EHS formé atteint ensuite un niveau significativement similaire à celui du produit SPE pour un ratio de 2:1 ( $100 \pm 6,3$  % pour l'extrait SPE et  $91,0 \pm 3,5$  % pour le ratio 2:1). Par la suite, l'activité haustoriogène diminue à mesure que la quantité de fraction 9 diminue dans le mélange jusqu'à être semblable à celle de la fraction 9 pour les ratios 50:1, 25:1 et 10:1.

L'évaluation de la contribution de chaque constituant dans l'activité haustoriogène de l'extrait SPE permet ici de démontrer qu'il existe un effet additif entre ces fractions, avec un ratio F9:F16 optimal de 2:1 qui permet de restaurer une activité haustoriogène totale équivalente à celle du produit SPE. La contribution de la fraction 9 apparaît toutefois majoritaire dans cette activité, expliquant à elle seule ici environ 67% de l'activité totale de l'extrait SPE.

#### **4. Les fractions 9 et 16 induisent des réponses moléculaires différentes chez *P. ramosa***

Dans le but de préciser si la réponse moléculaire mise en place par la plante parasite en réponse au signal haustoriogène provenant des deux fractions actives est similaire, la réponse transcriptomique de *P. ramosa* aux fractions 9 et 16 des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* (Col-0) et de *S. lycopersicum* a été évaluée par qRT-PCR au travers d'une approche transcriptomique ciblée (**Figure 2.8**). L'expression de gènes marqueurs de la voie des CK et également des gènes identifiés dans l'induction des EHS a été suivie selon une cinétique de traitement de 0h, 0,5h, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h et 48h en réponse aux fractions 9 et 16 d'*A. thaliana* (Col-0) (**Figure 2.9**). Les gènes ainsi suivis sont *PrRR5* codant pour une protéine intervenant dans la boucle de rétrocontrôle négatif des CK (Paul *et al.*, 2016), *PrZFP6* dont la protéine correspondante permet la différenciation des trichomes (Zhou *et al.*, 2013) et de *PrTRN2* qui code pour une TETRASPANIN qui aurait un rôle dans la formation de poils absorbants (Cnops *et al.*, 2000). Par ailleurs, l'expression des gènes orthologues à ceux identifiés chez les hémiparasites comme intervenants dans l'haustoriogenèse a été également évaluée par RT-qPCR. Il s'agit des gènes *QR1* et *QR2* qui codent pour les quinones réductases et du gène *Pirin* qui code pour un cofacteur de transcription. Ces gènes ont été



**Figure 2.10. Le PI-55, l'ANA et l'ABA inhibent l'activité haustoriogène de la fraction 9 d'*A. thaliana* mais n'ont pas d'effet sur la fraction 16.**

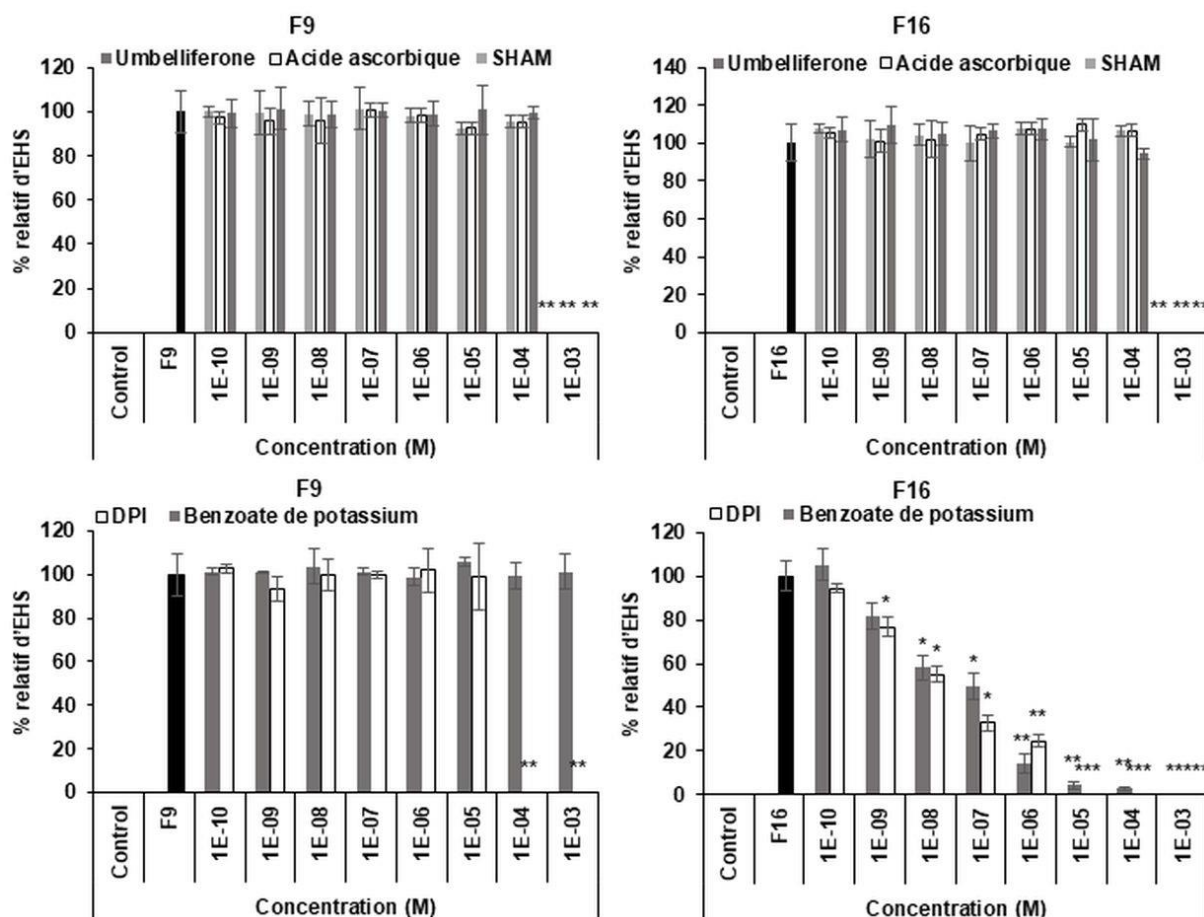
Cinquante  $\mu\text{L}$  de PI-55, LGR-991, ANA et ABA ont été testés en co-traitement de  $10^{-4}$  M à  $10^{-10}$  M sur 50  $\mu\text{L}$  de BAP ( $10^{-5}$  M) ou de *c/tZ* ( $10^{-7}$  M), la fraction 9 ou 16 ( $10^{-2}$ ) d'*A. thaliana* (Col-0). Les dilutions ont été réalisées dans la solution tampon (HEPES 0,5 mM, pH 7,5, PPM à 0,05% p/v) constituant le témoin négatif (contrôle), la BAP ( $10^{-5}$  M), la *c/tZ* ( $10^{-7}$  M) et les fractions 9 et 16 ( $10^{-2}$ ) testées seules étaient les témoins positifs. Les résultats sont exprimés en pourcentage relatif du nombre d'EHS formés pour la BAP, la *c/tZ* et la fraction 9 ou 16. Les moyennes sont représentées avec leur erreurs standards ( $n=6$ ). Les moyennes annotées avec des astérisques sont significativement différentes des témoins positifs ( $t$ -test,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  et  $***p < 0,001$ ).

identifiés chez *T. versicolor* comme répondants au DMBQ lors de l'haustoriogenèse (Bandaranayake *et al.*, 2010).

Il apparaît ainsi que la fraction 9 des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* et de *S. lycopersicum* induit l'expression des gènes codant pour la dégradation des CK, *PrCKX2*, *PrCKX4*, *PrCKX5*, après 24h de traitement similairement à la *c/tZ* qui, de manière différentielle, induit en plus l'expression du gène *PrCKX1* (*t*-test,  $p < 0,001$ ) (**Figure 2.8**). Par ailleurs, la fraction 9 des deux plantes testées induit également l'accumulation de transcrits des gènes *PrRR5*, *PrZFP6* et *PrTRN2* après 24h de traitement de la même manière que la *c/tZ* (*t*-test,  $p < 0,001$ ) (**Figure 2.8**). Les cinétiques d'expression des gènes *PrRR5*, *PrZFP6* et *PrTRN2* sont similaires entre un traitement avec la fraction 9 d'*A. thaliana* et la *c/tZ* (**Figure 2.9**). En particulier, la fraction 9 d'*A. thaliana* induit ici une expression du gène de réponse aux CK *PrRR5*, dès 30 min de traitement, de la même façon que la *c/tZ* (*t*-test,  $p < 0,001$ ). Le gène *PrZFP6* est quant à lui exprimé après 6h de traitement par la fraction 9 d'*A. thaliana* ou par la *c/tZ* (*t*-test,  $p < 0,001$ ). Enfin, la fraction 9 d'*A. thaliana* induit l'expression du gène *PrTRN2* après 3h de traitement comme la *c/tZ* (*t*-test,  $p < 0,001$ ). L'ensemble de ces résultats confirme que les fractions 9 d'*A. thaliana* et de *S. lycopersicum*, induisent une signalisation de type CK. Les fractions 9 sont également capables d'induire l'expression de gènes impliqués dans la formation de structures différenciées, *PrZFP6* et *PrTRN2*, comme la *c/tZ*. En revanche, la fraction 9 d'*A. thaliana* et la *c/tZ* n'induisent aucune expression différentielle des gènes associés à la réponse d'oxydoréduction observée chez *T. versicolor* en réponse au DMBQ (*PrQR1*, *PrQR2* et *PrPirin*).

La fraction 16 d'*A. thaliana* ne permet pas, quant à elle, d'induire l'expression des gènes *PrCKX1*, *PrCKX2*, *PrCK4*, *PrCKX5* (**Figure 2.8 et 2.9**) et ni la fraction 16 d'*A. thaliana*, ni celle de *S. lycopersicum* n'induisent l'accumulation des transcrits *PrRR5* et *PrZFP6* (**Figure 2.8**). Seule une expression différentielle du gène *PrTRN2* est observée en réponse à la fraction 16 d'*A. thaliana* et de *S. lycopersicum*. De plus, le profil d'expression de *PrTRN2* obtenu pour la fraction 16 d'*A. thaliana* est similaire à celui obtenu pour la fraction 9 d'*A. thaliana* et la *c/tZ*, avec une expression dès 3h de traitement (*t*-test,  $p < 0,001$ ) (**Figure 2.9**). De la même manière que pour la fraction 9, aucun des gènes choisis associés à la réponse d'oxydoréduction ne sont exprimés en réponse à la fraction 16 d'*A. thaliana* (**Figure 2.9**).

Quelle que soit l'origine des extraits rhizosphériques, ces résultats mettent ainsi en évidence la présence d'une signalisation CK-dépendante en réponse à la fraction 9 de *S. lycopersicum* et d'*A. thaliana*. Cette réponse est équivalente à celle observée pour un traitement par des CK seules et montre également une induction de l'expression de gènes proposés comme étant associés à la formation de l'haustorium. En revanche, la réponse moléculaire CK dépendante



**Figure 2.11. Le DPI et le benzoate de potassium inhibent l'activité haustoriogène de la fraction 16 d'*A. thaliana* mais n'ont pas d'effet sur la fraction 9.**

Cinquante  $\mu\text{L}$  d'umbelliferone, acide ascorbique, SHAM, DPI et benzoate de potassium ont été testés en co-traitement de  $10^{-3}$  M à  $10^{-10}$  M sur  $50 \mu\text{L}$  de la fraction 9 ou 16 ( $10^{-2}$ ) d'*A. thaliana* (Col-0). Les dilutions ont été réalisées dans la solution tampon (HEPES 0,5 mM, pH 7,5, PPM à 0,05% p/v) constituant le témoin négatif (contrôle) et les fractions 9 et 16 ( $10^{-2}$ ) testées seules étaient les témoins positifs. Les résultats sont exprimés en pourcentage relatif du nombre d'EHS formés pour la fraction 9 ou 16. Les moyennes sont représentées avec leur erreurs standards ( $n=6$ ). Les moyennes annotées avec des astérisques sont significativement différentes des témoins positifs ( $t$ -test,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  et  $***p < 0,001$ ).

**Tableau 2.12. Quantité totale de cytokinines détectées dans les extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* (Col-0) après concentration par SPE inverse.**

La quantité totale de CK détectées dans le produit SPE est exprimée en mol/g de matière sèche racinaire obtenue en fin de culture (MS). Le pourcentage d'induction des EHS du produit SPE est indiqué avec l'erreur standard ( $n=3$ ).

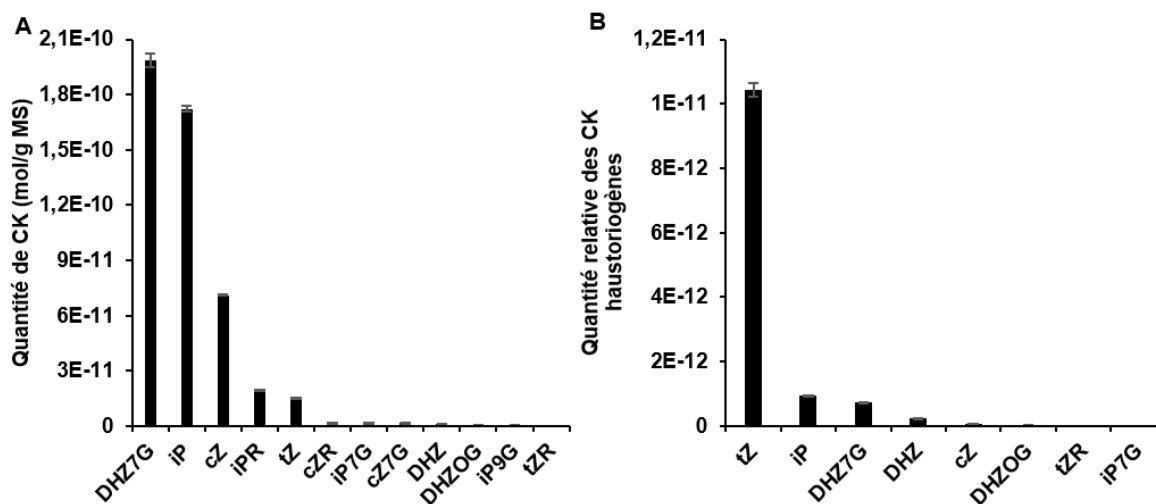
Quantité cumulée de CK (mol/g MS)	Pourcentage d'EHS formés
$4,8 \cdot 10^{-10}$	$52,5 \pm 3,9\%$

est inexistante suite à un traitement par la fraction 16 d'*A. thaliana*. Par ailleurs, aucun des gènes choisis pour témoigner d'une voie de signalisation associée à une réponse d'oxydoréduction ne sont surexprimés en réponse aux fractions 9 et 16 d'*A. thaliana*. De manière intéressante, les fractions 9 et 16 issues des extraits des deux plantes induisent toutes deux l'expression de *PrTRN2*. Ces résultats proposeraient ainsi le gène *PrTRN2* comme un intégrateur du signal haustoriogène chez *P. ramosa*.

### 5. Effets d'inhibiteurs pharmacologiques sur l'activité haustoriogène des fractions 9 et 16

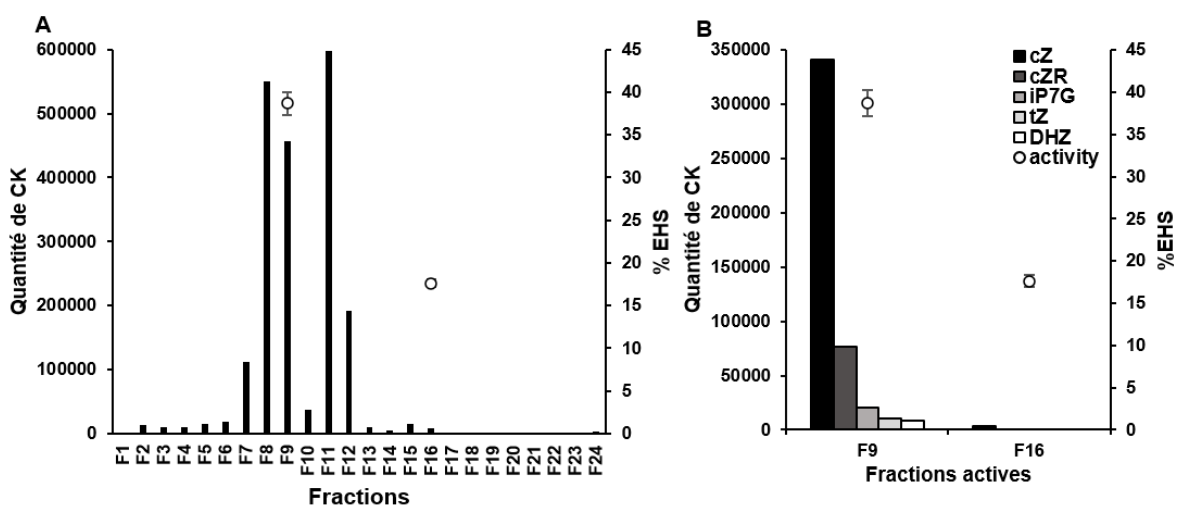
Les fractions 9 et 16 semblent ainsi induire des voies de signalisation distinctes, avec l'activation d'une signalisation CK-dépendante dans la fraction 9. Si la fraction 9 est connue pour contenir des composés de type CK (Goyet *et al.*, 2017), la composition de la fraction 16 reste inconnue. Afin de préciser la nature de ces signaux et la réponse de *P. ramosa*, une approche pharmacologique a été privilégiée. Des inhibiteurs compétitifs de la perception des CK incluant le PI-55 et le LGR-991, des antagonistes des CK l'auxine (ANA) et l'acide abscissique (ABA), ont ainsi été testés pour différentes concentrations conjointement avec les fractions 9 ou 16 d'*A. thaliana* et la BAP ou la *c/tZ* (**Figure 2.10**). Par ailleurs, il a été montré chez les plantes hémiparasites que le développement de l'haustorium implique une signalisation comprenant des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Aussi, la présence potentielle de ces composés dans les fractions a été ici vérifiée à travers l'utilisation d'inhibiteurs relatifs à la production de ROS (acide ascorbique, acide salicylhydroxamique, diphenyleiodonium, umbelliférol, benzoate de potassium), testés pour différentes concentrations lors de traitements conjoints avec les fractions 9 ou 16 d'*A. thaliana*, la BAP ou la *c/tZ* (**Figure 2.11**).

Une inhibition significative de 71% et 43% de l'activité haustoriogène de la fraction 9 est observée en présence de PI-55 pour des concentrations respectives de  $10^{-6}$  M et  $10^{-5}$  M. Ce résultat est également observable pour l'activité de la BAP ( $10^{-5}$  M), avec une diminution de l'activité haustoriogène de  $71 \pm 3\%$  en moyenne pour des concentrations de PI-55 de  $10^{-9}$  M à  $10^{-5}$  M (*t*-test,  $p < 0,01$ ). L'auxine et l'acide abscissique apparaissent également avoir un effet sur l'activité haustoriogène de la fraction 9, avec une inhibition respective de 87% et 57% observée à  $10^{-6}$  M, 100% et 68% à  $10^{-5}$  M et 100% à  $10^{-4}$  M (*t*-test,  $p < 0,001$  et  $p < 0,01$ ). Quelle que soit la concentration en LGR-991, aucune inhibition de l'activité haustoriogène de la fraction 9 ou de la BAP n'est observée. Par ailleurs, aucun des inhibiteurs associés aux CK (le PI-55, le LGR-991, ANA ou l'ABA) n'a montré d'effet sur l'activité haustoriogène de la fraction 16 (**Figure 2.10**).



**Figure 2.12. Quantification des cytokinines dans les extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* (Col-0) concentrés par SPE inverse et quantité relative des cytokinines haustoriogènes détectées.**

**A.** Quantités en mol/g MS des composés DHZ7G, iP, cZ, iPR, tZ, cZR, iP7G, cZ7G, DHZ, DHZOG, iP9G, tZR détectés dans les extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* (Col-0) concentrés par SPE inverse. **B.** Quantité relative des composés haustoriogènes tZ, iP, DHZ7G, DHZ, cZ, iP7G, DHZOG, tZR, iP7G, détectés dans les extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* (Col-0) concentrés par SPE inverse. Les facteurs de correction prenant en compte l'Ec50 de chaque CK, calculé par rapport à la tZ (Ec50  $1,1 \cdot 10^{-8} \pm 1,6 \cdot 10^{-9}$ ) et l'activité haustoriogène maximale par rapport à la tZ ( $61 \pm 4\%$  d'EHS formés) ont été appliqués sur les données de quantification. L'activité haustoriogène (Ec50 et activité haustoriogène maximale) de l'iPR, l'iP9G, la cZR, et la cZ7G n'ayant pas été testée, l'activité haustoriogène relative de ces composés n'a pu être déterminée.



**Figure 2.13. Identification de cytokinines dans les fractions des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* (Col-0).**

**A.** Somme de la totalité des CK identifiées pour les 24 fractions d'*A. thaliana* (Col-0). **B.** Quantités des composés cZ, cZR, iP7G, tZ, DHZ, identifiés dans les fractions 9 et 16 issues du fractionnement par HPLC inverse des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* (Col-0). Les données représentent la valeur de l'aire sous la courbe du pic chromatographique obtenu pour chaque CK. Le pourcentage d'EHS induit par les fractions actives (F9 et F16) est représenté sur l'ordonnée droite du graphique (activité, ○). Les moyennes sont représentées avec leurs erreurs standards (n=3).

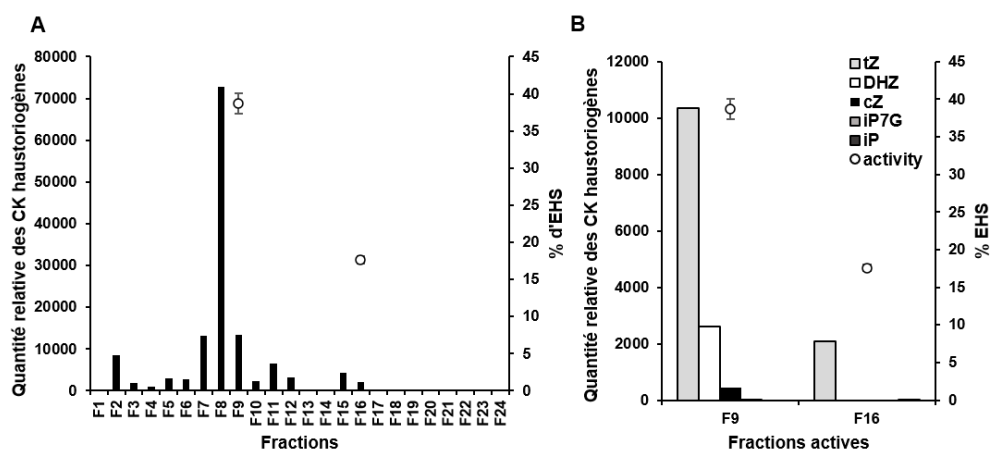
Parmi les inhibiteurs des ROS également testés afin de vérifier la présence d'un signal haustoriogène faisant intervenir des mécanismes d'oxydoréduction, seuls le DPI et le benzoate de potassium s'avèrent inhiber l'activité de fraction 16 (**Figure 2.11**). Cette inhibition est observée pour des concentrations de  $10^{-9}$  M à  $10^{-5}$  M pour le DPI (les concentrations à  $10^{-4}$  M et  $10^{-3}$  M ayant un effet léthal sur les graines de *P. ramosa*), avec une inhibition de 23% à 100% et de  $10^{-8}$  M à  $10^{-3}$  M pour le benzoate de potassium pour une inhibition de 42% à 100% (*t*-test,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$ ). En revanche, ces composés n'affectent pas l'activité haustoriogène lorsqu'ils sont utilisés en co-traitement avec la fraction 9.

Ainsi, le même comportement est observé pour la fraction 9 et les CK (BAP ou *cZ*), avec une inhibition de l'activité haustoriogène en présence de PI-55, ANA ou ABA, ce qui permet de confirmer l'activité haustoriogène de composés CK dans cette fraction. A l'inverse, si l'activité haustoriogène de la fraction 16 n'est pas impactée par les inhibiteurs liés aux CK, elle est inhibée par le DPI et le benzoate de potassium. Ces composés sont plus particulièrement impliqués dans l'inhibition de la formation de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), indiquant un lien possible des composés de la fraction 16 avec la production de ROS. Ces résultats mettent en évidence la présence de composés aux propriétés chimiques distinctes dans les fractions 9 et 16, induisant des voies de signalisation distinctes mais conduisant communément à la surexpression du gène *PrTRN2*. Ils permettent également d'en savoir plus sur les acteurs qui composent ces deux signaux.

## 6. Identification et quantification des cytokinines dans les extraits rhizosphériques d'*A. thaliana*

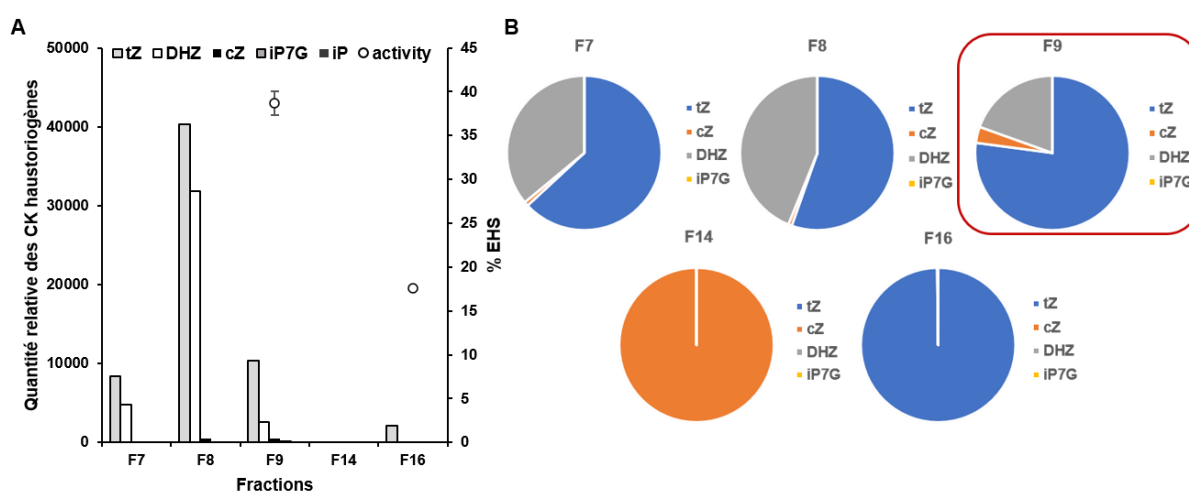
Afin d'identifier les CK à activité haustoriogène présentes dans les extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* (Col-0), les 24 fractions issues de ces extraits, ainsi que le produit SPE, ont été lyophilisés et transmis pour des analyses UPLC-MS/MS au LGR (Laboratory of Growth Substances, Université d'Olomouc).

Les CK ont été quantifiées dans le produit SPE issu des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* (Col-0) (**Tableau 2.12, Figure 2.12**). Ce dernier accumule ainsi  $4,8 \cdot 10^{-10}$  mol/g MS de CK, avec la plus forte quantité pour la DHZ7G ( $2,0 \cdot 10^{-10} \pm 3,8 \cdot 10^{-12}$  mol/g MS), puis l'iP ( $1,7 \cdot 10^{-10} \pm 1,8 \cdot 10^{-12}$  mol/g MS) et la *cZ* ( $7,1 \cdot 10^{-11} \pm 2,5 \cdot 10^{-13}$  mol/g MS). Ensuite, sont présents les composés iPR et *tZ* pour des quantités respectives de  $2,0 \cdot 10^{-11} \pm 2,9 \cdot 10^{-14}$  mol/g et  $1,5 \cdot 10^{-11} \pm 3,1 \cdot 10^{-13}$  mol/g MS. Enfin, la *cZR*, l'iP7G, la *cZ7G*, la DHZ, la DHZOG, l'iP9G, et la *tZR* sont détectées pour des quantités allant de  $2 \cdot 10^{-12}$  à  $1 \cdot 10^{-13}$  mol/g MS (**Figure 2.12.A**). Afin de déterminer la significativité de ces quantifications, l'activité haustoriogène propre à chaque CK a été prise en compte dans les résultats de quantification du produit SPE. Un facteur de correction prenant en compte l'Ec50 et l'activité haustoriogène maximale de la CK détectée



**Figure 2.14. Quantité relative des cytokinines haustoriogènes identifiées dans les fractions des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* (Col-0).**

**A.** La quantité relative des CK haustoriogènes cumulée est représentée pour chaque fraction d'*A. thaliana* (Col-0). **B.** La quantité relative des composés haustoriogènes tZ, DHZ, cZ, iP7G, iP, identifiés dans les fractions 9 et 16 issues du fractionnement par HPLC inverse des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* (Col-0). Les données représentent la valeur de l'aire sous le pic chromatographique obtenu pour chaque CK avec l'application des facteurs de correction prenant en compte l'Ec50 et l'activité haustoriogène maximale de chaque CK, calculé par rapport à la tZ (Ec50  $1,1 \cdot 10^{-8} \pm 1,6 \cdot 10^{-9}$  et  $61 \pm 4\%$  d'EHS formés). L'activité haustoriogène (Ec50 et activité haustoriogène maximale) de la cZR n'ayant pas été testée, l'activité haustoriogène relative de ce composé n'a pu être déterminée. Le pourcentage d'EHS induit par les fractions actives (F9 et F16) est représenté sur l'ordonnée droite du graphique (activité, ○). Les moyennes sont représentées avec leurs erreurs standards (n=3).

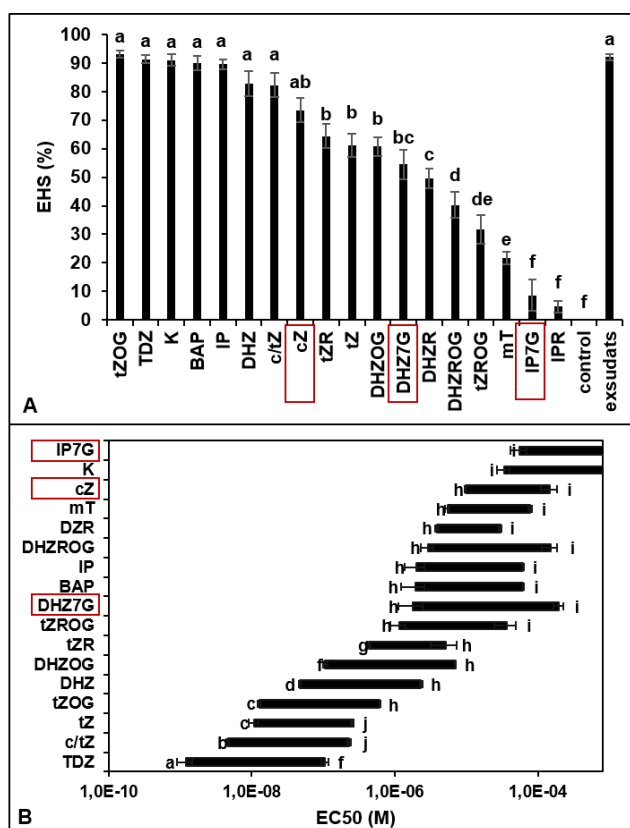


**Figure 2.15. Quantité relative des cytokinines haustoriogènes et représentation graphique de leur proportion dans les fractions haustoriogènes 9 et 16 et non haustoriogènes 7, 8, et 14 des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* (Col-0).**

**A.** La quantité relative des composés haustoriogènes tZ, DHZ, cZ, iP7G, iP, dans les fractions 7, 8, 9, 14 et 16 issues du fractionnement par HPLC inverse des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* (Col-0). Les données représentent la valeur de l'aire sous le pic chromatographique obtenu pour chaque CK avec l'application des facteurs de correction prenant en compte l'Ec50 et l'activité haustoriogène maximale de chaque CK, calculé par rapport à la tZ (Ec50  $1,1 \cdot 10^{-8} \pm 1,6 \cdot 10^{-9}$  et  $61 \pm 4\%$  d'EHS formés). L'activité haustoriogène (Ec50 et activité haustoriogène maximale) de la cZR n'ayant pas été testée, l'activité haustoriogène relative de ce composé n'a pu être déterminée. Le pourcentage d'EHS induit par les fractions actives (F9 et F16) est représenté sur l'ordonnée droite du graphique (activité, ○). Les moyennes sont représentées avec leurs erreurs standards (n=3). **B.** Représentation graphique des proportions (en pourcentage) des quantités relatives des CK haustoriogènes tZ, cZ, DHZ, iP7G qui composent chaque fraction haustoriogènes 9 et 16 et non haustoriogènes 7, 8 et 14.

par rapport à la CK la plus active, la *tZ* ( $Ec_{50} 1,1 \cdot 10^{-8} \pm 1,6 \cdot 10^{-9}$  et  $61 \pm 4\%$  d'EHS formés, Goyet *et al.*, 2017) a ainsi été appliqué pour chaque CK (**Tableau 2.5**). Les résultats de cette quantification relative dans le produit SPE sont présentés dans la **Figure 2.12.B**. Il apparaît ainsi que l'activité haustoriogène du produit SPE est majoritairement représentée par la *tZ* (activité haustoriogène relative de  $1,0 \cdot 10^{-11} \pm 2,1 \cdot 10^{-13}$ ). L'activité haustoriogène serait ensuite représentée par l'iP ( $9,3 \cdot 10^{-13} \pm 9,5 \cdot 10^{-15}$ ), la DHZ7G ( $7,3 \cdot 10^{-13} \pm 1,4 \cdot 10^{-14}$ ) et la DHZ ( $2,5 \cdot 10^{-13} \pm 2,7 \cdot 10^{-15}$ ). Bien que présents, les composés *cZ*, DHZOG, *tZR* et iP7G représentent plus faiblement l'activité haustoriogène de l'extrait SPE, avec des quantifications relatives allant de  $6 \cdot 10^{-14}$  à  $3 \cdot 10^{-17}$ . L'activité haustoriogène ( $Ec_{50}$  et activité haustoriogène maximale) de l'iPR, l'iP9G, la *cZR*, et la *cZ7G* n'ayant pas été testée, les quantifications relatives à l'activité haustoriale n'ont pas pu être déterminées pour ces composés.

Les différentes CK présentes ont par ailleurs été identifiées dans chacune des 24 fractions d'*A. thaliana* (Col-0) individuellement. La majorité des CK détectées s'accumule ainsi plus fortement dans les fractions 8, 9 et 11, avec une aire sous le pic total des composés de 457148 pour la fraction 9 contre seulement 7604 pour la fraction 16 (**Figure 2.13.A**). Le détail des composés présents dans les fractions actives révèle que la fraction 9 d'*A. thaliana* (Col-0) contient de la *cZ* en plus forte quantité (aire sous le pic de 340746), puis de la *cZR*, de l'iP7G, de la *tZ* et enfin de la DHZ (aires sous le pic respectives de 76903, 20810, 10346 et 8344). Seule la *cZ* et la *tZ* ont été détectées dans la fraction 16, toutefois à de très faibles quantités (aire sous le pic de 3376 et de 2090) (**Figure 2.13.B**). La quantification/contribution relative à l'activité haustoriogène des CK détectées dans les 24 fractions a également été évaluée grâce à l'application des facteurs de correction intégrant l' $Ec_{50}$  et l'activité haustoriogène maximale (hormis pour la *cZR*) (**Figure 2.14**). De façon inattendue, cette quantification relative des CK haustoriogènes montre ainsi qu'elles s'accumulent majoritairement dans la fraction 8, puis dans les fractions 9 et 7 (**Figure 2.14.A**). A sein de la fraction 9 active, c'est la *tZ* qui est la représentante majeure de l'activité haustoriogène relative (10346), puis la DHZ (2619), la *cZ* (452) et l'iP7G (0,6) (**Figure 2.14.B**). Bien que les fractions 7 et 8 ne soient pas actives, de fortes quantités relatives de *tZ* sont néanmoins présentes dans ces deux fractions (7 : 8362 ; 8 : 40268) (**Figure 2.15.A**). Comme pour la fraction 9, ce sont ensuite les composés DHZ (4777 et 31893 pour les fractions 7 et 8) et *cZ* (118 et 542), qui apparaissent. Aucune présence du composé iP7G n'a pu être détectée dans ces fractions, à la différence de la fraction 9. La seconde fraction active 16 contient de des très faibles quantités relatives, probablement non significatives, de *tZ* (2090), iP (17) et *cZ* (5). A titre de comparaison, la fraction non haustoriogène n°14, qui est séparée pour un temps d'élution proche de celui de la fraction 16 (respectivement 25-26 min et 27-28 min), contient également des quantités non significatives de CK, avec de la *cZ* (3,3) et de l'iP (24). Ce dernier ne fait en revanche pas partie de la



**Figure 2.16. Activité haustoriogène des cytokinines (d'après Goyet et al., 2017).**

**A.** Pourcentage maximal d'induction des EHS à l'apex des radicules de graines germées de *P. ramosa* évalué après 72h de traitement. Les concentrations optimales des CK utilisées sont : tZOG (10<sup>-7</sup> M), TDZ (10<sup>-8</sup> M), K (10<sup>-4</sup> M), BAP (10<sup>-5</sup> M), iP (10<sup>-5</sup> M), DHZ (10<sup>-7</sup> M), c/tZ (10<sup>-7</sup> M), cZ (10<sup>-5</sup> M), tZR (10<sup>-6</sup> M), tZ (10<sup>-7</sup> M), DHZOG (10<sup>-6</sup> M), DHZ7G (10<sup>-5</sup> M), DHZR (10<sup>-5</sup> M), DHZROG (10<sup>-5</sup> M), tZROG (10<sup>-6</sup> M), mT (10<sup>-5</sup> M), iP7G (10<sup>-4</sup> M), iPR (10<sup>-5</sup> M). **B.** L'intervalle de concentrations de l'activité des CK correspondant aux concentrations efficaces médianes. Les moyennes sont représentées avec leurs erreurs standards (n=6). Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes du contrôle (Tukey-HSD, *p* < 0,01).

**Tableau 2.13. Activité haustoriogène pour différentes dilutions des 24 fractions HPLC issues des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana*.**

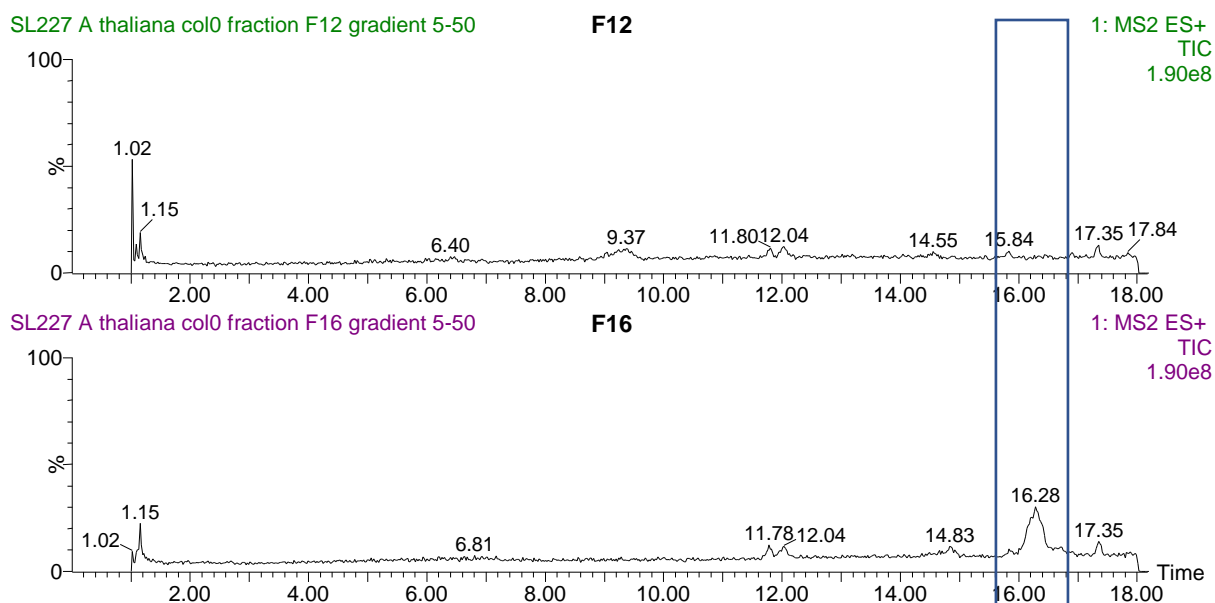
Le pourcentage d'EHS induit a été évalué après concentration par SPE inverse et après fractionnement par HPLC inverse sur des graines prégermées de *P. ramosa*. Les 24 fractions HPLC ont été testées pour leur induction haustoriale pour différentes dilutions de 10<sup>-2</sup> M à 10<sup>-9</sup> M dans le tampon (HEPES 0,5 mM, pH 7,5, PPM à 0,05% p/v) avec la solution tampon comme témoin négatif (control). Les moyennes sont représentées avec leur erreurs standards (n=3). Les moyennes annotées avec des astérisques sont significativement différentes du contrôle négatif (*t*-test, \**p* < 0,05 et \*\*\**p* < 0,001).

% d'EHS Fractions	Dilutions							
	1,E-02	1,E-03	1,E-04	1,E-05	1,E-06	1,E-07	1,E-08	1,E-09
Control	0	0	0	0	0	0	0	0
F1 - F7	0	0	0	0	0	0	0	0
F8	4 ± 3	0	0	0	0	0	0	0
F9	39 ± 1***	15 ± 3 *	10 ± 5	0	0	0	0	0
F10	2 ± 2	0	0	0	0	0	0	0
F11 - F15	0	0	0	0	0	0	0	0
F16	18 ± 1***	4 ± 3	0	0	0	0	0	0
F17 - F24	0	0	0	0	0	0	0	0

composition de la fraction 7, 8 ou 9. Le seul composé présent de manière différentielle uniquement dans la fraction active 9 est l'iP7G. Ce composé n'est toutefois présent qu'en quantités relatives très faibles (0,6) dans la fraction 9 et il possède, de plus, une des plus faibles efficacités à induire la formation d'EHS (**Figure 2.16**). La **Figure 2.15.B** représente les proportions des quantités relatives des CK haustoriogènes pour chacune des fractions. Les pourcentages respectifs des quantités relatives de tZ, cZ, DHZ et iP7G qui composent les fractions actives 9 et 16 et non actives 7, 8 et 14 9 ont ainsi été déterminés sur la quantité totale de ces CK accumulées dans chaque fraction. Ces résultats montrent que les fractions 7, 8 et 9 contiennent une plus grande proportion de tZ (respectivement 63%, 55% et 77%), puis de DHZ (36%, 44% et 20%). Seule la cZ est en plus forte proportion dans la fraction 9 (3%), en comparaison avec les autres fractions non actives 7 et 8 (respectivement 0,9% et 0,7%). La composition en CK de la fraction 16 correspond à 99,7% de tZ et 0,2% de cZ, tandis que celle de la fraction 14 est de 100% de cZ. Néanmoins la présence de CK dans la fraction 8, bien que non active, et ce en quantité plus importante que dans la fraction 9, pose question. Goyet *et al.* (2017) ont montré que les CK montrent une activité haustoriogène restreinte à une fenêtre de concentrations d'amplitude variable selon les CK (**Figure 2.16**). Ainsi, en dehors et notamment au-delà de cette fenêtre, les CK ne sont pas actives. Toutefois, l'hypothèse d'une concentration trop élevée en CK haustoriogènes dans la fraction 8 est néanmoins écartée car des dilutions de cette fraction ne révèlent pas d'activité haustoriogène (**Tableau 2.13**). Demeure donc l'hypothèse que l'activité haustoriogène d'une fraction pourrait dépendre non seulement de la concentration des CK endogènes mais aussi de leurs proportions relatives. Ainsi, seule la fraction 9 présenterait des proportions favorables de tZ, cZ et DHZ (3/0,1/1) à l'induction de la formation de l'haustorium.

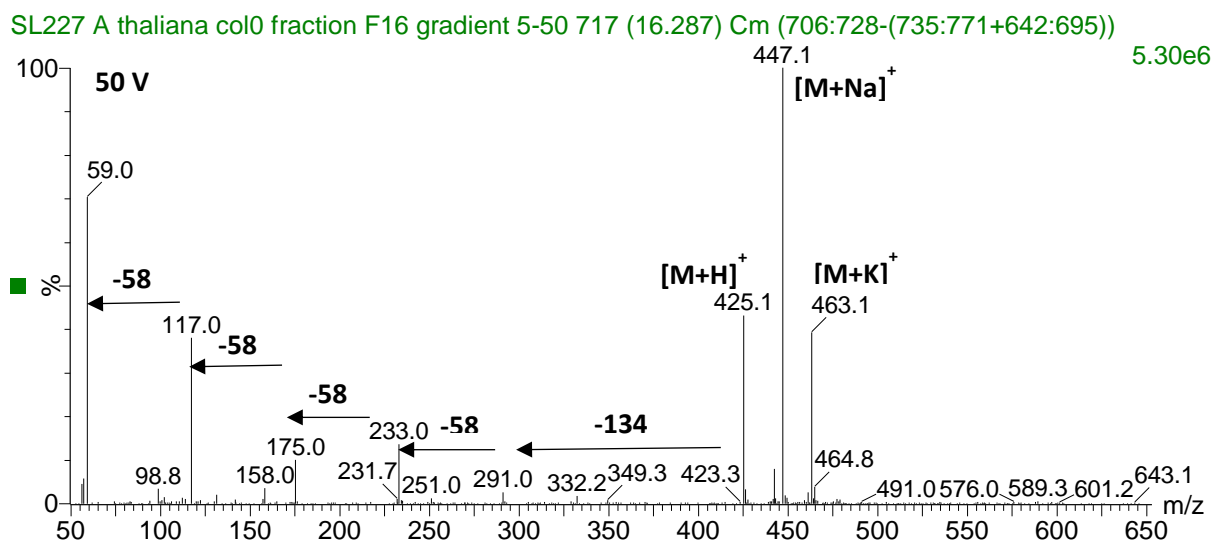
Précisons par ailleurs que l'identification des composés présents dans les fractions a permis de mettre en évidence de nouveaux composés jamais testés pour leur activité haustoriogène, comme la cZ et l'iP7G mais aussi la DHZ7G présente en forte quantité dans le produit SPE. Leur activité haustoriogène a donc dû être évaluée sur des graines germées de *P. ramosa*, ce qui complète les résultats de Goyet *et al.* (2017) quant au potentiel haustoriogène des CK. Il s'avère que ces trois composés sont capables d'induire des EHS à l'apex des radicules de *P. ramosa* (**Figure 2.16**). Dans les concentrations testées de  $10^{-4}$  M à  $10^{-14}$  M, c'est la cZ qui présente le plus fort taux d'activité haustoriogène ( $73,4 \pm 0,04\%$  d'EHS), puis la DHZ7G avec une activité haustoriogène maximale de  $54,5 \pm 0,05\%$  et enfin une activité plus faible pour l'iP7G de  $8,61 \pm 0,05\%$ . Ces composés ont par ailleurs de faibles concentrations efficaces, avec la plus faible autour de  $10^{-4}$  M pour l'iP7G,  $10^{-5}$  M pour la cZ et la DHZ7G.

L'ensemble de ces résultats permet de mettre en évidence une accumulation de CK dans les fractions 8, 9 et 11 et de très faibles quantités dans la fraction active 16. La quantification



**Figure 2.17. Chromatogramme ULC-MS full scan ES+ de la fraction 16 d'*A. thaliana* en comparaison avec une fraction sans activité haustoriogène (n°12).**

Présence d'un pic différentiel entre la fraction 12 et la fraction 16 pour un temps de rétention de 16,28 min (encadré bleu).



**Figure 2.18. Spectre de masse du pic d'intérêt contenu dans la fraction 16 des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana*.**

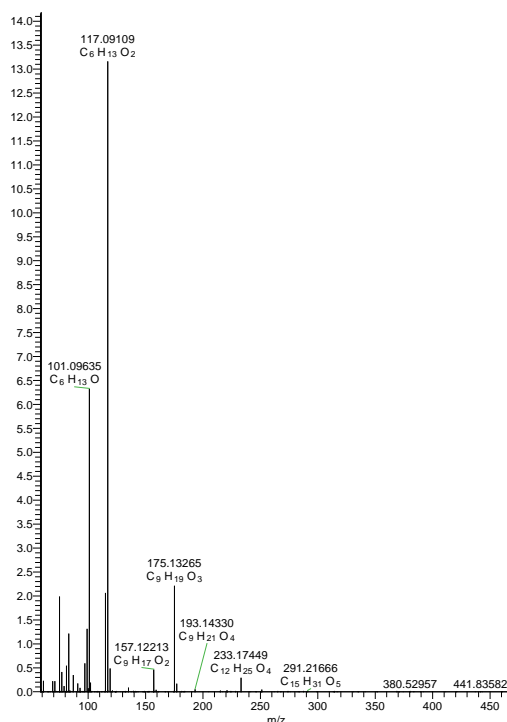
Le spectre de masse en mode positif du pic différentiel contenu dans la fraction 16 permet d'estimer le poids moléculaire de l'analyte recherché à 424 Da, grâce à la présence de l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  avec un rapport m/z de 425 et la présence de nombreux adduits formés dans la source électrospray  $[M+Na]^+$  et  $[M+K]^+$ . L'ion se fragmente en source à une tension de cône de 50 V et accuse une première perte de 134 Da donnant un fragment au m/z de 291. Puis, 4 pertes successives de 58 Da sont relevées donnant les fragments au m/z 233, 175, 117 et 59.

relative des CK à activité haustoriogène montre qu'elles s'accumulent aussi bien dans les fractions 7, 8 pourtant inactives, et dans la fraction 9, active. La seule distinction qualitative entre ces fractions est la présence différentielle de l'iP7G et de la cZR. Si la quantité relative de cZR n'a pu être déterminée, l'iP7G est un composé très peu actif par rapport aux autres CK pour les concentrations testées. L'activité haustoriogène de la fraction 9 ne s'expliquerait donc pas seulement par la présence discriminante de ces composés. Toutefois, il apparaît que les CK haustoriogènes sont présentes dans des proportions relatives permettant de différencier la fraction 9 active des fractions 7 et 8 inactives. Ainsi, nous posons l'hypothèse que l'activité haustoriogène du produit SPE et de la fraction 9 pourrait être due non pas à une CK en particulier, mais à la présence d'un bouquet de CK en proportion favorables pour induire globalement une forte activité haustoriogène.

## 7. Identification du composé haustoriogène de la fraction 16

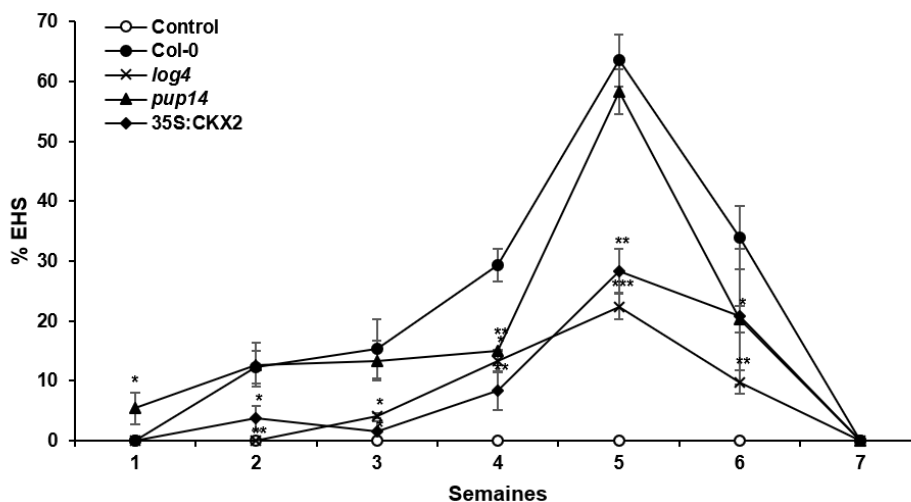
Afin de déterminer la nature des composés qui portent l'activité haustoriogène de la fraction 16, cette fraction et une fraction non active n°12 d'*A. thaliana* (Col-0) ont été analysées par UPLC-MS/MS au laboratoire BBV (Biomolécules et Biotechnologies Végétales, Université de Tours, France).

L'analyse des spectres complets de ces deux fractions a mis en évidence la présence d'un pic différentiel (**Figure 2.17**), qui apparaît pour un temps de rétention de 16,28 min uniquement dans la fraction 16. Le composé recherché n'absorbe pas dans le spectre UV (détecteur DAD 200-500 nm). Une analyse par spectrométrie de masse a été réalisée sur le pic présent dans la fraction 16 et a permis de détecter un composé de 424 Da, par analogie avec la présence de l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  connu pour avoir un rapport masse sur charge ( $m/z$ ) de 425 (**Figure 2.18**). De nombreux adduits, se formant dans la source électrospray comme  $[M+Na]^+$  et  $[M+K]^+$ , ont permis de confirmer cette estimation. L'ion détecté se fragmente ainsi en source électrospray pour une tension de 50 V, donnant les fragments au  $m/z$  de 291, 233, 175, 117, 59. L'ion parent  $m/z$  de 425 accuse ainsi une première perte de neutre de 134 Da, donnant un premier fragment au  $m/z$  de 291. Puis, l'ion subit 4 pertes successives de 58 Da chacune, donnant successivement les fragments 233, 175, 117, 59. La présence de quatre pertes successives de neutre de 58 Da indiquerait qu'il s'agit d'un motif répété pouvant s'apparenter à une chaîne latérale qui pourrait être associée à une perte du motif  $C_4H_{10}$  ou  $C_3H_6$ . Le spectre MS/MS haute résolution permet de déterminer la masse monoisotopique théorique du composé de la fraction 16, avec un  $m/z$  de 424.302755, déterminé grâce au  $m/z$  de 425.31058 de l'ion  $[M+H]^+$ . L'analyse du spectre MS/MS permet également de proposer des formules brutes pour les différents fragments observés correspondant successivement aux



**Figure 2.19. Spectre MS/MS haute résolution de l'ion parent du composé détecté dans la fraction 16 des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana*.**

Le spectre MS/MS haute résolution de l'ion parent  $m/z$  425 détecté dans la fraction 16 en ES+ permet d'identifier des formules brutes pour les différents fragments observés et d'établir la masse monoisotopique théorique du composé ayant un  $m/z$  de 424.302755. Le premier fragment au  $m/z$  de 291 correspond à un squelette  $C_{15}H_{31}O_5$ . Puis, les 4 pertes successives donnant les fragments au  $m/z$  233, 175, 117, 101, correspondent aux motifs respectifs suivants :  $C_{12}H_{25}O_4$ ,  $C_9H_{19}O_3$ ,  $C_6H_{13}O_2$  et  $C_6H_{13}O$ .



**Figure 2.20. Cinétique de l'activité haustoriogène des extraits rhizosphériques de l'écotype sauvage Col-0, des mutants *log4*, *pup14* et de la lignée transgénique 35S:CKX2, évaluée sur 7 semaines.**

Les extraits rhizosphériques ont été filtrés à  $0,22 \mu m$  et testés pour l'induction des EHS sur des graines germées de *P. ramosa*. Les extraits ont été dilués à  $5 \cdot 10^{-1}$  dans la solution tampon (HEPES 0,5 mM, pH 7,5, PPM à 0,05% p/v). L'activité haustoriogène est exprimée en pourcentage d'EHS avec un facteur de correction pour les mutants *log4*, *pup14* et la lignée transgénique 35S:CKX2. Le facteur de correction est calculé pour chaque semaine d'exsudation à partir des rapports des volumes d'extraits récoltés par semaine sur la masse racinaire sèche totale obtenue en fin de culture, en prenant les ratios de Col-0 comme référence. Les moyennes sont représentées avec leur erreurs standards ( $n=6$ ). Les moyennes annotées avec des astérisques sont significativement différentes de Col-0 (milieu d'incubation : HEPES 0,5 mM, pH 7,5, PPM à 0,05% p/v ;  $t$ -test, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

formules brutes  $C_{15}H_{31}O_5$  (m/z 291),  $C_{12}H_{25}O_4$  (m/z 233),  $C_9H_{19}O_3$  (m/z 175),  $C_6H_{13}O_2$  (m/z 117) et  $C_6H_{13}O$  (m/z 101) (**Figure 2.19**).

Ces données permettent d'écarter l'implication de composés phénoliques dans la fraction 16 puisqu'aucun spectre UV n'a été relevé, mais révèlent la présence d'un composé uniquement présent dans la fraction 16. Ce composé a un poids moléculaire de 424 g/mol et sa fragmentation en 4 motifs répétés avec des pertes de neutre de 58 Da indique la présence d'une chaîne latérale. Plusieurs formules brutes ont été associées aux différentes fragmentations de ce composé et si son identité reste à être déterminée, l'analyte recherché contiendrait uniquement les atomes C, H et O.

## 8. Une altération de la voie de signalisation des cytokinines conduit à une variation de l'activité haustoriogène des extraits rhizosphériques

Afin de déterminer l'origine des CK à activité haustoriogène dans les extraits rhizosphériques, une approche basée sur l'utilisation de mutants d'*A. thaliana* pour différentes étapes de la voie de signalisation des CK a été choisie. Ainsi, *log4* un mutant pour la biosynthèse des CK et *pup14* un mutant de transport pour l'internalisation des CK, ainsi que 35S:CKX2 une lignée transgénique surexprimant un gène codant pour une enzyme permettant la dégradation des CK, ont été sélectionnés.

L'activité haustoriogène des extraits rhizosphériques bruts a été déterminée pour chaque mutant sur 7 semaines consécutives (**Figure 2.20**). Les résultats sont exprimés en pourcentage de graines germées ayant développé des EHS en réponse aux extraits de *log4*, *pup14* et 35S:CKX2 corrigés par un facteur prenant en compte la possible différence phénotypique racinaire entre les plantes au travers du ratio du volume d'extraits récoltés (L) sur la masse racinaire sèche totale (g MS) obtenue en fin d'expérimentation (**Tableau 2.8**). La cinétique d'activité haustoriogène des extraits rhizosphériques ainsi obtenue indique que les semaines 4, 5 et 6 sont les plus actives quel que soit le génotype testé, avec le maximum d'activité haustoriogène obtenu en 5<sup>ème</sup> semaine ( $64 \pm 4\%$  d'EHS pour Col-0,  $22 \pm 2\%$  pour *log4*,  $58 \pm 4\%$  pour *pup14* et  $28 \pm 4\%$  pour 35S:CKX2). En revanche, l'amplitude de l'activité haustoriogène de chaque exsudat varie en fonction du génotype d'*A. thaliana*. En effet, l'activité haustoriogène des extraits rhizosphériques des génotypes *log4* et 35S:CKX2 est toujours significativement plus faible que celle de l'écotype sauvage Col-0 (hormis pour la semaine 7 pour 35S:CKX2, *t*-test,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ). Néanmoins, la cinétique de l'activité haustoriogène du mutant *pup14*, déficient dans l'import des CK dans le cytosol, n'est pas différente de celle de Col-0 (hormis la 1<sup>ère</sup> et la 6<sup>ème</sup> semaine, *t*-test,  $p < 0,05$ ).



**Figure 2.21. Activité haustoriogène des extraits rhizosphériques de Col-0, des mutants *log4*, *pup14* et de la lignée transgénique 35S:CKX2, après concentration et fractionnement par HPLC inverse.**

L'induction des EHS sur des graines germées de *P. ramosa* a été évaluée pour les extraits rhizosphériques bruts (Exudates) pour une dilution à  $5 \cdot 10^{-1}$  et correspond à l'ajout des semaines les plus actives (semaines 4, 5, 6). L'activité haustoriogène du produit SPE (SPE extract) est évaluée pour une dilution à  $10^{-2}$  et correspond à la concentration par SPE inverse de la moitié du volume récolté pour les extraits présentant le maximum d'activité haustoriogène (semaines 4, 5, 6). Le FT (flow through) correspond au traitement avec la fraction non retenue par la colonne SPE. Le pourcentage d'EHS induit a été évalué pour les 24 fractions issues du fractionnement par HPLC inverse des extraits concentrés par SPE inverse pour une dilution à  $10^{-2}$ . L'activité haustoriogène est exprimée en pourcentage d'EHS avec un facteur de correction pour les mutants *log4*, *pup14* et la lignée transgénique 35S:CKX2. Le facteur de correction est calculé à partir des rapports des volumes d'extraits récoltés par semaine sur la masse racinaire sèche totale obtenue en fin de culture, en prenant les ratios de Col-0 comme référence. L'ensemble des dilutions ont été réalisées dans la solution tampon (HEPES 0,5 mM, pH 7,5, PPM à 0,05% p/v). Les moyennes sont représentées avec leur erreurs standards  $n=6$  pour les extraits rhizosphériques et les produits SPE et  $n=3$  pour les fractions. Les moyennes annotées avec des astérisques sont significativement différentes de Col-0 ( $t$ -test, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

Une fois les semaines actives 4, 5 et 6 identifiées pour chaque génotype, les extraits de ces semaines ont été associés et purifiés par SPE inverse et soumis à un fractionnement par HPLC inverse. L'activité haustoriogène des produits SPE et des fractions ainsi obtenues a ensuite été évaluée pour chaque génotype et exprimée en pourcentage d'EHS corrigé en fonction du volume d'extraits récolté et de la masse des racines des plantes pour chaque génotype (**Figure 2.21**). L'activité haustoriogène des produits SPE apparaît plus faible pour le mutant *log4* ( $22 \pm 2\%$ ) et les plantes transgéniques 35S:CKX2 ( $29 \pm 8\%$ ) que pour Col-0 ( $82 \pm 5\%$ ). En revanche, l'activité haustoriogène du produit SPE issu des extraits de *pup14* reste de l'ordre de celle observée pour Col-0 ( $71 \pm 10\%$ ). Quel que soit le génotype, l'activité haustoriogène est toujours contenue dans les fractions 9 et 16. De la même manière que pour le produit SPE, le pourcentage d'EHS est plus faible pour la fraction 9 de *log4* et 35S:CKX2 ( $15 \pm 1\%$  et  $27 \pm 3\%$  contre  $59 \pm 3\%$  pour Col-0) tandis qu'il est toujours important pour *pup14* ( $48 \pm 5\%$ ). Néanmoins, si le pourcentage d'EHS induits par la fraction 16 de *pup14* est élevé  $35 \pm 4\%$ , les fractions 16 de *log4* et 35S:CKX2 induisent moins d'EHS que celle de Col-0 (respectivement  $10 \pm 2\%$  et  $12 \pm 0,5\%$  contre  $28 \pm 2\%$  pour Col-0). Si la fraction 16 ne contient pourtant pas de composés CK, il semble néanmoins que de telles mutations conduisent également à une diminution de l'activité haustoriogène de la fraction 16.

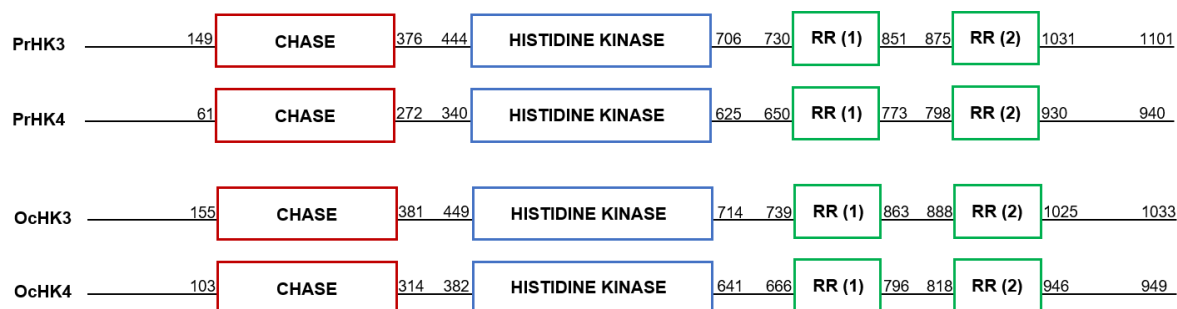
Les résultats obtenus mettent en évidence une variation de l'activité haustoriogène des extraits rhizosphériques des plants mutants et transgéniques d'*A. thaliana* pour la biosynthèse et la dégradation des CK. En particulier, l'activité haustoriogène de la fraction 9 de *log4* et 35S:CKX2 s'avère réduite, suggérant que la diminution de CK actives dans la plante se répercute également au niveau de l'exsudation des CK dans la rhizosphère. Néanmoins, l'activité haustoriogène de la fraction 16 est également impactée, ce qui suggère que la qualité générale (en terme d'activité) des extraits des plants mutants et transgéniques *log4* et 35S:CKX2 est affectée. En revanche, une mutation du transport des CK chez *pup14* ne semble pas impacter l'activité haustoriogène des extraits rhizosphériques.

Ces résultats démontrent ainsi qu'une altération, chez la plante hôte, de la voie de biosynthèse et de dégradation des CK a un impact négatif sur la présence des CK dans la rhizosphère, affectant ainsi l'induction haustoriale chez *P. ramosa*. Ces résultats démontrent ainsi l'origine des CK haustoriogènes présents dans la rhizosphère comme étant des CK produits et exsudés par la plante hôte, et réfutent l'hypothèse que ces CK soit d'origine microbienne (microorganismes rhizosphériques et endosphériques).

**Tableau 2.14. Caractéristiques des séquences HK de *P. ramosa* et *O. cumana* obtenues par clonage moléculaire.**

Les alignements multiples des séquences nucléotidiques *HK* au sein de chaque espèce et entre espèces ont été réalisés à l'aide du logiciel Vector NTI 9.1.0 (Life Technologies Corporation). Les pourcentages d'homologies entre les séquences codantes ont été déterminées pour chaque alignement. Les séquences *HK* d'*A. thaliana* correspondent aux séquences issues de la base de données TAIR (<http://www.arabidopsis.org>, At5G35750, At1G27320, At2G01830).

Longueur des séquences	% d'Homologie entre les plantes parasites	% d'Homologie avec les séquences d' <i>A. thaliana</i>
<i>PrHK3</i> : 3085 pb	<i>PrHK3</i> - <i>PrHK4</i> : 54,4%	<i>PrHK3</i> - <i>AtHK3</i> : 61,4%
<i>PrHK4</i> : 2953 pb	<i>PrHK4</i> - <i>OcHK4</i> : 80,7%	<i>PrHK4</i> - <i>AtHK4</i> : 61,8%
<i>OcHK3</i> : 3102 pb	<i>OcHK3</i> - <i>PrHK3</i> : 85,6%	<i>OcHK3</i> - <i>AtHK3</i> : 66,7%
<i>OcHK4</i> : 2850 pb	<i>OcHK4</i> - <i>OcHK3</i> : 53,3%	<i>OcHK4</i> - <i>AtHK4</i> : 59,8%



**Figure 2.22. Domaines conservés des récepteurs HK de *P. ramosa* et *O. cumana*.**

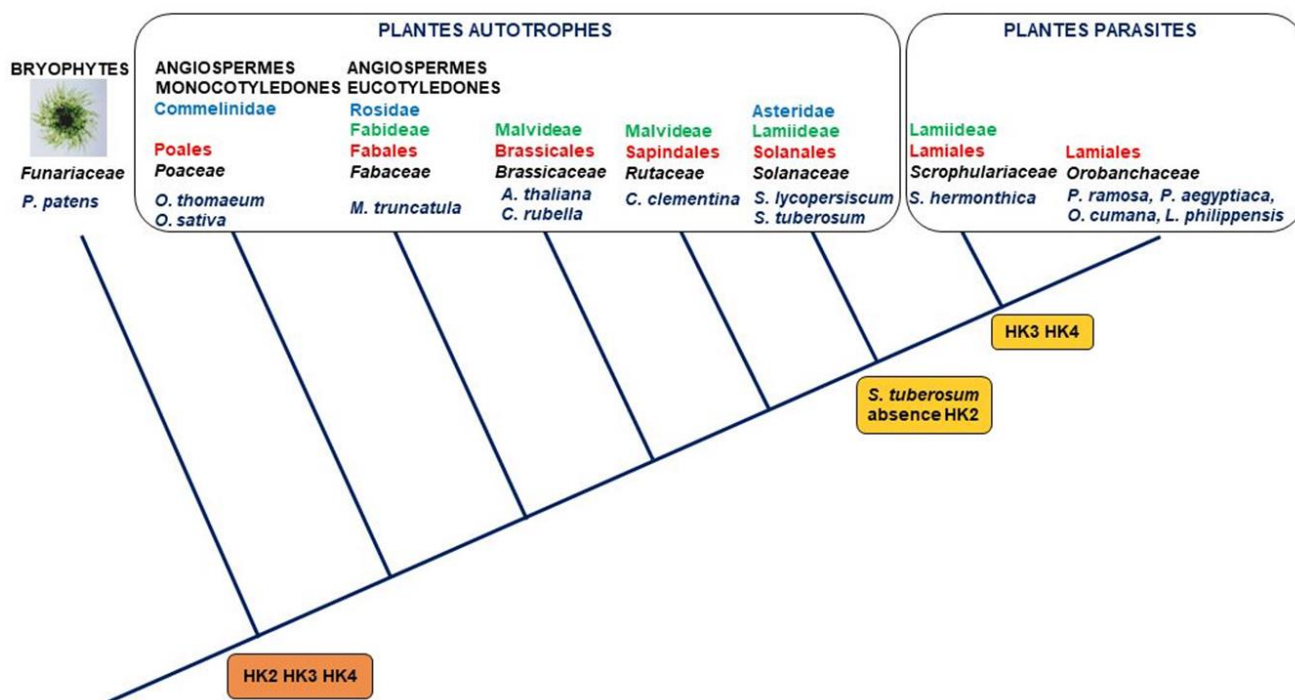
Les séquences nucléotidiques *HK* obtenues par clonage moléculaire ont été traduites en acides aminés et comparées. Les séquences protéiques de *P. ramosa* PrHK3, PrHK4 ont une longueur respective de 1101 aa et 940 aa, celles d'*O. cumana* OcHK3, OcHK4 ont une longueur de 1033 aa et 949 aa. La présence de 4 domaines conservés et caractéristiques des protéines HK sont relevées dans l'ensemble des séquences. Ces domaines comprennent un premier domaine CHASE, suivi du domaine Histidine Kinase (HK) et de deux domaines conservés de régulateur de réponse (RR). Les positions de ces domaines conservés dans les séquences sont indiquées en acides aminés.

## 9. Isolement des séquences codant pour les récepteurs HK

La perception des CK implique la mise en œuvre de récepteurs Histidine Kinase membranaires connus chez les plantes autotrophes sous le nom de récepteurs HK. Afin de caractériser ces récepteurs chez les plantes holoparasites et notamment étudier leur possible spécificité par rapport à d'autres plantes, les récepteurs HK de *P. ramosa* et d'*Orobancha cumana*, une autre plante holoparasite phylogénétiquement proche, ont été isolés.

Dans un premier temps, les séquences nucléotidiques des gènes codant pour les récepteurs HK ont été identifiées *in silico* sur la base des séquences codantes consensus décrites chez les plantes autotrophes (**Tableau 2.11**) en utilisant l'algorithme de recherche BLASTN (Altschul *et al.*, 1990, 1997) (valeur seuil attendue de 1,0) sur la banque de transcrits des différents stades de développement de *P. ramosa* issue des travaux de thèse de Lechat (2014) et développée par Goyet (2017). Ces recherches ont révélé qu'aucune séquence HK2 n'existait chez ces plantes parasites, seules les séquences HK3 et HK4 ayant été détectées.

Dans un premier temps les extrémités 3' des séquences *HK3* et *HK4* de *P. ramosa* et *O. cumana* ont pu être amplifiées par PCR RACE 3' à partir d'ADNc provenant de hampes florales et de graines germées, respectivement. Des amorces nested plus spécifiques ont ensuite été utilisées pour amplifier les séquences complètes *PrHK3* et *PrHK4*. Aucune amorce autres que celles utilisées lors de la première amplification RACE n'a été nécessaire pour amplifier les séquences *HK3* et *HK4* d'*O. cumana*. Les séquences pleines longueur ainsi obtenues ont ensuite été clonées en vecteur pGEM-Teasy. La détermination des séquences des récepteurs *HK3* et *HK4* ainsi clonées a montré que ces dernières correspondaient à celles identifiées précédemment *in silico*. Les séquences *PrHK3* et *OcHK3* ont une longueur respective de 3085 pb et 3102 pb tandis que les séquences *HK4* ont une longueur de 2953 pb pour *PrHK4* et 2850 pb pour *OcHK4* (**Tableau 2.14**). Les séquences nucléotidiques *HK3* de *P. ramosa* et *O. cumana* sont fortement similaires entre elles, avec un pourcentage d'homologie de 85,6%, de la même manière que les séquences *HK4* possèdent entre elles un pourcentage d'homologie important de 80,7% (**Tableau 2.14**). Par ailleurs, les séquences individuelles *HK3* et *HK4* de *P. ramosa* et *O. cumana* sont relativement conservées avec celles d'*A. thaliana*, pour un pourcentage d'homologie moyen de 62% entre chaque séquence. En revanche, les séquences *HK3* et *HK4* présentent des différences pour les deux plantes parasites. Les séquences *PrHK3* et *PrHK4* ont un pourcentage d'homologie de 54,4% de la même manière que pour *O. cumana* avec une homologie de 53,3% entre les séquences *OcHK3* et *OcHK4*. Les séquences nucléotidiques *HK3* et *HK4* de *P. ramosa* et *O. cumana* obtenues par clonage moléculaire ont été traduites en acides aminés. L'analyse des différents domaines connus des récepteurs HK par des alignements de séquences a permis de détecter la présence de quatre



**Figure 2.23. Evolution de la présence des récepteurs HK chez les plantes autotrophes et parasites.**

Les séquences nucléotidiques des récepteurs HK2, HK3, HK4 des plantes parasites *S. hermonthica*, *P. aegyptiaca*, *L. philippensis* et des plantes autotrophes choisies *A. thaliana*, *S. lycopersicum*, *S. tuberosum*, *O. sativa*, *C. clementina*, *C. rubella*, *O. thomaeum*, *M. truncatula*, *P. patens*, ont été recherchées par BLASTN (Altschul *et al.*, 1990, 1997), à partir des bases de données en ligne PPGP (<http://ppgp.huck.psu.edu>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) et Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov>). Les séquences HK de *P. ramosa* ont été recherchées dans le transcriptome des travaux de thèse de Lechat (2014), développé par Goyet (2017) et celles d'*O. cumana* du transcriptome en ligne (<https://www.heliagene.org/OcIN23-20170413/>) mis au point par le Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (INRA, Toulouse, France). L'absence de récepteur HK2 est remarquée pour l'espèce *S. tuberosum* du clade des Lamiideae. Cette absence est également visible chez les plantes parasites, qui possèdent ainsi uniquement les récepteurs HK3 et HK4. Les familles correspondantes pour chaque espèce sont représentées en noir, l'ordre en rouge, le clade en vert et les sous-classes en bleu. Photo de *P. patens* d'après (Cove, 2005).

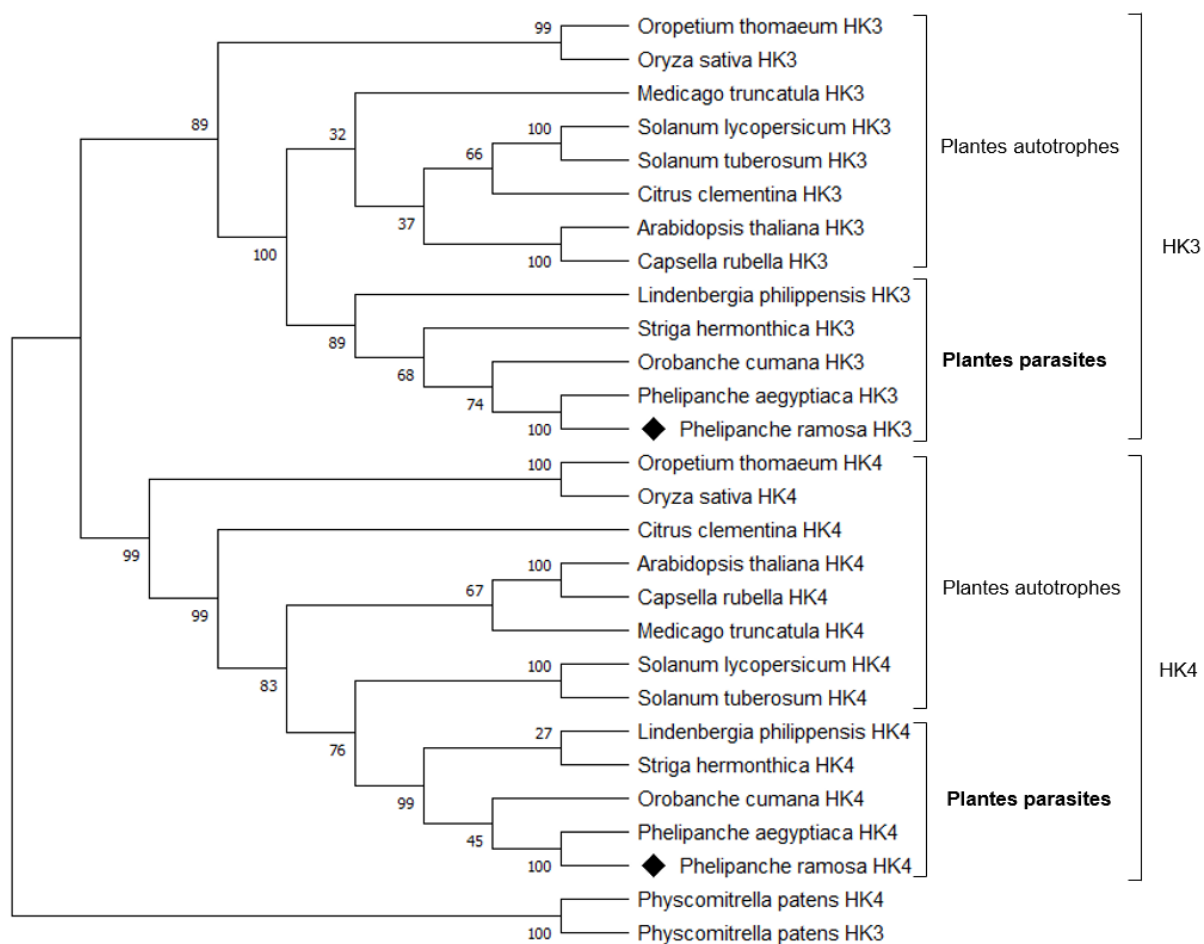
domaines conservés (**Figure 2.22, Annexe 1**). Le premier correspond au domaine CHASE d'une longueur de 227, 226 acides aminés (aa) pour HK3 (respectivement *P. ramosa* et *O. cumana*) et 211 aa pour les séquences HK4. Celui-ci est suivi du domaine Histidine Kinase (HK), long de 262 et 265 aa pour les séquences HK3 (respectivement *P. ramosa* et *O. cumana*) et de 321 et 259 aa pour celles de HK4. Enfin la présence de deux domaines correspondant aux régulateurs de réponse (RR) est relevée avec une longueur respective de 121, 124 aa et 156, 137 aa pour les séquences *P. ramosa* et *O. cumana* de HK3 et 123, 130 aa et 132, 128 aa pour celles de HK4. Ces domaines sont caractéristiques des protéines réceptrices HK, confirmant ainsi l'exactitude des séquences acquises par clonage moléculaire pour *P. ramosa* et *O. cumana*.

Ces résultats soulignent ainsi l'absence de séquences *HK2* chez les plantes parasites *P. ramosa* et *O. cumana*, tout en montrant la conservation des séquences *HK3* et *HK4*. Les séquences nucléotidiques correspondants aux gènes codant pour *PrHK3*, *PrHK4*, *OcHK3* et *OcHK4* ont ainsi été obtenues par clonage moléculaire. Par ailleurs, les séquences *HK3* de *P. ramosa* et *O. cumana* sont hautement conservées entre elles de la même manière que les séquences *HK4* de ces deux plantes parasites. Les séquences individuelles semblent également proches de celles d'*A. thaliana*. En revanche, les séquences *HK3* et *HK4* semblent se distinguer au niveau des séquences qui codent pour les domaines extracellulaires CHASE des récepteurs.

## 10. Analyse phylogénétique des domaines CHASE des récepteurs HK

Les données apportées par cette étude et celle de Goyet (2017) montrent que les CK peuvent être exsudées par les racines de la plante hôte et jouer un rôle dans la communication rhizosphérique avec la plante parasite. La perception de ces composés est donc un prérequis pour l'établissement de la communication plante à plante. La reconnaissance des CK est connue pour être réalisée par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires HK et plus particulièrement par les domaines CHASE de ces récepteurs. La reconnaissance des CK rhizosphériques par la plante parasite *P. ramosa*, mais également son homologue *O. cumana*, passerait ainsi par les récepteurs membranaires *HK3* et *HK4*, identifiés chez ces espèces. Les domaines de fixation des CK sur les récepteurs HK (CHASE) se révèlent donc être d'un intérêt majeur pour comprendre le mode de liaison optimal des CK à activité haustoriogène. A travers une analyse phylogénétique des séquences des domaines CHASE nous avons ainsi cherché à étudier la spécificité de ces domaines chez les plantes parasites par rapport à ceux présents chez les plantes autotrophes.

Les séquences nucléotidiques des récepteurs *HK3* et *HK4* des plantes autotrophes (*S. lycopersicum*, *S. tuberosum*, *O. sativa*, *C. clementina*, *C. rubella*, *O. thomaeum*, *M. truncatula*),



**Figure 2.24. Analyse phylogénétique des séquences protéiques des domaines CHASE des récepteurs aux cytokinines HK chez différentes espèces.**

Les séquences protéiques des domaines CHASE des récepteurs HK3 et HK4 provenant des plantes parasites obligatoires *P. ramosa* (♦), *O. cumana*, *S. hermonthica*, *P. aegyptiaca*, *L. philippensis*, et des plantes autotrophes *A. thaliana*, *S. lycopersicum*, *S. tuberosum*, *O. sativa*, *C. clementina*, *C. rubella*, *O. thomaeum*, *M. truncatula*, ont été comparées. L'arbre phylogénétique a été construit à l'aide du logiciel MEGAX (Kumar *et al.*, 2018), selon la méthode UPGMA (Sneath and Sokal, 1973) et incrémenté avec une espèce extérieure *P. patens*. La valeur bootstrap de chaque nœud est indiquée au-dessus (1000 répétitions) (Felsenstein, 1985). Les distances évolutives ont été calculées selon la méthode de correction de Poisson (Zuckerkindl and Pauling, 1965).

des plantes parasites (*S. hermonthica*, *P. aegyptiaca*, *L. philippensis*) et de l'espèce extérieure *P. patens*, ont été obtenues *in silico* en utilisant l'algorithme BLASTN sur les banques de données en ligne NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>), Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) et PPGP (<http://ppgp.huck.psu.edu/>) (**Tableau 2.11**). En revanche, aucune des séquences *HK2* présentes chez la majorité des plantes autotrophes n'a pu être identifiée pour les plantes parasites *S. hermonthica*, *P. aegyptiaca* et *L. philippensis*, comme observé précédemment pour *P. ramosa* et *O. cumana*. Cette absence est également observée pour la plante autotrophe *S. tuberosum*, qui se rapproche évolutivement des *Orobanchaceae* en étant regroupée dans le même clade des Lamiidées (**Figure 2.23**).

Ces séquences nucléotidiques ont été traduites et plusieurs alignements multiples (MUSCLE) ont été réalisés pour déterminer les séquences protéiques CHASE sur la base des motifs conservés déjà connus (Steklov *et al.*, 2013). Puis, l'arbre phylogénétique des domaines CHASE des récepteurs HK3 et HK4 incluant les séquences obtenues par clonage moléculaire de *P. ramosa* et *O. cumana*, a été construit avec la méthode UPGMA qui permet de visualiser les distances entre chacune des séquences étudiées. Cette analyse devait ainsi permettre d'établir s'il existait des caractéristiques conservées et uniques au sein des séquences des récepteurs de *P. ramosa* par rapport aux plantes parasites (*O. cumana*, *S. hermonthica*, *P. aegyptiaca*, *L. philippensis*) et aux plantes autotrophes (*A. thaliana*, *S. lycopersicum*, *S. tuberosum*, *O. sativa*, *C. clementina*, *C. rubella*, *O. thomaeum*, *M. truncatula*) (**Figure 2.24**). Les résultats obtenus montrent deux clades principaux correspondant chacun au regroupement des domaines CHASE HK3 et CHASE HK4. Au sein de ces deux clades, les séquences CHASE des plantes parasites sont regroupées entre elles et sont distinctes des espèces autotrophes. De manière intéressante, les domaines CHASE pour chaque récepteur des plantes parasites *P. ramosa* et *P. aegyptiaca*, apparaissent similaires en étant systématiquement regroupés dans l'arbre phylogénétique (bootstrap 100), suivi des séquences d'*O. cumana* (bootstrap de 75 pour HK3 et 45 pour HK4). Les séquences CHASE HK4 des plantes parasites apparaissent par ailleurs proches des espèces *S. lycopersicum* et *S. tuberosum* (bootstrap 100) tandis que les séquences CHASE HK3 sont regroupées avec les plantes *A. thaliana*, *C. rubella*, *C. clementina* et *S. lycopersicum* et *S. tuberosum* (bootstrap 37). L'arbre phylogénétique des séquences CHASE souligne également l'éloignement des plantes parasites avec les angiospermes monocotylédones de la sous-classe des Commelinidées *O. sativa* et *O. thomaeum*.

A travers l'approche phylogénétique des séquences des domaines CHASE, nous avons cherché à retracer l'évolution des récepteurs HK chez les plantes parasites en les comparant avec les récepteurs connus des plantes autotrophes. Ces résultats montrent l'existence des



séquences *HK3* et *HK4* tout en soulignant l'absence de séquences *HK2* chez les plantes parasites étudiées. L'analyse phylogénétique permet de mettre en évidence des distinctions entre les domaines CHASE des récepteurs *HK3* et *HK4* des plantes autotrophes et parasites. Par ailleurs, au sein des plantes parasites, les séquences des domaines CHASE *HK3* et des domaines CHASE *HK4* sont respectivement regroupées entre elles. Ces regroupements témoignent d'une conservation des domaines de fixation *HK3* et *HK4* entre les plantes parasites, tandis que les domaines CHASE sont spécifiques selon le récepteur. Ces résultats mettent ainsi en évidence des spécificités propres aux plantes parasites et entre les récepteurs *HK3* et *HK4*.

#### IV. Discussion

##### 1. Mise en évidence d'un double signal haustoriogène commun dans les extraits rhizosphériques de différentes plantes hôtes

A l'instar de ce qui est observé pour les plantes hémiparasites, la formation de l'haustorium chez *P. ramosa* peut être induite par des composés présents dans les extraits rhizosphériques de sa plante hôte. Une étude précédente a révélé que des molécules de type CK présentes dans la fraction 9 des extraits rhizosphériques de colza étaient responsables de cette induction mais qu'il existait également, dans une autre fraction (n°16) de ces extraits, un second signal haustoriogène (Goyet *et al.*, 2017). Un des objectifs de notre étude était de montrer que cette activité haustoriogène n'était pas une particularité des extraits rhizosphériques de colza, mais qu'elle pouvait être détectée dans les extraits d'autres plantes hôtes de *P. ramosa*, *S. lycopersicum* et la plante modèle *A. thaliana*. Il s'agissait ainsi d'identifier ces signaux et de tester l'hypothèse de l'implication généralisée des CK dans l'haustoriogenèse de *P. ramosa*, quelle que soit la plante hôte.

D'après nos résultats, les extraits rhizosphériques de l'ensemble de ces plantes sont capables d'induire des EHS chez *P. ramosa* (**Figure 2.4**), et ce dès les deux premières semaines d'exsudation, avec un pic d'activité maximale situé entre la 3<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> semaine de culture. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Goyet (2017) et montrent ainsi que, dans les mêmes conditions de culture, cette activité est conservée chez différentes plantes hôte. De plus, le fractionnement par HPLC inverse des extraits les plus actifs de chaque plante a révélé que l'activité haustoriogène était portée spécifiquement par les deux mêmes fractions (9 et 16 pour des temps d'élution respectifs de 20-21 min et 26-27 min) (**Figure 2.5**). L'activité des extraits rhizosphériques est de ce fait la résultante d'un double signal haustoriogène. Quelle que soit la plante hôte, l'activité haustoriogène de la fraction 9 est toutefois toujours plus importante que celle de la fraction 16 ( $50 \pm 3\%$  pour F9 contre  $31 \pm 2\%$  pour F16 chez



*S. lycopersicum*). Les fractions haustoriogènes chez *A. thaliana* et *S. lycopersicum* correspondent, en termes de temps de rétention et de réponse induite, à celles des extraits rhizosphériques de *B. napus* décrites par Goyet *et al.* (2017). Nos résultats démontrent ainsi que le signal haustoriogène perçu par *P. ramosa* est généralisé à d'autres espèces de plantes hôtes naturelles ou non. Ce résultat est concordant avec le large spectre d'hôtes de *P. ramosa*, incluant des *Solanacea* (tomate, tabac, ...), des *Brassicaceae* (colza, *Arabidopsis*, ...), des *Cannabaceae* (chanvre), des *Apiaceae* (carotte) ou des *Curcubitaceae* (melon) (Fernández-Aparicio *et al.*, 2009; Gibot-Leclerc *et al.*, 2012, 2013). Néanmoins, des extraits rhizosphériques de légumineuses, telles que *Pisum sativum* ou *Vicia faba*, sont également capables d'induire la formation d'EHS chez *P. ramosa*, bien que n'étant pas des plantes hôtes (J-B. Pouvreau, communication personnelle). La capacité à induire l'haustoriogenèse ne semble donc pas être une propriété discriminante entre plantes hôtes et non hôtes pour *P. ramosa*, à l'instar par ailleurs de la capacité à produire des stimulants de germination.

Nos résultats suggèrent que les extraits rhizosphériques de *S. lycopersicum* et *A. thaliana* contiennent des molécules à activité haustoriogène ayant des caractéristiques chimiques similaires à celles détectées chez *B. napus* (reflétées par les temps de rétentions identiques pour les fractions actives). Ainsi, par analogie avec *B. napus*, la fraction 9 des extraits rhizosphériques de *S. lycopersicum* et *A. thaliana* contiendrait également des composés de type CK (Goyet *et al.*, 2017). Cette hypothèse a notamment pu être validée dans cette étude pour *A. thaliana*.

De manière intéressante, nos résultats montrent que le pré-traitement de graines germées par les fractions 9 et 16 d'*A. thaliana* permet dans les deux cas d'augmenter très significativement le taux d'EHS formés chez *P. ramosa*, le succès d'accrochage aux racines de la plante hôte (*B. napus*) et finalement le nombre de tubercules formés, et ce à des niveaux comparables à ceux observés suite à un traitement par des CK exogènes. Ces résultats sont ainsi concordants avec la fonction identifiée de ces EHS, qui produisent des polysaccharides, dans l'adhésion de l'orobanche aux racines des plantes hôtes, une des premières étapes de l'haustoriogenèse (Fernández-Aparicio *et al.*, 2016b). Goyet *et al.* (2017) avaient démontré un bénéfice identique des extraits rhizosphériques de colza sur l'agressivité de *P. ramosa*. Il semble donc que, quelle que soit la nature des composés présents dans les fractions 9 et 16, ces deux types de composés sont essentiels pour former des EHS fonctionnelles. Chez les hémiparasites telles que *S. asiatica* et *T. versicolor*, les EHS induites par des CK exogènes ont toutefois été décrites pour avoir un phénotype légèrement différent de celui induit par le DMBQ (considéré comme un HIF majeur chez ces espèces), se caractérisant notamment par des poils haustoriaux plus longs et délocalisés le long de la radicule (Keyes *et al.*, 2000; Tomilov *et al.*, 2005). Ces auteurs soutiennent ainsi l'hypothèse que les CK ne seraient pas



impliquées dans l'induction haustoriale chez ces espèces, à l'inverse du DMBQ et des composés phénoliques précurseurs (Yoder, 2001). Nos travaux confirment que, chez l'holoparasite *P. ramosa*, les CK sont des composés essentiels à la formation des EHS. En outre, des travaux menés en parallèle au laboratoire chez l'hémiparasite obligatoire, *Striga hermonthica*, révèlent que les CK sont également capables de déclencher efficacement l'haustoriogenèse chez cette espèce (**Annexe 2**). Les EHS ainsi formées arborent un phénotype similaire à celui induit en réponse au DMBQ, décrit comme HIF principal chez cette espèce (Cui *et al.*, 2018b). Bien que l'impact du traitement par des CK de graines germées de *S. hermonthica* sur leur agressivité vis-à-vis de racines hôtes n'ait pas été ici testée, l'ensemble de ces résultats suggère que les CK constituent un signal fonctionnel de manière plus générale chez les plantes parasites obligatoires, en induisant la formation de l'haustorium terminal. Les hémiparasites facultatifs comme *T. versicolor* sont également capables de différencier de nombreux haustoria latéraux, la croissance racinaire et la différenciation haustoriale n'étant pas des processus antagonistes chez ces espèces. Ce n'est cependant pas le cas chez les parasites obligatoires comme *P. ramosa* et *S. hermonthica*, dont l'haustorium terminal se forme à l'apex de la radicule suite à un arrêt définitif de la croissance de la jeune racine (Tomilov *et al.*, 2005; Goyet *et al.*, 2017; Cui *et al.*, 2018b). Les CK sont connues pour inhiber la croissance racinaire et induire le gonflement de l'apex, ce qui est donc concordant avec leur rôle proposé dans l'induction de la formation des haustoria terminaux (Pacifici *et al.*, 2015).

Nos travaux soulignent également la complexité du signal haustoriogène, avec la détection de composés actifs biochimiquement distincts dans les fractions 9 et 16. La présence d'au moins deux types de composés présentant la même activité au sein d'un même extrait pose toutefois la question des interactions potentielles entre ces molécules. Nos résultats montrent que les composés en mélange de la fraction 9 et 16 d'*A. thaliana* ont un effet additif pour une proportion respective de 2:1 en permettant de restaurer l'activité haustoriogène globale de l'extrait SPE (**Figure 2.7**). L'effet additif de ces deux fractions permet de s'assurer que les composés présents dans la fraction 16 n'ont pas d'activité antagoniste des CK, mais plutôt un effet synergique avec celles-ci. De telles interactions ont déjà été observées entre des composés de nature différente, ainsi capables de combiner leurs activités biologiques pour améliorer (synergie) ou diminuer (antagonisme) un effet observé par rapport à un métabolite seul. Notamment dans le domaine de la pharmacologie, dans le cas d'analyses sur les effets toxicologiques synergiques de molécules visant à soigner des maladies, mais également en agronomie avec l'utilisation de pesticides pour lutter contre les parasites (White *et al.*, 2004 ; Sørensen *et al.*, 2007; Ritz and Streibig, 2014). C'est le cas des antibactériens d'origine végétale, incluant les phytoalexines comme les terpénoïdes, les glycostéroïdes, les flavonoïdes ou les polyphénols qui, utilisés seuls présentent une faible activité antifongique,



tandis que leur utilisation combinée peut s'avérer efficace pour combattre les infections (Hemaiswarya *et al.*, 2008). La considération des métabolites en mélange dans un extrait biologique révèle ainsi un fort intérêt, mais reste difficile à analyser. En particulier, les phénomènes de synergie ou d'antagonismes appliqués aux composés présents dans les extraits rhizosphériques de plantes sont, à notre connaissance, peu documentés. Ces extraits contiennent en effet une large variété de composés qui ont notamment des activités allélopathiques, mais compte tenu du grand nombre de composés exsudés, les effets de synergisme ou d'antagonisme restent difficiles à appréhender et sont peu testés (Huang *et al.*, 2003). Cependant, des effets de synergisme ont pu être décrits entre une strigolactone de synthèse, le GR24 et les extraits rhizosphériques de plants de niébé colonisés par des champignons mycorhiziens arbusculaires. Ce mélange permet d'augmenter le taux de germination de la plante parasite *Striga gesnerioides*, indiquant la présence d'autres stimulants de germination dans les extraits rhizosphériques aux effets additifs (Lendzemo *et al.*, 2009). Aussi, les différents composés allélopathiques présents dans les extraits rhizosphériques sont inévitablement soumis à une interaction qui s'avère bénéfique ici pour la plante parasite *P. ramosa*, dont la capacité à former des EHS est augmentée grâce à la perception de deux types de composés qui ont une action combinée. Nous avons ainsi démontré que les fractions 9 et 16 font parties intégrantes de l'activité haustoriogène des extraits rhizosphériques de plantes hôtes et les composés qu'elles contiennent possèdent un mode d'action similaire en agissant de manière synchrone. Ces fractions sont donc les seules responsables de l'activité haustoriogène chez *P. ramosa* en expliquant 67% de l'activité haustoriogène des extraits SPE d'*A. thaliana* pour la fraction 9, tandis que la fraction 16 représente une proportion plus faible en expliquant 33% de l'activité totale.

Ces résultats mettent ainsi en évidence la présence d'un double signal haustoriogène synergique contenu dans les extraits rhizosphériques de plantes hôtes et jouant un rôle fondamental dans l'agressivité de *P. ramosa*. L'implication de composés biochimiquement distincts conduisant à une même réponse phénotypique est en revanche à notre connaissance peu renseignée. De manière générale, les mécanismes qui engagent un double signal concernent des composés de nature similaire, comme c'est le cas par exemple avec la germination des graines d'*Arabidopsis* qui peut être induite par des régulateurs de croissance structurellement proches comprenant les strigolactones mais aussi les karrikines (Waters and Smith, 2013). Cependant, le processus de germination fait aussi appel à d'autres acteurs que les phytohormones en étant également régulé par des facteurs abiotiques comme la température ou la lumière, avec les phytochromes qui sont capables de contrôler les niveaux endogènes de gibbérellines et d'acide abscissique pour déclencher la germination des graines d'*Arabidopsis* (Seo *et al.*, 2008; Chahtane *et al.*, 2017). Chez *P. ramosa*, ce sont d'ailleurs des



composés de nature différentes qui peuvent induire la germination des graines avec la perception par la plante parasite des strigolactones, mais également des isothiocyanates (Auger *et al.*, 2012). Il semble donc que *P. ramosa* soit également capable de discerner des composés distincts présents dans les extraits rhizosphériques de plusieurs plantes, qui sont favorables ensemble pour optimiser la formation d'EHS chez cette espèce.

## 2. Les extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* déclenchent deux voies de signalisation distinctes, conduisant à la formation d'EHS chez *P. ramosa*

Ainsi que le suggère les résultats de Goyet *et al.* (2017), la fraction 9 contiendrait des CK alors que la seconde fraction active 16 présente des propriétés biochimiquement distinctes de la n°9. La présence de ces deux fractions haustoriogènes distinctes mais avec des composés aux activités synergiques, essentiels pour la formation d'EHS, questionne quant à la nature des voies de signalisation empruntées. Notre étude visait ainsi à préciser la réponse moléculaire de *P. ramosa* aux fractions 9 et 16 issues des extraits rhizosphériques de *B. napus*, *S. lycopersicum* et *A. thaliana*.

Les analyses transcriptomiques menées au cours de cette étude ont permis de montrer que la fraction 9 issues des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* ou de *S. lycopersicum* induit une accumulation de transcrits des gènes associés aux CK, *PrRR5*, *PrCKX2*, *PrCKX4*, *PrCKX5* pour des timing d'expression identiques à ceux observés après un traitement avec la *c/tZ* (**Figure 2.8**) ou avec les extraits bruts de *B. napus* (Goyet *et al.*, 2017). De manière intéressante, une telle réponse n'est pas observée après un traitement avec la fraction 16 d'*A. thaliana* qui n'induit aucune expression du gène *PrRR5* ou des gènes *PrCKXs* (**Figure 2.8**).

Plus précisément, la fraction 9 d'*A. thaliana* induit un rétrocontrôle négatif des CK par l'intermédiaire de l'induction de l'expression de *PrRR5* après seulement 30 minutes de traitement, comme avec la *c/tZ* (**Figure 2.9**). Ce gène est connu pour être un gène marqueur de la présence de CK en étant spécifiquement surexprimé en réponse à ces dernières dès 10 et 30 minutes de traitement chez *A. thaliana* (Brandstatter and Kieber, 1998; Lee *et al.*, 2007). En outre, le gène *PrZFP6* est également exprimé de manière plus importante après 6h de traitement avec la fraction 9 d'*A. thaliana* et ce niveau d'expression persiste après 24h de traitement, comme observé pour la fraction 9 de *S. lycopersicum* et la *c/tZ* (**Figure 2.8 et 2.9**). Chez *A. thaliana*, *ZFP6* est connu pour être un facteur de transcription rapidement activé en réponse aux CK, mais également en réponse aux gibbérellines. Il agit en amont du gène *ZFP5* qui induit l'expression de *GIS* et *GIS2/ZFP8*, conduisant à l'expression de *GLABRA2 (GL2)*. La protéine GL2 est connue pour intervenir dans la formation des trichomes et des poils absorbants qui sont des structures structurellement proches des EHS des plantes parasites



(issues du développement d'une cellule du rhizoderme) (Zhou *et al.*, 2013; Pattanaik *et al.*, 2014). Ces résultats suggèrent que *PrZFP6* puisse participer au développement des EHS chez *P. ramosa* sous l'action des CK. Ce gène n'est en revanche pas induit par les fractions 16 d'*A. thaliana* ou de *S. lycopersicum* (**Figure 2.8**), qui semblent donc ne pas impliquer les mêmes effecteurs que ceux régulés par les CK. De manière intéressante, nous avons précisé que, contrairement à la fraction 16, le signal contenu dans la fraction 9 de *S. lycopersicum* et *A. thaliana* induit également l'intervention des CKX au travers de l'expression des gènes *PrCKX2*, *PrCKX4* et *PrCKX5* dont l'expression se trouve déclenchée comme après un traitement *c/tZ*. Toutefois, nos résultats montrent que l'expression du gène *PrCKX1* n'est pas induite dans ces conditions (**Figure 2.8**). Les CKX sont des enzymes qui régulent la quantité de CK dans la plante en inactivant ces composés par un clivage oxydatif irréversible (Kieber and Schaller, 2014). Les CKX diffèrent selon leur propriété biochimique, leur localisation subcellulaire et la régulation de l'expression des gènes associés (Schmülling *et al.*, 2003; Werner *et al.*, 2006). Ainsi, *AtCKX1* s'exprime dans le cylindre vasculaire des racines latérales, alors que l'expression *AtCKX2* est fortement présente à l'apex des jeunes pousses. *AtCKX4* quant à lui est exprimé principalement dans les régions à forte activité mitotique comme les trichomes, les stomates et les stipules en développement, ainsi que dans la coiffe racinaire. Enfin, les transcrits *AtCKX5* s'accumulent préférentiellement dans le procambium du méristème racinaire avec également une forte expression dans les étamines et le pollen en développement (Werner *et al.*, 2006; Frébort *et al.*, 2011). L'expression de ces gènes dans les graines germées de *P. ramosa* au cours de l'induction haustoriale serait ainsi en accord avec les profils d'expression observés chez *Arabidopsis*, où la régulation des CKXs est plus particulièrement associée aux cellules en prolifération qui composent les jeunes tissus, comme les cellules de l'apex racinaire en développement, ou les jeunes pousses (Werner *et al.*, 2006). Dans chacun des cas, l'expression de ces gènes est inféodée à la concentration en CK endogènes (Werner *et al.*, 2003). De plus, la stimulation de la dégradation des CK par les CKX a pu être également démontrée comme étant concomitante à une exposition à des CK exogènes pour des cellules ou des cals de tabac (Motyka *et al.*, 2003; Brugière *et al.*, 2003). La mise en évidence dans nos résultats de l'expression de ces gènes permet ainsi d'attester de la présence de composés CK dans la fraction 9 de *S. lycopersicum* et *A. thaliana*. Toutefois, nos résultats montrent que le gène *PrCKX1* n'est pas exprimé en réponse à la fraction 9 d'*A. thaliana* ou de *S. lycopersicum* après 24h de traitement, bien que son expression soit observée après un traitement avec de la *c/tZ* (**Figure 2.8**). De manière intéressante l'enzyme *AtCKX1* a une préférence marquée pour les composés conjugués tels que les CK ribosides ou les formes N<sup>9</sup>-glucosides (Galuszka *et al.*, 2007). Ces CK ont toutefois peu d'activité sur l'induction haustoriale (Goyet *et al.*, 2017). Il semblerait ainsi que de telles CK conjuguées ne soient pas majoritairement présentes dans la fraction 9 et donc soumises à une dégradation par l'enzyme



CKX1 dont l'expression du gène n'est pas induite. L'accumulation de transcrits simultanée de *PrRR5* et des *PrCKX* confirment ainsi la présence d'une signalisation CK-dépendante dans les fractions 9 de *S. lycopersicum* et *A. thaliana*, comme observé précédemment en réponse aux extraits rhizosphériques bruts de *B. napus* par Goyet *et al.* (2017). L'absence de l'expression de ces acteurs moléculaires en réponse à un traitement par la fraction 16 confirme ainsi la présence de composés haustoriogènes autres que des CK dans cette fraction, comme initialement suggéré par Goyet *et al.* (2017).

Si ces deux fractions semblent ainsi diverger dans les processus moléculaires induits chez *P. ramosa*, elles possèdent toutefois un point de convergence. En effet, il apparaît que les fractions 9 et 16 provenant des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* et de *S. lycopersicum* (**Figure 2.8**) induisent l'expression du gène *PrTRN2* qui est plus particulièrement surexprimé après 3h de traitement chez *A. thaliana*, tout comme la *c/tZ* (**Figure 2.8 et 2.9**). Le gène *TRN2* (*TET1*) code pour une protéine appartenant à la famille des TETRASPANIN (TET) qui constituent une famille de protéines transmembranaires possédant deux domaines extracellulaires avec des motifs d'acides aminés spécifiques conservés, quatre domaines transmembranaires et des chaînes cytoplasmiques N- et C- terminales. Ces protéines membranaires interviennent notamment dans l'adhésion et la migration des cellules, la communication intracellulaire, la morphogenèse et participent également à la transmission du signal induit par des facteurs environnementaux, tels que la lumière (Wang *et al.*, 2012; Reimann *et al.*, 2017). Elles seraient également associées à la division cellulaire et à la croissance polaire des poils absorbants. Un tel rôle revêt ici un intérêt particulier si l'on considère la proximité de ces structures avec les EHS des plantes parasites (Jimenez-Jimenez *et al.*, 2019). En effet, bien que les fonctions précises de ce gène demeurent encore incertaines, il a été démontré que la formation des poils absorbants était abolie chez le mutant *trn2* d'*Arabidopsis* (Cnops *et al.*, 2000; Chiu *et al.*, 2007). *TRN2* serait de plus également impliqué dans la différenciation cellulaire des cellules de la coiffe des racines latérales et de l'expansion radiale des cellules de l'épiderme (Cnops *et al.*, 2000). Ces données suggèrent ainsi que le gène *PrTRN2*, par analogie avec son rôle chez les plantes autotrophes, pourrait être impliqué dans la différenciation des cellules épidermiques de l'apex racinaire en papilles sécrétrices formant ainsi des EHS chez *P. ramosa*. Une signalisation de type CK contenue dans la fraction 9 et également une signalisation non CK contenue dans la fraction 16 conduiraient ainsi à l'expression d'un régulateur commun impliqué dans la formation de structures épidermiques différenciées telles que les EHS. Ces résultats positionneraient donc *PrTRN2* comme un intégrateur du signal haustoriogène. La convergence de deux voies de signalisation distinctes vers un même effecteur a notamment déjà été observée dans le cas de la régulation du gène *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 5* impliqué dans l'organisation



du méristème racinaire. L'expression du gène *WOX5* est ainsi nécessaire pour définir et maintenir les fonctions des cellules du centre quiescent (QC) (Shimotohno *et al.*, 2018). Celui-ci, à l'instar de *PrTRN2*, est régulé par deux voies de signalisations, avec d'un côté une voie sous le contrôle de l'auxine en faisant intervenir les gènes et les protéines de la famille PLETHORA (PLT) et de l'autre, une voie intégrant le complexe SHORTROOT/SCARECROW (SHR/SCR) qui joue un rôle dans la morphogenèse racinaire en régulant notamment l'homéostasie des CK par le gène *CKX3* (Levesque *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2011).

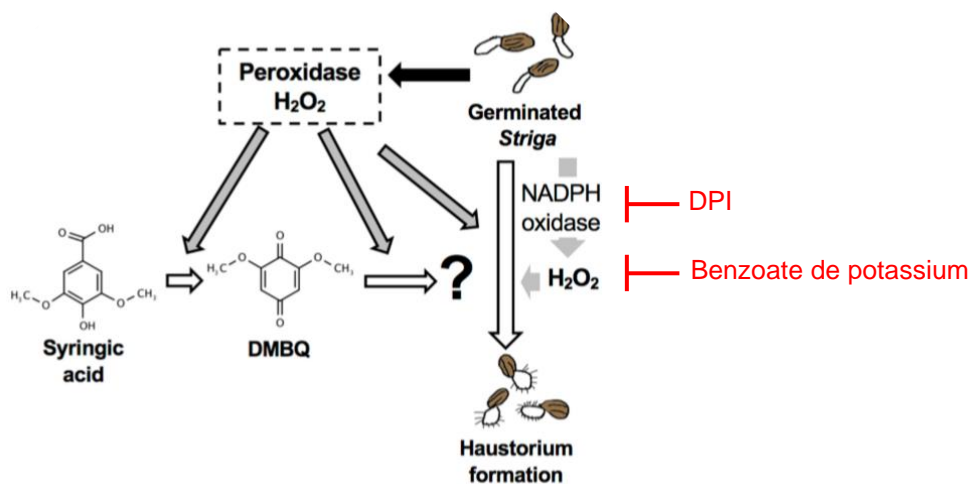
Nos résultats suggèrent ainsi que la formation des EHS chez *P. ramosa* implique des acteurs moléculaires connus pour leur rôle dans la formation des poils absorbants et les trichomes des plantes autotrophes. Ces résultats rejoindraient ainsi ceux de Cui *et al.* (2016), qui ont mis en évidence une régulation génétique commune entre le développement des poils haustoriaux de l'hémiparasite *P. japonicum* et les poils absorbants des plantes autotrophes, par au moins deux loci *hhd* (haustorial hair defective). Le premier *HHD1* influencerait l'initiation et l'élongation des poils haustoriaux tandis que le second *HHD2* interviendrait uniquement dans l'élongation. En outre, l'expression d'un gène marqueur de la formation des poils haustoriaux chez *P. japonicum* l'*EXPANSIN7 (EXP7)* également présent dans les poils absorbants, a permis de suggérer que ces structures haustoriales correspondent à des poils racinaires spécialisés. En considérant ces observations, d'autres acteurs moléculaires peuvent ainsi être proposés par analogie avec l'initiation des poils absorbants chez *Arabidopsis* qui fait intervenir les gènes *GL2*, *CAPRICE (CPC)* ou le *ROOT HAIR DEFECTIVE6 RHD6* qui est spécifiquement impliqué dans le gonflement des cellules (Lin *et al.*, 2015; Cui *et al.*, 2016).

La mise en place de l'haustorium chez les plantes hémiparasites a été décrite comme impliquant des acteurs moléculaires permettant la mise en place d'un cycle d'oxydoréduction dépendant de la forme quinone de l'acide syringique, le DMBQ (Matvienko *et al.*, 2001). Parmi ces acteurs, les gènes *QR1* et *QR2* codent pour des quinones oxydoréductases qui assurent la réduction du DMBQ, permettant ainsi son utilisation en tant qu'HIF. Ainsi *QR1* catalyse le transfert d'un seul électron de la quinone pour produire la semiquinone et *QR2* catalyse la réduction divalente de la quinone en hydroquinone (Matvienko *et al.*, 2001; Bandaranayake *et al.*, 2010). Chez *T. versicolor*, ces gènes sont notamment connus pour être exprimés de manière précoce en réponse au DMBQ entre 1h et 6h de traitement avec une chute à 12h (Matvienko *et al.*, 2001). Le gène *Pirin*, quant à lui, est normalement induit chez *T. versicolor* après 30 minutes de traitement par le DMBQ et code pour un cofacteur de transcription impliqué dans la régulation de gènes de réponse au DMBQ (Matvienko *et al.*, 2001; Ngo *et al.*, 2013). Nos résultats montrent toutefois qu'aucun des acteurs moléculaires *QR1*, *QR2* et *Pirin*, ne sont exprimés chez *P. ramosa* en réponse aux fractions 9 ou 16 d'*A. thaliana* ou à la *c/tZ*. Ce résultat montre donc que la fraction 16 ne déclenche pas de signalisation liée aux acides



phénoliques simples et notamment au DMBQ, tel que cela a pu être décrit chez les plantes hémiparasites. Les signaux présents dans les fractions 9 et 16 d'*A. thaliana* ne présenteraient donc aucun lien avec la formation de ROS et notamment de quinones dépendant de QR1 et QR2. Cette observation vient par ailleurs compléter les résultats obtenus par Goyet (2017), en montrant l'incapacité de *P. ramosa* à former des EHS en réponse au DMBQ, mais également à d'autres composés phénoliques comme l'acide syringique, l'acide vanillique ou l'alcool coniférylique. L'ensemble de ces résultats permettent de déterminer les voies de signalisation moléculaires déclenchées par les fractions 9 et 16 et d'en apprendre plus sur les acteurs moléculaires impliqués dans la formation de l'haustorium chez *P. ramosa*.

Toutefois, le suivi de l'expression de gènes marqueurs des voies suspectées peut être complété en précisant la nature des composés présents dans ces fractions. Notamment, si des gènes marqueurs de la signalisation CK sont exprimés en réponse à la fraction 9, nous pouvons supposer que des composés avec une activité antagoniste spécifique des CK, telles que les phytohormones ANA et ABA, nous permettraient de vérifier que ces molécules sont effectivement contenues dans la fraction 9, au contraire de la fraction 16. En effet, l'utilisation de ANA et l'ABA en co-traitement avec la fraction 9 diminue fortement la formation d'EHS de 57% pour la plus faible inhibition et jusqu'à 87% pour la plus élevée pour des concentrations allant de  $10^{-4}$  M à  $10^{-6}$  M (**Figure 2.10**). Cette activité inhibitrice est également observée lorsque l'ANA et l'ABA sont utilisés en co-traitement avec la *c/tZ* seule, tandis qu'aucun effet inhibiteur de ces molécules n'est observé vis-à-vis de la fraction 16. Les phytohormones ANA et ABA sont en effet capables d'interagir avec les CK dans la plante pour réguler de nombreux processus développementaux (Benková and Hejácíko, 2008; Pacifici *et al.*, 2015). La formation des racines et en particulier du méristème racinaire est ainsi régulée grâce à l'action antagoniste de l'ANA avec les CK, qui favorisent respectivement la division et la différenciation cellulaire. Un des intégrateurs principaux de cette balance est la protéine SHY2 (SHORT HYPOCOTYL2), qui participe à la différenciation du méristème racinaire en régulant négativement la signalisation liée à l'ANA en réprimant notamment l'expression des transporteurs d'auxine de la famille PIN (*PIN1*, *PIN3*, *PIN7*) (Ioio *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011). Les régulateurs de réponse des CK de type B, ARR1 et ARR12 activent la transcription de *SHY2* dans la zone de transition du méristème racinaire pour favoriser la différenciation cellulaire dans cette région (Pacifici *et al.*, 2015; Tognetti *et al.*, 2017). A l'inverse, la dégradation de SHY2 est induite par l'auxine (Tian *et al.*, 2003; Tognetti *et al.*, 2017). L'ANA est par ailleurs connu pour inhiber la signalisation CK tandis que ces dernières inhibent la biosynthèse ou le transport de l'ANA (Jones *et al.*, 2010; Pacifici *et al.*, 2015). L'ABA est également connu pour être un antagoniste des CK dans le contrôle de la division cellulaire du méristème racinaire et la réponse aux stress environnementaux (Ha *et al.*, 2012). L'inhibition



**Figure 2.25. Induction haustoriale chez les plantes hémiparasites (d'après Wada *et al.*, 2019).**

La peroxydase provenant de la plante parasite convertit l'acide syringique en DMBQ qui peut être converti en composé haustoriogène alors perçu par les graines germées des plantes hémiparasites. La peroxydase joue également un rôle indépendant sur la formation d'HIF. La production de NADPH et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jouent des rôles essentiels dans la formation de l'haustorium et sont ciblés respectivement par les inhibiteurs DPI et benzoate de potassium.

de l'activité haustoriogène de la fraction 9 et de la *c/tZ* par l'ANA et l'ABA, pour les mêmes concentrations, est ainsi concordante avec la présence fortement soupçonnée de CK dans cette fraction. A l'inverse, l'absence d'inhibition de l'activité haustoriogène de la fraction 16 par ces antagonistes des CK est un résultat supplémentaire qui suggère que cette activité n'est pas liée à ces phytohormones. Une inhibition de l'activité haustoriogène des extraits rhizosphériques bruts de *B. napus* en co-traitement avec le ANA et l'ABA avait déjà été observée par Goyet *et al.* (2017). De même, il est décrit dans la littérature que l'ANA inhibe non seulement la formation de l'haustorium en réponse au DMBQ chez l'hémiparasite obligatoire *S. asiatica*, mais que cette phytohormone et l'ABA inhibent également l'haustoriogénèse de la cuscute en réponse aux CK (Ramasubramanian *et al.*, 1988; Keyes *et al.*, 2000). En revanche, aucun des inhibiteurs associés aux composés ROS (acide ascorbique, SHAM, DPI, umbelliférone, benzoate de potassium) n'a d'effet sur l'activité haustoriogène de la fraction 9 et de la *c/tZ*, sauf à des concentrations de  $10^{-3}$  M et  $10^{-4}$  M, soupçonnées être létales (**Figure 2.11**). En effet, à ces concentrations élevées, ces composés entraînent une forte inhibition de la croissance racinaire et le brunissement de l'apex racinaire, comme observé également sur des graines germées de *S. hermonthica* (Wada *et al.*, 2019). Dans notre étude sur *P. ramosa*, aucune reprise de la différenciation cellulaire ou de la croissance racinaire n'est observée après un rinçage des graines traitées et également après une nouvelle stimulation par la fraction 9 ou la *c/tZ*, attestant ainsi de la létalité de ces concentrations.

De manière intéressante, si l'activité de la fraction 16 n'est pas influencée par des antagonistes des CK, elle est affectée par le DPI et le benzoate de potassium, pour des concentrations allant de  $10^{-4}$  M à  $10^{-9}$  M (**Figure 2.11**). Le DPI est un inhibiteur de la NADPH oxydase qui initie la production de ROS, tandis que le benzoate de potassium est un piègeur d' $H_2O_2$  (Liszakay *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2013). La NADPH oxydase est en effet une enzyme qui produit l'ion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), ensuite converti en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  par la superoxyde dismutase (SOD) (Suzuki *et al.*, 2012). Un effet inhibiteur du DPI et du benzoate de potassium a été également observé sur l'induction haustoriale par le DMBQ chez *S. hermonthica*, montrant ainsi que du  $H_2O_2$  avait un rôle majeur dans l'induction de l'haustoriogénèse chez cette espèce (Wada *et al.*, 2019). Le rôle d' $H_2O_2$  serait double, en étant non seulement important pour la conversion de l'acide syringique en DMBQ, décrit comme l'HIF majeur des hémiparasites, mais aussi pour induire la formation de l'haustorium de manière indépendante au DMBQ (Keyes *et al.*, 2001; Wada *et al.*, 2019) (**Figure 2.25**). Nos résultats chez *P. ramosa* suggèrent ainsi que la production d' $H_2O_2$  est également un élément clé dans l'induction haustoriale déclenchée par la fraction 16, mais néanmoins sans que des ROS dépendantes du DMBQ et de l'activité de QR1 et QR2 (à l'image de *T. versicolor*) ne



soient impliquées (Bandaranayake *et al.*, 2010). Notons que les ROS ( $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) sont connues pour participer à la formation des poils absorbants chez les plantes autotrophes. En effet du  $\text{H}_2\text{O}_2$  se concentre ainsi dans la zone d'élongation de l'apex racinaire et permet la différenciation cellulaire des cellules épidermiques en poils absorbants (Dunand *et al.*, 2007; Bai *et al.*, 2007; Sundaravelpandian *et al.*, 2013; Gayomba and Muday, 2020). Parallèlement chez les hémiparasites, l'accumulation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  à l'apex de la radicule et dans la zone de différenciation des cellules rhizodermiques en poils haustoriaux a été démontrée chez *Castilleja tenuiflora*, *S. asiatica* et *S. hermonthica* (Keyes *et al.*, 2007; Salcedo-Morales *et al.*, 2014; Wada *et al.*, 2019). Une telle accumulation de ROS au cours de la différenciation des EHS en réponse à la fraction 16 reste donc à être démontrée chez *P. ramosa*. Néanmoins, González-Verdejo *et al.* (2006) ont déjà souligné l'importance d' $\text{H}_2\text{O}_2$  pour la croissance de la radicule chez cette espèce. De manière intéressante, il existe également une idée émergente selon laquelle les tétraspanines, dont fait partie TRN2, participeraient à la synthèse de ROS. Cette hypothèse s'appuie sur la distribution méristématique de certaines tétraspanines qui suggère que ces protéines pourraient être impliquées dans la régulation de l'activité méristématique, qui dépend fortement de l'accumulation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  généré par la NADPH oxydase (Jimenez-Jimenez *et al.*, 2019). Ces observations seraient alors à relier avec les événements moléculaires qui se déroulent pendant l'induction haustoriale de *P. ramosa* après une exposition des graines germées à la fraction 16 et qui impliquent notamment l'expression du gène *PrTRN2*. Cependant, l'expression de ce gène est également observée en réponse à la fraction 9 qui n'implique aucune formation de ROS. Ce gène ne serait donc pas spécifiquement déclenché par ces composés. Nous pouvons ainsi envisager une régulation connexe des CK (fraction 9) avec les ROS lors de la formation des EHS chez *P. ramosa*. Bien que peu d'informations existent à l'heure actuelle à ce sujet, il existerait en effet une relation entre ces composés qui interviendraient dans la régulation de la croissance racinaire (Huang *et al.*, 2019). Ce sont néanmoins deux voies qui semblent agir ici simultanément pour favoriser la formation des EHS. Par ailleurs, il est intéressant de noter qu'aucun des autres inhibiteurs associés aux ROS testés n'ont eu d'effet inhibiteur de l'activité de la fraction 16. L'umbellifénone (7-hydroxycoumarin) et le SHAM sont des inhibiteurs des peroxydases (POX) tandis que l'acide ascorbique participe à la dégradation des radicaux libres de l'oxygène (Dunand *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2013). En particulier, les peroxydases de classe III sont connues pour catalyser la production de ROS en participant à l'oxydation de phénols en benzoquinones qui sont ciblées par l'umbellifénone et le SHAM (Dunand *et al.*, 2007). Ces composés sont donc majoritairement impliqués dans l'inhibition de la formation de l'acide syringique, le précurseur du DMBQ. Ces résultats soulignent ainsi l'absence d'implication déjà observée des acides phénoliques simples dans l'induction des EHS chez *P. ramosa* (Yoshida *et al.*, 2016; Goyet *et al.*, 2019). De plus, aucune expression des gènes associés au cycle



redox initié par le DMBQ n'a été relevée chez cette espèce en réponse à la fraction 16. Ces résultats suggèrent ainsi l'absence de ces composés phénoliques (acides phénoliques simple et forme quinone) dans la fraction 16 et mettent en évidence la formation d' $H_2O_2$  au cours de la signalisation déclenchée par cette fraction. Les mécanismes impliquant l' $H_2O_2$  dans l'induction haustoriale chez *P. ramosa* par la fraction 16 restent toutefois à préciser.

Ces résultats démontrent ainsi la présence d'un signal haustoriogène de type CK contenu dans la fraction 9 des extraits rhizosphériques des plantes hôtes de *P. ramosa*, au contraire de la fraction 16 qui semble induire la formation d' $H_2O_2$ . Ces travaux permettent également de préciser les acteurs moléculaires impliqués dans le signal haustoriogène en réponse aux CK. Par ailleurs, si les deux fractions divergent dans l'induction des voies de signalisation chez *P. ramosa*, elles conduisent en revanche vers l'expression d'un même régulateur *PrTRN2*. Ce gène potentiellement impliqué dans la différenciation des structures relatives aux poils absorbant constituerait un témoin de la formation des EHS. Il existerait donc en parallèle une autre voie de l'induction haustoriale chez *P. ramosa* indépendante de la voie des CK et qui conduirait également à l'expression de *PrTRN2*.

### 3. Des composés haustoriogènes de nature différente dans les extraits rhizosphériques

#### 3.1. Les cytokinines comme HIFs naturels chez *P. ramosa* : un signal complexe

L'ensemble des données recueillies montrent l'implication de molécules de type CK lors de l'induction de l'haustoriogénèse chez *P. ramosa*. L'identité exacte des CK actives présentes dans la fraction 9 des extraits rhizosphériques des plantes hôtes ainsi que la nature des composés présents dans la fraction 16 demeurent toutefois à déterminer.

Pour répondre à ces objectifs, un ensemble de standards regroupant la grande majorité des CK connues a été utilisé en spectrométrie de masse afin de détecter les CK présentes dans le produit SPE et les fractions HPLC issues des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana* Col-0. Nos résultats montrent ainsi qu'une variété de composés CK sont effectivement présents dans le produit SPE et dans les fractions HPLC d'*A. thaliana*. Le produit SPE accumule ainsi jusqu'à 480 pmol/g MS (racines) de composés CK suite à 3 semaines de culture (**Tableau 2.12**). A titre indicatif, les niveaux endogènes de CK sont également de l'ordre des pmoles, généralement de 0,15 à 65,76 pmol/g MF (multiplié par 5 à 10 environ pour exprimer en pmol/g MS pour des organes bien hydratés) dans divers organes d'*A. thaliana*, comme les racines et les tiges (Svačinová *et al.*, 2012). Peu de données quantitatives existent ainsi à notre connaissance sur la présence de CK dans des extraits rhizosphériques d'*Arabidopsis* ou d'autres plantes. Dans le produit SPE, ces dosages montrent que la DHZ7G est la CK présente en plus forte quantité suivie de l'iP et de la cZ (**Figure 2.12.A**). De manière intéressante, la



fraction 9 contient également non pas une mais plusieurs CK potentiellement responsables de l'induction des EHS chez *P. ramosa*. Ces CK incluent majoritairement la *cZ*, puis la *cZR*, l'*iP7G*, la *tZ*, et la *DHZ* (**Figure 2.13.B**). Ces résultats viennent compléter ceux de Goyet *et al.* (2017) qui ont notamment montré, par une analyse en MS/MS, la présence d'un squelette relatif à la *DHZ* dans la fraction 9 du colza.

Ces résultats sont de plus cohérents avec le fait que ces CK sont naturellement les plus abondantes à tous les stades de développement chez les plantes autotrophes, et en particulier chez *Arabidopsis* (Svačinová *et al.*, 2012; Kudo *et al.*, 2012; Kieber and Schaller, 2014; Jiskrová *et al.*, 2016; Spallek *et al.*, 2018). Parmi ces composé, la *cZ* s'accumule également dans les graines au cours de leur formation, puis tout au long du processus de germination chez la luzerne (*Medicago sativa*) ou l'avoine (*Avena sativa*) (Stirk *et al.*, 2012). Chez *Arabidopsis*, l'isomère *cZ* est notamment très abondant dans les feuilles en sénescence et dans les racines, probablement en raison d'une affinité plus élevée des CKX pour l'isomère *tZ* (Gaudinová *et al.*, 2005; Sakakibara, 2006; Gajdošová *et al.*, 2011; Svačinová *et al.*, 2012; Stirk *et al.*, 2012). Il est possible que le site catalytique des CKX possède plus d'affinité pour la conformation *trans* que pour la configuration *cis* de la zéatine (Galuszka *et al.*, 2007). Cette différence d'affinité peut également s'expliquer par la conjugaison réversible de la *cZ*, qui est préférentiellement O-glycosylée par les glycosyltransférases plutôt que la *tZ*. Ces formes glycosylées sont connues pour être résistantes à la dégradation irréversible par les CKXs (Hluska *et al.*, 2016). L'*iP7G* est ensuite une des CK les plus abondantes dans les racines et les tiges d'*A. thaliana*, avec la *tZ7G* suivie de leurs formes O-glucosides et 9-glucosides (Svačinová *et al.*, 2012). Ces profils de CK dans les différents organes d'*Arabidopsis*, et notamment dans les racines, concordent avec celui des extraits rhizosphériques dans notre étude. Ces résultats suggèrent que ces CK endogènes soient exsudées par les racines, pouvant impliquer selon la littérature des mécanismes de transport actif ou passif (Holst *et al.*, 2011). Selon nos résultats, la *DHZ7G* est la CK majoritairement détectée dans le produit SPE des extraits rhizosphériques. C'est une forme inactive irréversible des CK et est, de par sa nature, résistante à la dégradation par les CKX (Sakakibara, 2006). Cette résistance à la dégradation pourrait ainsi expliquer son abondance dans les extraits rhizosphériques d'*A. thaliana*.

Toutefois, la *DHZ7G* s'avère être l'un des composés les moins actifs pour induire l'haustoriogénèse chez *P. ramosa* (**Figure 2.16**), avec une faible  $Ec_{50}$  ( $10^{-5}$  M) et une activité haustoriogène maximale peu élevée ( $54,5 \pm 0,05\%$ ). Une telle observation soulève la question du lien entre les quantités des différentes CK et leur activité haustoriogène respective. Dans un second temps, nous avons donc déterminé l'implication relative de chaque CK dans l'activité haustoriogène en tenant compte de leur capacité haustoriogène caractérisée par leur



Ec50 et leur activité maximale. Après cette correction, la *tZ* apparaît comme la CK majoritaire du produit SPE, suivie de l'iP puis de la DHZ7G (**Figure 2.12.B**). De la même façon, la *tZ* se révèle être également la CK majoritaire dans la fraction active 9 (**Figure 2.14.B**). La DHZ, puis la *cZ*, l'iP7G et enfin l'iP concourent ensuite à l'activité haustoriogène de cette fraction. En considérant ces nouveaux résultats, il semble donc que la *tZ* contribue majoritairement à l'activité haustoriogène du produit SPE et de la fraction 9. Cette CK fait partie des composés les plus actifs pour induire des EHS chez *P. ramosa*, avec une Ec50 élevée de  $10^{-7}$  M et une activité haustoriogène maximale de  $61 \pm 4\%$  (**Figure 2.16**). La *tZ* est également connue pour être la CK la plus active biologiquement chez *Arabidopsis*, comme le soulignent Kudo *et al.* (2012) à l'image des composés iP, *tZR*, *cZR* ou DHZR, qui ensuite sont considérés comme les plus actifs (Svačinová *et al.*, 2012). C'est aussi le cas pour la DHZ qui, détectée dans la fraction 9, s'avère également composer l'activité haustoriogène de cette fraction. Ces composés sont toutefois également connus pour être très répandus dans la rhizosphère, car ils peuvent être produits par de nombreux microorganismes du sol comme certaines bactéries ou microalgues (Stirk and Van Staden, 2010). La *tZ* et la DHZ, qui ne sont pas dominantes en valeurs brutes en comparaison avec les autres CK dans les extraits SPE (**Figure 2.12.A**), sont ainsi toutefois responsables de l'induction des EHS chez *P. ramosa*. Les formes *cZ*, iP, iP7G et DHZ7G apparaissent ici comme étant des CK secondaires pour l'activité haustoriogène, aussi bien dans le produit SPE que dans la fraction 9. Ce résultat interroge pourtant si l'on considère l'activité haustoriogène de la *cZ* ou de l'iP7G, qui ne sont pas, et de loin, les composés les plus actifs dans les tests *in vitro* sur des graines germées de *P. ramosa*, avec une faible Ec50 ( $10^{-4}$  à  $10^{-5}$  M) et une activité haustoriogène maximale très faible pour l'iP7G ( $8,61 \pm 0,05\%$ ). Bien qu'abondant dans la plante, la *cZ* est par ailleurs connue pour être une CK de faible activité en comparaison avec la *tZ* ou la *tZR* chez *A. thaliana* (Sakakibara, 2006; Gajdošová *et al.*, 2011; Kudo *et al.*, 2012).

L'iP7G est présent uniquement dans la fraction 9, ce qui le positionnerait comme l'élément permettant de discriminer cette fraction des fractions non actives (**Figure 2.15.A**). Toutefois, compte tenu de la faible efficacité de composé à induire des EHS (**Figure 2.16**), les quantités relatives observées demeurent trop faibles pour pouvoir expliquer l'activité haustoriogène de la fraction 9. Il est à noter que les activités haustoriogènes relatives de la *cZR*, la *cZ7G*, l'iPR et l'iP9G, pourtant détectées dans les extraits rhizosphériques d'*A. thaliana*, n'ont pu être évaluées compte tenu de l'absence de données sur l'induction haustoriale par ces composés. Néanmoins, les formes ribosides et N-glucosides semblent être les formes les moins actives pour l'induction haustoriale (Goyet *et al.*, 2017).

De façon surprenante, nos analyses montrent toutefois que la fraction 8 est la fraction la plus riche en CK (**Figure 2.13.A**). Après correction en tenant compte des capacités haustoriogènes



respectives des CK de cette fraction, celle-ci présente une forte capacité haustoriogène potentielle, supérieure à celle de la fraction 9 (**Figure 2.14.A**). Toutefois ce potentiel n'est pas concordant avec l'inefficacité de cette fraction à induire la formation d'EHS (**Figure 2.5**). Une concentration en CK trop élevée aurait pu expliquer cette inactivité, puisque les graines de *P. ramosa* sont insensibles aux fortes concentrations de CK et requièrent des intervalles de concentrations très précis pour déclencher l'haustoriogenèse (**Figure 2.16**) (Goyet *et al.*, 2017). Ainsi, l'activité haustoriogène de toutes les fractions a été testée pour des dilutions de  $10^{-2}$  à  $10^{-9}$  M, mais sans qu'aucune activité haustoriogène ne soit détectée pour d'autres fractions que la n°9 et n°16 (**Tableau 2.13**). En considérant ces résultats, il serait possible que l'activité haustoriogène unique de la fraction 9, par rapport à d'autres fractions riches en CK, puisse être reliée à des phénomènes de synergie entre CK présentes à des proportions précises (**Figure 2.15.B**). A cet égard, des effets additifs entre des CK de synthèse, la kinétine et la 6-benzylaminopurine (BAP), ont été démontrés dans le cadre de cultures *in vitro*. L'association de ces deux CK conduit à un effet synergique, en permettant d'obtenir un taux plus important de multiplication et d'élongation de jeunes pousses que les composés seuls, pour la plante médicinale *Chlorophytum borivillianum*, le bambou (*Bambusa glaucescens*), la Calebasse (*Lagenaria siceraria*) ou le vétiver (*Vetiveria zizanioides*) (Saha *et al.*, 2007; Shirin and Rana, 2007; Ashraf *et al.*, 2014; Sompornpailin and Khunchuay, 2016). Les effets combinés de la kinétine et de la BAP agiraient ainsi comme un signal commun amplifié, permettant de réguler la transcription des gènes impliqués dans la croissance et le développement cellulaire (Sompornpailin and Khunchuay, 2016).

A ce jour, notre hypothèse est donc que les proportions respectives des CK haustoriogènes *tZ*, *cZ* et DHZ, sont déterminantes pour initier la formation de l'haustorium chez *P. ramosa* (**Figure 2.15.B**). Il serait donc important de tester cette hypothèse pour conclure sur l'activité du produit SPE et de la fraction 9 et l'inactivité des fractions riches en CK haustoriogènes et pourtant inactives. Un tel phénomène pourrait être expliqué en considérant l'affinité des récepteurs histidine kinase (HK), qui possèdent chacun des spécificités de liaison avec les CK (Sakakibara, 2006; Lomin *et al.*, 2012). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse, si les mécanismes de perception des CK impliqués chez *P. ramosa* sont les mêmes que chez *A. thaliana*, que la *tZ*, la *cZ* et la DHZ se fixent sur des récepteurs HK différents et permettent ainsi d'amplifier le signal CK et d'initier l'haustoriogenèse. A ce titre, la spécificité exclusive du récepteur AHK3 pour la *tZ* et en moindre effet pour la DHZ a été démontrée, tandis que la *cZ* se lierait préférentiellement à AHK4 ou AHK2 (Spíchal *et al.*, 2004; Sakakibara, 2006). Hwang et Sheen (2001) ont également souligné que l'intensité de la transmission du signal CK dépendait du récepteur impliqué. Ainsi, le signal induit par AHK3 et AHK2 serait nettement inférieur à celui produit par AHK4, mais il serait plus spécifique. Quoiqu'il en soit, de tels effets



de synergisme mettant en jeu des proportions précises entre CK n'ont pour le moment pas été démontrés.

### 3.2. Des avancées concernant l'activité de la fraction 16

L'absence de CK dans la fraction 16, ainsi qu'une signalisation induite non liée aux CK au cours de la formation des EHS, confirme l'existence de composés distincts des CK dans cette fraction.

Aussi, afin d'identifier les composés haustoriogènes de la fraction 16 d'*A. thaliana*, des analyses d'identification sans a priori ont été réalisées par UPLC-MS/MS. Un pic chromatographique visible dans la fraction 16 et absent dans la fraction 12 inactive a retenu notre attention (**Figure 2.17**). L'absorption de ce composé étant nulle dans les UV (200-500 nm), ce composé diffère des métabolites issus de la voie du shikimate, tels que les phénylpropanoïdes incluant les flavonols, les coumarines ou les isoflavonoïdes (Duval *et al.*, 1999; Khoddami *et al.*, 2013). Ce constat permet ainsi d'exclure la présence de ce type de composés dans la fraction 16. Rappelons à ce titre que Goyet *et al.* (2017) avaient souligné qu'un standard correspondant à un flavonoïde, l'isoramenthine, co-élueait avec la fraction 16 des extraits rhizosphériques de *B. napus*. Cependant ce flavonoïde est dépourvu d'activité haustoriogène, ce qui écartait l'hypothèse que ce composé puisse être à l'origine de l'activité de la fraction 16.

L'analyse par spectrométrie de masse HR du pic différentiel de la fraction 16 révèle que ce composé, de masse moléculaire de 424 g/mol, se fragmente en une transition de 134 Da, puis quatre transitions successives neutres de 58 Da (**Figure 2.18**), ce qui suggère la présence de groupes contigus d'atomes avec des motifs répétés qui pourraient ainsi refléter la présence d'une chaîne latérale. En se basant sur la masse monoisotopique de ce composé (424.302755), déterminée à partir du spectre MS/MS de haute résolution, il a été possible de proposer des formules brutes impliquant uniquement les atomes de carbone (C), hydrogène (H) et oxygène (O) (**Figure 2.19**). Nous pouvons ainsi écarter les composés incluant d'autres atomes (notamment l'azote, N), comme les nucléosides avec l'adénosine (C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>), mais aussi les acides aminés, les dipeptides ou les alcaloïdes indoliques, identifiés dans d'autres travaux dans les extraits rhizosphériques d'*Arabidopsis* ou de tomate (Strehmel *et al.*, 2014; Sung *et al.*, 2015). Ainsi, l'association de la masse monoisotopique théorique de ce composé avec des formules brutes de masses équivalentes dans la banque en ligne (<http://www.cheminfo.org/>) (résultats non montrés) suggère que la structure de l'analyte recherché se rapproche des celles des composés appartenant à la famille des triterpènes ou des stéroïdes. Les triterpènes sont des composés en C<sub>20</sub> ou C<sub>30</sub> faisant partie du groupe des terpénoïdes qui représente l'un des groupes de composés spécialisés naturels les plus



nombreux et les plus diversifiés (Thimmappa *et al.*, 2014). Les terpénoïdes sont en particulier synthétisés à partir d'oligomères d'isopentenyl pyrophosphate (IPP) et comprennent notamment des stérols, des stéroïdes et des saponines triterpénoïdes (Phillips *et al.*, 2006). S'il s'avère que les stérols jouent un rôle dans la signalisation hormonale, la fonction des triterpènes reste encore mal comprise, même si il a déjà été évoqué que ces composés pourraient avoir un rôle dans le développement des racines (Thimmappa *et al.*, 2014; Kemen *et al.*, 2014). Par exemple, chez l'avoine (*Avena strigosa*), un mutant pour la synthèse de la  $\beta$ -amyrine un triterpène très répandu chez les plantes, présente des altérations au niveau du développement précoce de la racine et en particulier dans formation des poils absorbants (Kemen *et al.*, 2014). Une observation équivalente a pu être faite pour l'avénacine A-1, un triterpène glycoside, qui confère une résistance aux pathogènes du sol et dont l'altération de la biosynthèse chez le mutant *Saponine déficient 4* (Sad4) entraîne une réduction des poils racinaires chez l'avoine (Mylona *et al.*, 2008). De par la proximité d'origine et de structure entre les poils absorbants des plantes autotrophes et les structures haustoriales de *P. ramosa*, des composés de la famille des triterpènes pourraient ainsi participer à la formation des papilles. Un tel contrôle passerait dans ce cas par la régulation de l'expression du gène de différenciation cellulaire *PrTRN2* qui est exprimé chez la plante parasite en réponse à la fraction 16 d'*A. thaliana*. L'implication potentielle d'un triterpène dans l'activité haustoriogène de la fraction 16 d'*A. thaliana* rejoint de plus des résultats obtenus chez l'hémiparasite facultative *Agalinis purpurea* démontrant l'activité haustoriogène d'un triterpène pentacyclique, le soyasapogenol B, isolé à partir des extraits rhizosphériques de la plante hôte *Lespedeza sericea* (Steffens *et al.*, 1986). Toutefois, le soyasapogenol B et les soyasaponines, auxquelles il se rapporte, ont des propriétés qui ne semblent pas correspondre au composé recherché dans la fraction 16 d'*A. thaliana*, même s'ils ont des temps de rétention similaires. Ainsi, aucune perte de neutre de 58 Da n'est notamment associée aux spectres de soyasaponines (Arnaud Lanoué, communication personnelle). Par ailleurs, en se rapportant aux activités biologiques et moléculaires observées, ce composé serait également commun aux extraits rhizosphériques de différentes plantes hôtes, comme *B. napus* et *S. lycopersicum*. Il s'agirait donc d'un composé suffisamment universel pour être conservé entre les extraits de *Solanaceae* et de *Brassicaceae*, ce qui ne semble pas convenir avec les soyasaponines présentes exclusivement chez les *Fabaceae* (Chang and Lynn, 1986). Nos travaux ont également montré l'implication des ROS dans la signalisation induite par la fraction 16. A notre connaissance, aucune information concernant une interaction fonctionnelle entre des stéroïdes ou des triterpènes et des ROS n'est disponible à ce jour. Si le composé reste toutefois encore à identifier, les recherches pourraient ainsi se concentrer sur un composé suffisamment universel et impliqué dans la production du peroxyde d'hydrogène.



#### 4. La plante hôte produit et exsude des cytokinines dans la rhizosphère

Nos résultats montrent que des CK à activité haustoriogène sont présentes dans la rhizosphère des plantes hôtes de *P. ramosa*. La provenance de ces CK ne peut toutefois être clairement établie, les CK pouvant avoir pour origine la plante et/ou les microorganismes endosphériques et rhizosphériques. Les plantes produisent et exsudent des composés organiques tels que des acides organiques, aminés ou gras ou des sucres à partir de leurs racines (Haichar *et al.*, 2014; Strehmel *et al.*, 2014). Parmi ces composés, des métabolites secondaires sont également exsudés comme des flavonoïdes ou des composés phénoliques qui jouent un rôle majeur dans le contrôle de la communication avec d'autres organismes du sol, et notamment les microorganismes de la rhizosphère. En retour, ces microorganismes produisent des régulateurs de croissance, tels que les auxines et les CK (Boivin *et al.*, 2016). Ces hormones peuvent également être exsudées à partir des racines des plantes, mais les informations sur ce phénomène restent rares et la place d'un tel procédé dans la communication entre la plante et les microorganismes de la rhizosphère ou d'autres plantes demeurent jusqu'à présent mal comprise. A ce jour, seule l'implication des strigolactones exsudées par les plantes dans les interactions symbiotiques avec *Rhizobium*, dans la ramification des hyphes mycéliens des champignons mycorhiziens, ou la germination des plantes parasites atteste que les phytohormones agissent en tant que molécules signal au sein de la rhizosphère (Akiyama *et al.*, 2005; van Zeijl *et al.*, 2015; Brun *et al.*, 2019). Afin de confirmer l'hypothèse la plus probable que la plante hôte est bien à l'origine des CK détectées dans les extraits rhizosphériques, des plantes mutantes et transgéniques d'*A. thaliana* pour différentes étapes de la voie de production et de transport des CK ont été utilisées au cours de notre étude (**Figure 2.1**).

Nos résultats montrent que les *Arabidopsis* altérés dans le métabolisme ou le transport des CK ont conservé une capacité à induire l'haustoriogénèse de *P. ramosa*, les extraits rhizosphériques présentant un pic d'activité au cours des semaines 4, 5 et 6 (**Figure 2.20**). Cette cinétique d'activité est semblable à celle du témoin Col-0 et seul le mutant *pup14*, déficient dans l'import des CK dans le symplaste (cytosol), se distingue par une activité haustoriogène précoce dès la première semaine de culture. Cette activité demeure toutefois peu élevée. Dans l'hypothèse que les CK des extraits rhizosphériques sont produites par les plantes, les profils d'activités sont très probablement à relier aux stades de développement de ces dernières. En effet, les trois premières semaines de développement impliquent une division et une différenciation cellulaire intense, notamment dans le cadre de la formation des racines, phénomène impliquant plus particulièrement des CK (Kieber and Schaller, 2014; Schaller *et al.*, 2014). Ainsi, les CK produites par les racines pourraient être majoritairement



sollicitées par l'organogenèse, limitant leur exsudation dans la rhizosphère. Dans notre étude, le pic d'activité haustoriogène des extraits rhizosphériques d'*Arabidopsis* est atteint à la 5<sup>ème</sup> semaine de culture pour l'ensemble des géotypes, soit au stade floraison. Cependant, l'activité haustoriogène maximale des extraits rhizosphériques varie en fonction du géotype. Ainsi, les plants *log4* et 35S:CKX2 se caractérisent par une activité réduite par rapport à celle des plants Col-0, alors que celle des plants *pup14* n'est pas impactée. Les protéines LONELY GUY (LOG) sont en effet impliquées dans la formation de CK actives par hydrolyse du groupement riboside (Kuroha *et al.*, 2009). Une mutation au niveau de la protéine LOG4 augmenterait ainsi la quantité de CK conjuguées (ribosylées) et donc inactives dans la plante (Tokunaga *et al.*, 2012). Ces mêmes CK ribosylées s'avèrent également avoir une faible activité haustoriogène (Goyet *et al.*, 2017). Nos résultats pour le mutant *log4* suggèrent donc que la diminution en CK actives endogènes se répercuterait sur l'exsudation de ces CK dans la rhizosphère et ainsi sur l'activité haustoriogène des extraits rhizosphériques. Par ailleurs, les extraits rhizosphériques des plants transgéniques d'*Arabidopsis* surexprimant le gène *CKX2*, codant pour une enzyme de dégradation des CK, ont également montré une activité haustoriogène plus faible que ceux de l'écotype sauvage Col-0. Les CKX sont en effet connues pour être des protéines responsables de la dégradation irréversible des CK par clivage oxydatif du groupement N<sup>6</sup> (Galuszka *et al.*, 2007; Zürcher *et al.*, 2016). CKX2 possède notamment une plus forte activité de dégradation des formes iP, tZ et de leur dérivés ribosides (Nishiyama *et al.*, 2011). Cette enzyme est sécrétée dans l'apoplaste où elle dégrade les CK actives présentes (Werner *et al.*, 2003; Galuszka *et al.*, 2007; Zürcher *et al.*, 2016). Ainsi, la dégradation des CK par CKX2 entraînerait une diminution de CK présentes dans l'apoplaste et conduirait alors également à une baisse de l'exsudation des CK. Les extraits rhizosphériques du mutant *pup14* sont aussi actifs que ceux des plants Col-0. La protéine PUP14 est un transporteur situé dans la membrane plasmique et est spécialisée dans l'import des CK actives de l'apoplaste dans le cytoplasme, afin de limiter leur fixation sur les récepteurs membranaires HK. Il a été montré que cette protéine contribuait notamment à contrôler la quantité de CK de manière spatiotemporelle dans la plante et plus particulièrement dans l'apoplaste (Zürcher *et al.*, 2016; Stoeckle *et al.*, 2018). Nos résultats suggèreraient qu'il n'existe aucune augmentation de CK apoplastiques qui pourraient être ensuite potentiellement exsudées. Il est toutefois à noter que même si la mutation de *pup14* conduisait à une augmentation de la quantité de CK dans l'apoplaste, un rétrocontrôle négatif pourrait alors être activé par le biais notamment de CKX apoplastiques (CKX2 et CKX4) (Motyka *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'activité haustoriogène des extraits rhizosphériques étant légèrement plus précoce chez *pup14* que chez Col-0, en étant significative dès la première semaine, suggèrerait que le surcroît de CK libres dans l'apoplaste chez le mutant *pup14* contribuerait



effectivement au pool de CK exsudées, mais se rendrait également disponible plus tôt pour le développement de la plante en étant relocalisées dans les parties aériennes.

Le fractionnement par HPLC inverse des extraits rhizosphériques de chaque génotype, préalablement concentré par SPE, conduit également à l'isolement des fractions actives 9 et 16 chez les plantes testées. Cependant, des différences d'activité selon les génotypes sont observées pour la fraction 9, qui est connue pour contenir des CK (**Figure 2.21**). En effet, le produit SPE et la fraction 9 du mutant *log4* et de la lignée transgénique 35S:CKX2 ont une activité plus faible que celle de Col-0. En revanche, l'activité de la fraction 9 du mutant *pup14* et de Col0 sont semblables. Ainsi, les répercussions des mutations de la voie de signalisation des CK sont également observées pour l'activité de la fraction 9. Ces résultats confirment ainsi qu'une diminution de la quantité de CK actives dans les plantes *log4* et 35S:CKX2 contribue à la diminution de l'exsudation de ces composés dans la rhizosphère.

L'ensemble de ces résultats démontre qu'une altération de la voie des CK de la plante hôte a des répercussions directes sur l'activité haustoriogène des extraits rhizosphériques. Par conséquent, nos résultats démontrent que les CK haustoriogènes présentes dans la rhizosphère sont exsudées de manière constitutive par les racines de la plante hôte, bien qu'un tel processus ne soit pas ou peu décrit. Ces observations renforcent l'hypothèse proposée par Goyet *et al.* (2017) selon laquelle ces phytohormones agiraient en tant que molécules de signalisation rhizosphérique et plus particulièrement de signalisation dans l'interaction plante hôte/plante parasite.

Le fractionnement des extraits rhizosphériques des plants mutants a également conduit à l'isolement d'une fraction 16 active. Il s'avère que les fractions 16 de plants *log4* et 35S:CKX2 sont moins actives que celle de Col-0. Ainsi, ces résultats montrent que la qualité générale de l'exsudation racinaire est impactée, et notamment la fraction 16 en jouant sur d'autres processus de régulation. Les mutations affectant la biosynthèse et la dégradation des CK chez les plantes testées auraient un effet pléiotropique, en influençant ainsi plusieurs traits phénotypiques. Ces effets ont déjà pu être constatés comme par exemple avec le gène participant à l'hyponastie des feuilles *HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1)* qui modifie également les réponses de la plante envers plusieurs hormones incluant une diminution de la sensibilité à l'auxine et aux CK en même temps qu'une hypersensibilité à l'ABA (Lu and Fedoroff, 2000). Ce mutant est ainsi caractérisé à la fois par une hyponastie des feuilles mais aussi par une croissance et une floraison retardée, une fertilité réduite et une réponse gravitropique des racines altérée (Lu and Fedoroff, 2000). Si de tels effets pléiotropiques peuvent être observés pour un gène donné, l'analyse des différents traits phénotypiques qui en résulte permet néanmoins d'établir des corrélations entre différentes voies de régulation (Auge *et al.*, 2019).



Il est ainsi envisageable que les deux fractions, dont nous avons montré l'activité synergique, soient également liées plus étroitement en termes de régulation. Si l'on considère ainsi la possible implication de triterpènes dans la fraction 16, il semblerait que les CK et les triterpènes soient issus d'une voie de biosynthèse d'origine commune en faisant intervenir le précurseur IPP (isopentenyl pyrophosphate) et le DMAPP (diméthylallyl diphosphate), tous les deux issus de la voie du mévalonate (MVA) et permettant la synthèse des formes isoprénoïdes (Sakakibara, 2006; Thimmappa *et al.*, 2014). Il a notamment été démontré qu'une surexpression de l'enzyme régulatrice Farnesyl Diphosphate Synthase (FPS), catalysant la Farnesyl Diphosphate (FPP), qui constitue un substrat pour la synthèse des triterpènes, diminue la disponibilité en substrat d'IPP et de DMAPP pour la synthèse des CK par un effet de compétition (Masferrer *et al.*, 2002). Dans ce cas présent, une altération de la voie de biosynthèse des CK pourrait ainsi avoir une répercussion indirecte sur la biosynthèse des triterpènes éventuellement présents dans la fraction 16, ce qui permettrait d'expliquer une diminution de l'activité haustoriogène de cette fraction.

### 5. Les récepteurs des cytokinines, la clé de l'haustoriogénèse chez *P. ramosa* ?

Nos résultats montrent que l'induction de la formation des EHS dépendent en grande partie de cytokinines exsudées par la plante hôte. Un tel rôle dans la communication rhizosphérique plante/plante parasite soulève toutefois la question d'une adaptation éventuelle de la plante parasite afin de percevoir ces hormones. Une des hypothèses concernant l'haustoriogénèse de *P. ramosa* est que les CK à activité haustoriogène exsudées sont perçues par les mêmes récepteurs des CK que ceux impliqués chez les plantes autotrophes. Ce système de perception intracellulaire des CK utilisé par les plantes autotrophes fait appel à deux composants comprenant une protéine HK et un régulateur de réponse (Schenk and Snaar-Jagalska, 1999). Chez *A. thaliana*, il existe trois séquences homologues *AHK2*, *AHK3* et *CRE1/AHK4*, identifiées comme des récepteurs AHK percevant les CK (Suzuki *et al.*, 2001; Ueguchi *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2001).

Une implication des récepteurs HK dans l'induction haustoriale de *P. ramosa* a notamment pu être mise en évidence grâce à l'inhibition de l'activité haustoriogène de la fraction 9 par le Pi-55. Ce composé, de par sa structure, est un inhibiteur chimique compétitif de la BAP (CK aromatique) connue pour se lier aux récepteurs AHK4 et AHK3 chez *A. thaliana* (Spíchal *et al.*, 2009). Lors de l'haustoriogénèse chez *P. ramosa*, le PI-55 a montré une activité inhibitrice de la perception de cette CK et nos résultats montrent également qu'il possède une activité inhibitrice de l'activité de la fraction 9, jusqu'à 71% pour des concentrations allant de  $10^{-5}$  M et  $10^{-6}$  M (**Figure 2.10**). La formation des EHS est ainsi diminuée par l'action du PI-55 qui



perturberait la perception des CK par les récepteurs *HK3* et *HK4* et empêcherait ainsi l'expression de la voie de transduction de ce signal. Ces résultats viennent appuyer ceux obtenus par Goyet *et al.* (2017), qui ont également observé un effet inhibiteur du PI-55 sur l'activité haustoriogène des extraits rhizosphériques de colza lors d'un co-traitement avec la BAP. L'activité haustoriogène n'est toutefois pas totalement inhibée. Le PI-55 se lierait effectivement préférentiellement au récepteur *HK4*, ce qui laisserait d'autres voies de perception et de transduction du signal possible, comme notamment par le biais d'*HK3* (Spíchal *et al.*, 2009). Ces informations permettent néanmoins de souligner que l'induction haustoriale de *P. ramosa* en réponse à la fraction 9 passe nécessairement par un mécanisme de perception des CK impliquant les récepteurs *HK3* et *HK4*. Un autre inhibiteur de la perception des CK, le LGR-991, n'a en revanche aucun effet sur l'activité haustoriogène de la fraction 9, comme sur celle de la BAP. Cet inhibiteur, structurellement proche du PI-55, a pourtant montré son efficacité comme antagoniste de la BAP en se liant sur le récepteur *AHK4* de la même façon que le PI-55, mais également sur *AHK3* (Nisler *et al.*, 2010). Il semble ainsi que ce composé ne soit toutefois pas assez spécifique des récepteurs *HK* de *P. ramosa* pour inhiber la formation des EHS.

La présence des gènes codant les protéines réceptrices des CK, *HK3* et *HK4* a pu être confirmée lors des recherches *in silico* dans les bases de données des transcriptomes des plantes parasites *P. ramosa* et *O. cumana*. Toutefois, aucune séquence *HK2* n'a pu être identifiée dans les bases de données (**Tableau 2.11**). Aussi, seules les deux séquences homologues *HK3* et *HK4* ont pu être clonées chez ces deux espèces. Il s'avère que les séquences nucléotidiques et protéiques obtenues respectivement pour chaque récepteur *HK3* ou *HK4* chez *P. ramosa* et *O. cumana* sont très similaires entre elles (**Tableau 2.14**). Les similarités structurelles de chaque récepteur ont déjà été observées à plus large échelle entre les plantes autotrophes, comme *A. thaliana* et *Malus domestica* ou *Cucumis sativus* (Steklov *et al.*, 2013). Ce sont en particulier les domaines de perception des CK (CHASE) qui sont connus pour être spécifiques de chaque récepteur et déterminent ainsi les différences entre le récepteurs *HK3* ou *HK4* (Steklov *et al.*, 2013). Par ailleurs, les alignements multiples des séquences protéiques *HK3* et *HK4* de *P. ramosa* et *O. cumana* ont révélé la présence de motifs d'acides aminés consensuels correspondants aux positions conservées des domaines identifiés chez les récepteurs *HK* (**Figure 2.22, Annexe 1**). Il s'agit ainsi du domaine de fixation des CK, ou domaine CHASE qui est suivi par un longue région Histidine Kinase (*HK*) de 260 à 285 aa et de deux domaines de transduction du signal (response regulator, *RR*) présents dans chacune des séquences de *P. ramosa* et *O. cumana*. Ces régions caractéristiques des *HK* sont connues pour être fortement conservées entre les récepteurs de même type (Steklov *et al.*, 2013; Kuderová *et al.*, 2015) et permettent ainsi de confirmer que les séquences



obtenues par clonage moléculaire sont bien des récepteurs HK. Ces travaux ont également permis de révéler que la séquence *HK2* était absente des banques de transcrits existantes pour les plantes parasites *S. hermonthica*, *P. aegyptiaca* et *L. philippensis* (**Tableau 2.11**). L'absence du récepteur HK2 chez l'ensemble des plantes parasites représentées dans cette étude témoigne de ce point de vue d'un éloignement avec les plantes angiospermes autotrophes de la sous-classe des Rosidées (*M. truncatula*, *A. thaliana*, *C. rubella* et *C. clementina*) et de la sous-classe des Asteridées avec également *S. lycopersicum*, chez qui la séquence *HK2* est toujours présente (**Figure 2.23**). Toutefois, l'absence du gène *HK2* est observée également chez *S. tuberosum* qui appartient au même clade des Lamiidés de la sous-classe des Astéridées que les plantes parasites (Bennett and Mathews, 2006). Cette absence pourrait ainsi être interprétée comme un évènement évolutif spécifique. Chez *Arabidopsis*, les récepteurs AHK2 et AHK4 sont connus pour être fonctionnellement proches et possèdent tous les deux une préférence marquée pour l'iP, tandis que AHK3 diffère dans les préférences de ligand et ne possède qu'une faible affinité avec l'iP (Kuderová *et al.*, 2015). En revanche, les deux récepteurs AHK2 et AHK3 sont évolutivement liés tandis que AHK4 est bien distinct des deux autres. Les gènes *AHK2* et *AHK3* sont notamment tous les deux exprimés dans les tiges et semblent fonctionner conjointement en agissant *via* une voie de régulation commune (Riefler *et al.*, 2006). En effet, il a été démontré que les mutations simples *ahk2* et *ahk3* n'ont pas d'impact majeur sur la croissance des plantes, tandis qu'une double mutation *ahk2 ahk3* conduit à une atrophie du développement des plants d'*A. thaliana* (Nishimura *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006; Stolz *et al.*, 2011). Plus particulièrement, des analyses de complémentations fonctionnelles des récepteurs ont montré que AHK4 pouvait remplacer fonctionnellement AHK2 mais pas AHK3 (Stolz *et al.*, 2011). Ainsi, comme le souligne Bartrina *et al.* (2017), l'action essentiellement redondante de AHK2 et AHK3 est intrigante et questionne quant à savoir pourquoi ces deux gènes aux fonctions apparemment similaires ont été conservés au cours de l'évolution. Compte tenu de la similarité fonctionnelle de AHK2 avec les autres récepteurs, il serait alors possible que le gène correspondant ait disparu par une sélection négative au cours de l'évolution des plantes parasites.

Une analyse phylogénétique des domaines CHASE des récepteurs HK a donc été réalisée pour les séquences *HK3* et *HK4* des plantes parasites et des plantes autotrophes (**Figure 2.24**). Cette analyse a ainsi permis de classer les récepteurs en deux groupes avec les séquences *HK3* d'un côté et les séquences *HK4* de l'autre. Ces distinctions entre les séquences *HK3* et *HK4* reflètent les divergences fonctionnelles qui existent entre ces récepteurs concernant la reconnaissance de différentes CK (Romanov, 2002). Ces résultats se traduisent également par des pourcentages d'homologie relativement faible entre ces séquences (**Tableau 2.14**). Dans chaque clade formé par les HK, deux sous-groupes se

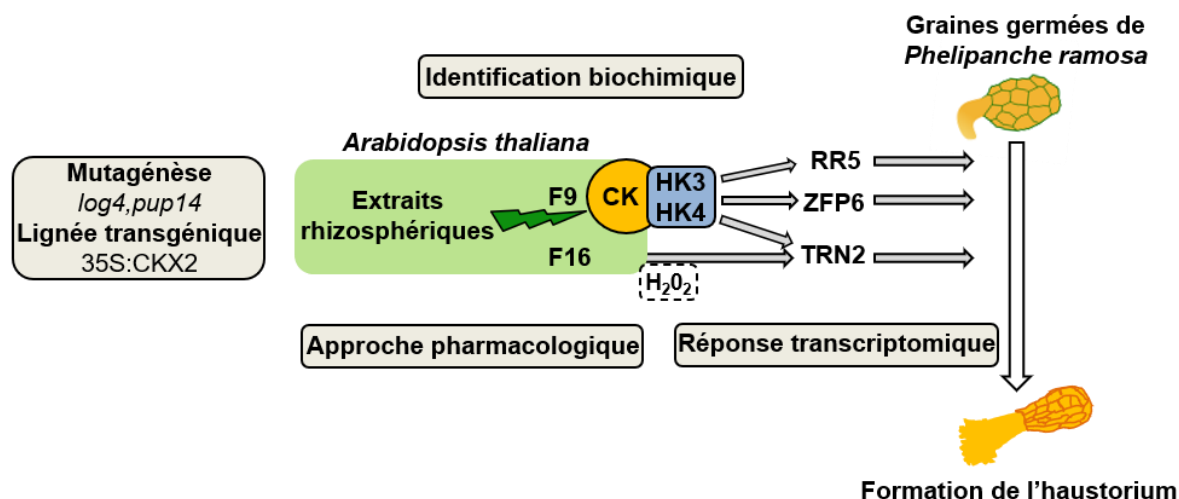


dessinent en distinguant les séquences des plantes parasites de celles des plantes autotrophes. Les séquences *HK3* et *HK4* semblent donc être conservées indépendamment pour les plantes parasites et les plantes autotrophes. Cette différenciation entre les séquences HK autotrophes et parasites suggère ainsi des caractéristiques spécifiques de reconnaissance des CK chez les différentes plantes parasites. Collectivement, ces données appuient également le fait que la perception des CK par les récepteurs HK est cruciale pour l'haustoriogenèse de *P. ramosa* et passe par l'implication de deux récepteurs *PrHK3* et *PrHK4* qui sont structurellement et fonctionnellement distincts.

Ainsi, les CK font partie de la rhizosphère des plantes hôtes naturelles ou non, en étant exsudées par leurs racines, et sont perçus par *P. ramosa* à travers les domaines CHASE des récepteurs HK3 et HK4. Cette interaction des CK avec leur récepteur déclenche une voie de signalisation CK-dépendante conduisant à l'expression de gènes impliqués dans la différenciation des EHS, une des premières étapes du développement de l'haustorium.

## V. Conclusion

A l'image de ce qui a été démontré dans le cas des plantes hémiparasites, l'haustoriogenèse chez *P. ramosa* est un phénomène inductible. Les résultats obtenus par Goyet *et al.* (2017) ont montré que des substances contenues dans les extraits rhizosphériques de *B. napus* déclenchaient la mise en place de cet organe. Au cours de cette étude, nous avons également pu montrer que ce signal était présent dans les extraits rhizosphériques d'autres plantes hôtes, ici *S. lycopersicum* et *A. thaliana*. De plus, ce signal haustoriogène est constamment présent sous la forme de deux fractions actives 9 et 16, aux propriétés chimiques bien distinctes. La fraction 9 se caractérise notamment par la présence d'un bouquet de composés appartenant à la famille des CK (*tZ*, *cZ* et *DHZ*). Ces CK jouent ainsi un rôle majeur dans l'induction haustoriale et l'agressivité de *P. ramosa*. Nous avons également pu démontrer qu'une altération des étapes de biosynthèse ou de dégradation des CK conduisait à une variation de l'activité haustoriogène des extraits d'*A. thaliana*, et en particulier de la fraction 9. Ces résultats traduisent ainsi une altération dans l'exsudation des composés CK dans la rhizosphère chez ces mutants. Les CK présentes dans la fraction 9 sont donc constitutivement exsudées par les racines de l'hôte et agissent comme des molécules signal dans la rhizosphère, à l'instar des strigolactones qui sont nécessaires pour la germination des graines d'orobanche. Ce signal provenant de l'hôte est tout d'abord perçu par des récepteurs HK de la plante parasite. Seuls les récepteurs HK3 et HK4 sont sollicités lors de la perception et la transmission du signal CK haustoriogène chez *P. ramosa*. En effet, une absence du récepteur HK2 chez *P. ramosa* et *O. cumana* a été mise en évidence chez ces



**Figure 2.26. Synthèse des différents acteurs identifiés dans cette étude comme étant impliqués dans l'induction de la formation de l'haustorium chez *Phelipanche ramosa*.**

Les extraits rhizosphériques d'*A. thaliana*, induisent la formation de l'haustorium chez *P. ramosa* à travers l'action de deux fractions haustoriogènes biochimiquement distinctes F9 et F16. Un pool de CK identifiées dans la fraction 9 (*tZ*, *cZ* et *DHZ*) sont constitutivement exsudées par les racines de la plante hôte et sont perçues par *P. ramosa* à travers les récepteurs HK3 et HK4. La perception du signal CK induit l'expression de gènes marqueurs des CK, *RR5*, *CKX2*, *CKX4*, *CKX5* et de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire *ZFP6* et *TRN2* conduisant à la formation des papilles haustoriales chez *P. ramosa*. Le second signal haustoriogène encore non complètement caractérisé de la fraction 16 serait constitué de triterpènes et nécessiterait du peroxyde d'hydrogène. Ce signal déclenche une voie de signalisation distincte des CK mais qui converge vers le même intégrateur du signal *TRN2*.

plantes parasites témoignant ainsi d'un évènement évolutif spécifique de ces plantes. Le regroupement phylogénétique des séquences des domaines CHASE HK3 d'un côté et HK4 de l'autre indique par ailleurs des spécificités des domaines de fixation des CK de chaque récepteur par rapport à ceux des plantes autotrophes. Cette reconnaissance spécifique par les récepteurs HK des CK à activité haustoriogène induit par la suite une cascade de régulation conduisant à l'expression de gènes impliqués dans la régulation du signal CK (*PrRR5*, *PrCKXs*) et la formation des structures haustoriales (*PrZFP6*, *PrTRN2*).

Nos résultats ont montré qu'un second signal haustoriogène existait également dans les extraits rhizosphériques des plantes hôtes testées. Ces derniers contiennent en effet des HIF possédant des caractéristiques chimiques différentes des CK et regroupés dans la fraction 16. L'analyse de l'expression de gènes CK-dépendant ou ne dépendant pas des CK conduisant à l'haustoriogenèse chez *P. ramosa* a permis de préciser les acteurs moléculaires impliqués. En particulier, le gène *PrTRN2* qui se trouve exprimer en réponse à la fraction 9 et à la fraction 16. Cette observation suggère ainsi le rôle pivot de *PrTRN2* lors de l'haustoriogenèse en réponse à une signalisation CK-dépendante et à une autre voie encore inconnue. Ces résultats révèlent ainsi l'existence d'un autre signal rhizosphérique haustoriogène n'induisant pas de signalisation CK mais dépendant de la formation du peroxyde d'hydrogène. Ce composé suggère donc une certaine implication des ROS lors l'induction haustoriale par la fraction 16, bien que différente de ce qui est décrit pour les plantes hémiparasites faisant appel au métabolisme des quinones. Par ailleurs, bien que leur identification demande encore à être précisée, il semble que les composés présents dans la fraction 16 présentent des caractéristiques les apparentant à la famille des triterpènes. Ces composés jouent également un rôle dans l'agressivité de *P. ramosa* et agissent en synergie avec les CK. La présence d'un double signal haustoriogène contenu dans les extraits rhizosphériques de plantes hôtes présente ainsi le signal gouvernant l'induction de l'haustorium chez *P. ramosa* comme un signal complexe, pouvant ainsi faire appel à plusieurs niveaux de régulation qui pourrait influencer le spectre d'hôte de cette plante parasite (**Figure 2.26**).



## **CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES**



## Conclusions générales et Perspectives

Le mode de vie parasitaire acquis par les plantes au cours de l'évolution est directement lié au développement de l'haustorium. Bien qu'il ait été montré que chez les plantes hémiparasites (*T. versicolor*, *P. japonicum*, *Striga sp*) le développement de cet organe résultait de la détection de composés phénoliques provenant de l'hôte et initiant une signalisation impliquant des ROS, l'induction de la formation de l'haustorium chez les espèces holoparasites telle que *P. ramosa* restait majoritairement mal comprise (Keyes *et al.*, 2000; Bandaranayake *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 2016; Goyet *et al.*, 2017). La récente découverte du caractère inductible de la formation de l'haustorium chez *P. ramosa* par les extraits rhizosphériques de *B. napus* impliquant un signal CK, a marqué un tournant vers la compréhension de ce mécanisme (Goyet *et al.*, 2017). A travers ces travaux de thèse, nous avons caractérisé plus avant les signaux haustoriogènes provenant de l'hôte et décrypté les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de l'haustorium.

L'ensemble des travaux présentés ici démontrent ainsi l'implication d'un pool de CK provenant de l'hôte dans la formation de l'haustorium chez la plante parasite *P. ramosa* et précise la nature du second signal qui prend part à l'induction de l'haustoriogenèse de cette plante parasite.

### 1. Développement de l'outil microcal pour la validation fonctionnelle de gènes intégrateurs du signal haustoriogène

Nos travaux sur l'haustoriogenèse de *P. ramosa* nous ont amené dans un premier temps à réfléchir au développement d'un modèle efficace pour des approches de génétique fonctionnelle. Nous avons ainsi mis au point un protocole permettant d'obtenir des microcals infectieux formés à partir de graines germées de *P. ramosa* utilisés, pour étudier le développement de l'haustorium en évaluant de manière efficace l'agressivité de ces derniers vis-à-vis de d'une plante hôte, ici la tomate. L'avancée majeure, par rapport aux travaux antérieurs (Fernández-Aparicio *et al.*, 2011; Goyet *et al.*, 2017; Libiaková *et al.*, 2018), fut d'améliorer significativement le succès d'accrochage des cals en utilisant des cals juvéniles (microclas) et en exploitant l'activité haustoriogène des CK par un prétraitement des microcals (Billard *et al.*, 2020). Ces derniers montrent un profil transcriptomique de réponse aux CK similaire à celui des graines de *P. ramosa*, avec notamment l'accumulation de transcrits correspondant à des gènes marqueurs des CK et de différenciation cellulaire. Par ailleurs, un pré-traitement par la *c/tZ* de ces microcals permet d'augmenter d'un facteur 4 l'agressivité (taux d'accrochage sur les racines de la plante hôte) de ces derniers par rapport aux microcals



non traités. Ces microcals ainsi fixés sont par la suite capables d'accomplir un cycle de vie complet en développant des hampes florales productrices de grandes quantités de graines viables (capacité à germer en réponse au GR24). Ce modèle constitue donc un outil prometteur pour envisager des analyses de validation fonctionnelle de gènes candidats impliqués dans l'haustoriogenèse de *P. ramosa* en réponse notamment aux CK. Ces gènes correspondent à des régulateurs putatifs majeurs du développement de la plante parasite qui ont pu être identifiés par Goyet *et al.* (2017) et confirmés dans cette étude. Notamment, *PrTRN2* qui s'avère être un acteur décisif de l'haustoriogenèse en étant régulé par deux voies de signalisation impliquées dans la formation des EHS, ainsi que *PrZFP6* qui serait engagé, quant à lui, uniquement dans la voie CK dépendante. Ces gènes pourraient ainsi être utilisés dans une approche d'édition ciblée du génome via CRISPR-Cas9 qui permettrait de vérifier l'implication de ces gènes dans l'induction du développement haustorial (Doudna and Charpentier, 2014). Cette stratégie a déjà été utilisée efficacement pour éditer le génome de nombreux organismes incluant les lignées cellulaires humaines, les modèles zebrafish et souris et plus récemment les plantes modèles (*Arabidopsis*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*) et les plantes cultivées (*Zea mays*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum*, *Solanum lycopersicum*, *Sorghum bicolor*) (Cho *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2013b; Nekrasov *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2013; Belhaj *et al.*, 2015).

La mise au point d'un protocole de transformation génétique des microcals en déterminant notamment quelles souches d'*Agrobacterium* (*tumefaciens* et *rhizogenes*) sont les plus efficaces est un prérequis nécessaire pour envisager une telle approche. L'utilisation de souches d'*Agrobacterium* avec des niveaux de virulence variables peut en effet influencer le pourcentage de réussite de transformation, mais aussi affecter le développement de la plante si la virulence de la souche est trop importante.

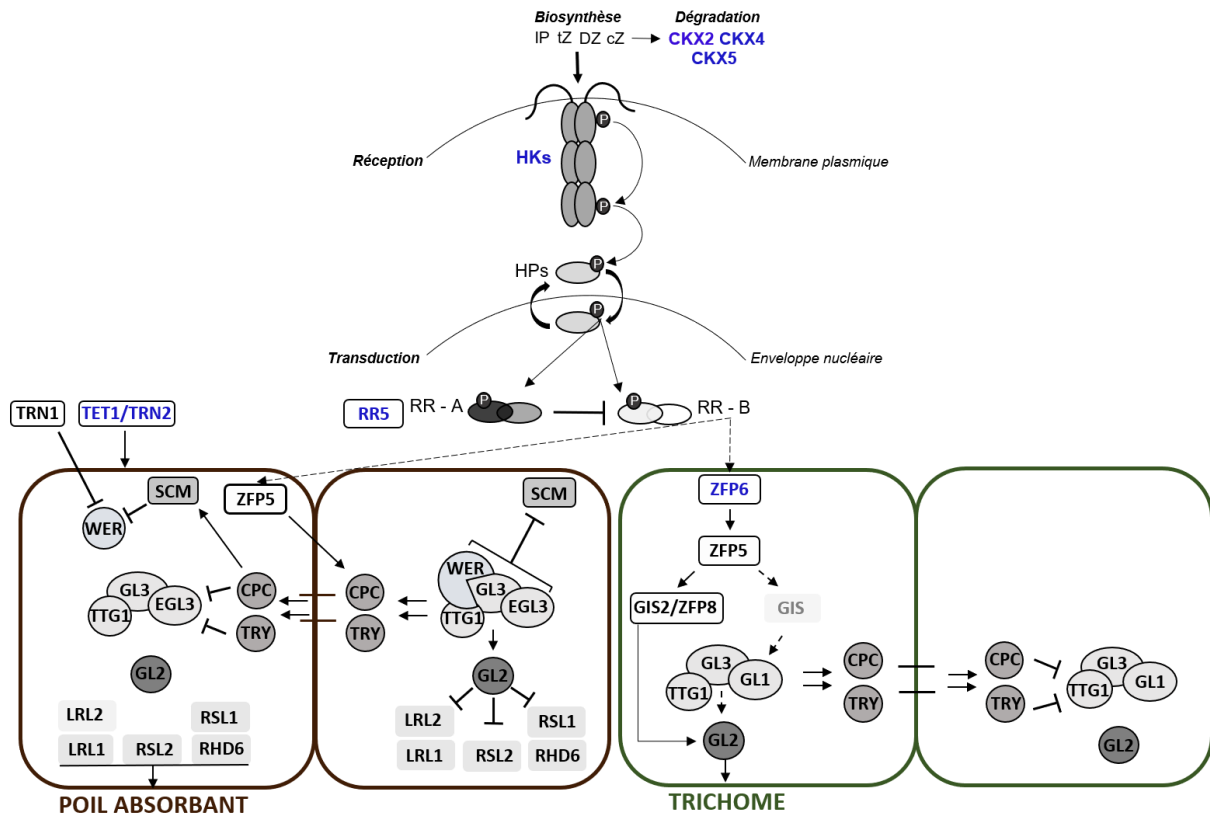
De même, une autre condition pour ces analyses est de connaître et d'évaluer le potentiel du système CRISPR-Cas9 à induire une mutagenèse ciblée dans les microcals de *P. ramosa*. Chez les plantes comme *A. thaliana* ou *O. sativa* chez lesquelles la technologie Crispr-Cas9 a été utilisée avec succès, l'efficacité de la transformation a pu être évaluée à plus de 90% en déterminant notamment le pourcentage de plantes régénérées comprenant les mutations (Belhaj *et al.*, 2015). Cependant, le choix du stade de développement de la plante lors de la transformation apparaît fondamental et influence le succès de transformation. Par exemple, les étapes précoces de l'embryogenèse, avant que la cellule ne se divise, ne permettent pas toujours d'avoir des individus homozygotes pour la mutation (Belhaj *et al.*, 2015). Il est donc indispensable de vérifier l'obtention d'individus homogènes génétiquement afin d'envisager des analyses de phénotype de perte de fonction. Les microcals d'orobanche sont issus de graines germées correspondant à des racines différenciées, qui sont donc des structures



pluricellulaires. L'utilisation de ce stade de développement lors d'expériences de transformation génétique pourrait ainsi être une source importante de chimérisme. Nous pourrions ainsi envisager de transformer *P. ramosa* à une étape plus précoce comme par exemple au moment de la protrusion de la radicule, avant même d'induire la formation de microcals. Ces paramètres ont notamment été avancés dans ce sens par Endo *et al.* (2015), qui après avoir obtenus des cals transgéniques de riz grâce à l'outil CRISPR-Cas9, ont suggéré que les stades prématurés de la formation des cals pouvaient être plus favorables pour prévenir les mutations en dehors des cibles choisies. Ainsi, l'effet de la mutation induite par CRISPR-Cas9 pourrait être évaluée dans un premier temps sur la génération de microcals F0, directement infectés par *Agrobacterium*. Il est toutefois probable que la production de microcals de génération F1 ou F2 (produits à partir de graines de plantes de génération F1 et F2), soit nécessaire pour s'affranchir efficacement d'effets de chimérisme et obtenir des microcals puis des graines entièrement transgéniques. Une telle approche serait de plus rendue possible par le fait que les modifications générées par CRISPR-Cas9 semblent être héréditaires de manière stable sur plusieurs générations (Feng *et al.*, 2014). Plusieurs études ont cependant montré des disparités dans le pourcentage de transformants générés sur différentes générations chez *Arabidopsis* et le riz (*O. sativa*). Notamment le système CRISPR-Cas9 apparaît très efficace pour induire des mutations uniformes dès la génération T0 de cals chez le riz, mais des taux de transformants moins importants ont été révélés pour la génération T1, tandis que la production de transformants de génération T1, T2 voire T3 s'est avérée efficace pour les plants d'*Arabidopsis* (Feng *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2015). Ainsi, un long travail demeure mais le développement d'un outil génétique chez *P. ramosa* reste une nécessité et une priorité pour approfondir nos connaissances sur la biologie, et notamment le développement haustorial, des holoparasites épirhizes.

## **2. Les structures haustoriales précoces correspondent à des poils racinaires spécialisés mettant en jeu des acteurs moléculaires communs**

Dans un second temps, les travaux réalisés dans cette étude ont permis une avancée notable dans la compréhension des mécanismes moléculaires conduisant à la formation des EHS chez *P. ramosa* sous l'action des CK. En particulier, nous avons montré que ces mécanismes font appel à des acteurs moléculaires déjà identifiés chez les plantes autotrophes comme étant impliqués dans la formation des poils absorbants et des trichomes (*ZFP6*, *TRN2*). De par leur origine et leur structure, les papilles et les poils haustoriaux des plantes parasites sont en effet similaires aux poils racinaires et aux trichomes des plantes autotrophes (Cui *et al.*, 2018a; Clarke *et al.*, 2019). Cui *et al.* (2016) ont ainsi démontré que les poils haustoriaux et les poils racinaires partageaient les mêmes programmes de développement, les mutants



**Figure 3.1. Acteurs moléculaires de la voie de différenciation des poils absorbants et des trichomes des plantes autotrophes impliquant une signalisation cytokinique.**

Les formes actives des CK sont perçues par les récepteurs HKs. Cette reconnaissance entraîne l'autophosphorylation des récepteurs avec le transfert du groupement phosphate à des phosphotransmetteurs (HPs). La transmission du groupement phosphate à des facteurs de transcriptions RR de type A induit un rétrocontrôle négatif des CK. La dégradation des CK sous forme active est permise par les enzymes CKXs. Les ARR-B permettent de réguler la transcription des gènes effecteurs des CK. C'est le cas du gène *ZFP6* qui induit *ZFP5* régulant positivement *GIS2/ZFP8* et active *GL2*, entraînant la différenciation des trichomes. Le gène *TRN2* participe à la différenciation des poils absorbants. Le complexe *TTG1/GL3/EGL3* associé à *WER* induit l'expression de *GL2*, un régulateur négatif de la formation des poils absorbants. La formation de ce complexe est perturbée par l'action des protéines *CPC* et *TRY* et de *SCM* et *TRN1* dans les cellules formant des poils absorbants. Les acteurs moléculaires identifiés dans cette étude comme étant impliqués dans la formation des EHS de *P. ramosa* en réponse aux CK sont en bleu. CKXs : Cytokinine Oxydases, HKs : Histidines Kinases, HPs : Histidines Phosphotransfers, RR-B/A : Response Regulator de type B ou A. RR5 : Response Regulator 5, *ZFP6* : Zinc Finger Protein 6, *ZFP5* : Zinc Finger Protein 5, GIS : Glabrous Inflorescence Stems, GIS2 : Glabrous Inflorescence Stems2, *ZFP8* : Zinc Finger Protein 8, *GL2* : Glabrous2, *GL1* : Glabrous1, *TTG1* : Transparent Testa Glabra 1, *GL3/EGL3* : Glabra3/Enhancer of Glabra3, *CPC* : Caprice, *TRY* : Triptychon, *WER* : Werewolf, *TRN1* : Tornado 1, *TRN2* : Tornado 2, *SCM* : Scrambled

de l'hémiparasite *P. japonicum hhd1* et *hhd2* étant affectés à la fois dans la formation des poils haustoriaux et des poils racinaires. Ces derniers sont caractérisés par une architecture dirigée pour l'absorption efficace des nutriments, tandis que les EHS des plantes parasites sont spécialisées pour faciliter l'attachement aux racines hôtes et l'invasion de ces dernières (Grierson and Schiefelbein, 2002; Cui *et al.*, 2018a). La principale différence avec les poils racinaires réside effectivement dans la sécrétion à l'apex des poils haustoriaux de substances adhésives et d'enzymes de digestion des parois (Yoshida *et al.*, 2016). Pour autant, l'origine commune de ces deux types de structures relève d'un intérêt particulier qui permettrait d'en apprendre plus sur les EHS des plantes parasites en explorant notamment les connaissances acquises sur le développement des poils absorbants et aussi des trichomes.

Ainsi *ZFP6* et *TRN2* ont été identifiés comme des acteurs moléculaires impliqués dans la formation des poils absorbants ou les trichomes des plantes autotrophes et également des EHS de *P. ramosa*. Le gène *ZFP6* est notamment connu chez les plantes autotrophes pour prendre part au développement cellulaire des trichomes sous le contrôle des CK (Zhou *et al.*, 2013; Pattanaik *et al.*, 2014). L'intégration du signal CK débute ainsi avec *ZFP6* qui intervient en amont du gène *ZINC FINGER PROTEIN 5 (ZFP5)* régulant à son tour *GLABROUS INFLORESCENCE STEMS (GIS)* ou les gènes *GLABROUS INFLORESCENCE STEMS2 (GIS2)* et *ZINC FINGER PROTEIN 8 (ZFP8)* (**Figure 3.1**). Ces derniers codent pour des facteurs de transcription C2H2 qui activent directement le déterminant de la formation des trichomes, *GLABRA2 (GL2)*. En parallèle, *GIS* est capable d'activer le complexe formé par *GLABROUS1 (GL1)*, *TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1)* et *GLABRA3/ENHANCER OF GLABRA3 (GL3/EGL3)* qui à leur tour activent *GL2* (**Figure 3.1**). Ce complexe permet également d'activer des protéines de la famille des R2R3 MYB et R3 MYB incluant notamment *CAPRICE (CPC)* et *TRIPTYCHON (TRY)*, qui agissent comme des répresseurs de l'initiation des trichomes et des poils absorbants (Kryvych *et al.*, 2008; Bruex *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2013; Pattanaik *et al.*, 2014; Matías-Hernández *et al.*, 2016). Il serait ainsi intéressant de vérifier si la cascade de régulation en aval de *PrZFP6* implique les mêmes acteurs et notamment les facteurs de transcriptions *GIS2* ou *GL2* au cours de la formation des EHS chez *P. ramosa*. Goyet (2017) ont montré au cours d'une analyse transcriptomique que certains gènes impliqués dans cette voie de signalisation comme *GL1* étaient effectivement différentiellement exprimés en réponse aux extraits rhizosphériques de colza. Par ailleurs, le complexe *TTG1-GL3/EGL3* qui a un rôle dans la formation des trichomes est également impliqué dans la formation des poils absorbants (**Figure 3.1**). Lorsqu'il est complexé avec la protéine *WEREWOLF (WER)*, ce groupement est responsable de la formation des cellules sans poils absorbants (atrichoblaste) en activant la surexpression de *GL2* dans cette cellule. Le complexe de transcription *TTG1-GL3/EGL3-WER* induit également l'action de *CPC* et *TRY*



qui migrent dans la cellule voisine et perturbent la formation de ce même complexe. Il en résulte que le gène *GL2* de cette cellule n'est pas exprimé, permettant ainsi d'engager la formation des poils absorbants dans cette cellule (trichoblaste) (Tominaga-Wada and Wada, 2014; Lin *et al.*, 2015; Chen and Schmidt, 2015; Salazar-Henao *et al.*, 2016). Par ailleurs dans la cellule trichoblaste, le récepteur SCRAMBLED (SCM) permet de réguler négativement l'expression de *WER* et empêcherait donc la formation du complexe TTG1-GL3/EGL3-WER (Salazar-Henao *et al.*, 2016). L'expression de *WER* serait également dépendante de la TETRASPANIN 1 (TRN1), étroitement liée à TRN2, qui interviendrait dans un mécanisme de régulation indépendant de SCM (Kwak *et al.*, 2015). Il serait donc aussi intéressant d'évaluer l'implication de TRN2 à ce niveau au cours de la formation des EHS chez *P. ramosa*.

L'ensemble des effecteurs présentés ici participent donc à la formation des structures différenciées chez les plantes autotrophes en incluant les acteurs moléculaires identifiés lors de l'haustoriogenèse chez *P. ramosa* *ZFP6* et *TRN2*. Ces gènes constitueraient donc de nouvelles pistes à explorer pour continuer d'expliquer les voies de régulation qui participent à l'haustoriogenèse chez *P. ramosa*. La signalisation mettant en jeu les CK exsudées par la plante hôte pourrait ainsi être étudiée d'une part par une approche transcriptomique utilisant un séquençage NGS (RNA-seq) de graines non germées et germées de *P. ramosa* traitées avec des CK et d'autre part avec une analyse bio-informatique des réseaux de gènes impliqués. Dans l'ensemble, ces rapprochements avec les poils racinaires des plantes autotrophes permettraient d'élucider les facteurs moléculaires responsables de la spécialisation des EHS et d'en apprendre plus sur l'évolution entre ces deux structures.

### **3. Les CK agissent comme des molécules de signalisation plante-plante dans la rhizosphère et induisent la formation de l'haustorium chez *P. ramosa***

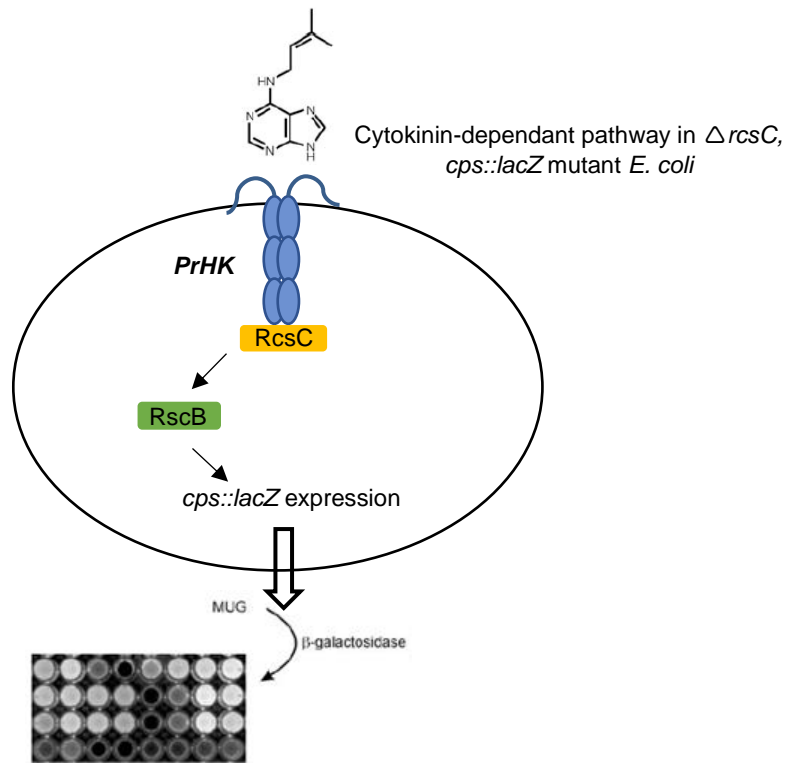
Les résultats obtenus au cours cette thèse montrent que les CK à activité haustoriogène proviennent de la plante hôte. La caractérisation de différents mutants et lignée transgénique a démontré que les extraits, et en particulier la fraction 9 issue de ces derniers, présentaient une activité haustoriogène significativement réduite par rapport à celle de l'écotype sauvage. Ces résultats mettent ainsi en lumière le rôle des CK en tant que molécules signal au sein de la rhizosphère. Si l'exsudation des CK semble ici défavorable pour les plantes hôtes en stimulant l'haustoriogenèse de *P. ramosa*, ces composés sont toutefois bénéfiques pour la mise en place de symbioses avec les microorganismes de la rhizosphère (Stirk and Van Staden, 2010). *P. ramosa* semble ainsi avoir détourné un signal CK existant au sein de la rhizosphère pour déclencher la mise en place de son organe parasite, à l'instar des strigolactones, favorisant la mycorhization et stimulant sa germination (Yoneyama *et al.*, 2009; Cavar *et al.*, 2015).



Il serait nécessaire de préciser encore plus avant les mécanismes contrôlant cette exsudation, en caractérisant un ensemble plus exhaustif de mutants d'*A. thaliana* invalidés à différentes étapes du métabolisme des CK. Des mutants pour d'autres transporteurs des CK comme les ENT (equilibrative nucleoside transporters) ou les ABCG (sous-famille G des transporteurs à ATP-binding cassette) pourraient ainsi être utilisés, mais aussi d'autres acteurs de la voie de biosynthèse impliquant les LOG (Sun *et al.*, 2005; Ko *et al.*, 2014). En effet, malgré la diminution significative de l'induction de la formation de l'haustorium, les extraits rhizosphériques de *log4* et de 35S:CKX2 n'ont toutefois pas permis de visualiser une abolition complète de l'activité haustoriogène. En raison d'une redondance fonctionnelle des protéines LOG et des CKX, il serait alors intéressant de tester des mutants multiples tels que le triple mutant *log3/log4/log7* dont la modification phénotypique et du contenu en CK est encore plus drastique (Tokunaga *et al.*, 2012).

Il serait également intéressant d'identifier et de quantifier les CK présentes dans les extraits rhizosphériques des plants mutants et transgéniques en comparaison avec ceux de Col-0. Ceci permettrait d'observer si des changements qualitatifs et quantitatifs provoqués par l'altération de la voie des CK se produisent. De nombreux composés CK ont en effet été détectés dans les extraits de l'écotype sauvage Col-0. Il apparaît, en particulier, qu'un pool de CK constitué de *tZ*, *cZ* et DHZ représente l'activité haustoriogène de la fraction 9 notamment au travers de proportions relatives précises de ces composés. De nouvelles analyses d'identification et de quantification des CK englobant ces mutants CK permettraient ainsi de confirmer ce point.

D'autre part, les masses des racines récoltées à la fin de nos expérimentations d'exsudation a suggéré une différence phénotypique entre l'écotype sauvage Col-0 et les différents mutants. Afin de prendre en compte ce paramètre, nous avons choisi de corriger nos données d'activité haustoriogène par l'application d'un facteur correspondant au ratio du volume d'extraits récoltés (L) sur la masse racinaire sèche totale (g) obtenue en fin de culture. Cette méthode a toutefois montré qu'elle pouvait induire un léger biais, notamment au moment de la récolte des racines très fines dans un substrat aggloméré. D'autres méthodes de normalisation des résultats d'activité haustoriogène pourraient donc être envisagées. Le dosage d'un composé exsudé de façon constitutive par la plante et dont l'exsudation n'est pas dépendante de la voie des CK tel que des sucres (mannitol, arabinose), des acides gras (acide stéarique, acide oléique), ou des acides organiques tels que l'acide malique très présents dans les extraits rhizosphériques, pourrait ainsi permettre de donner une image plus précise de l'activité d'exsudation basale et nous permettrait de mieux normaliser nos résultats (Vančura and Hovadík, 1965; Badri and Vivanco, 2009).



**Figure 3.2. Système hétérologue pour l'expression des récepteurs HK avec les souches mutantes d'*E. coli* ( $\Delta rcsC$ , *cps::lacZ*) (d'après Spíchal, 2011).**

La perception du signal cytokinin par les récepteurs entraîne la phosphorylation de l'élément Hpt YojN avec la transmission du signal au régulateur de réponse RcsB qui active l'opéron *cps*. L'activation des récepteurs HK par les CK peut être quantifiée par dosage fluorimétrique utilisant le substrat MUG (4-méthyl-ombelliféryl galactoside) de la beta-galactosidase.

Si cette étude a permis de confirmer que les CK inductrices de la formation des structures précoces de l'haustorium présentes dans la rhizosphère sont bel et bien exsudées par la plante hôte, elle ouvre également de nouvelles voies de recherche dans la compréhension du dialogue rhizosphérique entre la plante hôte et la plante parasite *P. ramosa*. En particulier, le succès de l'établissement de la plante parasite sur la plante hôte dépend donc de la détection de ces composés dans la rhizosphère.

#### 4. Evaluation de l'affinité des CK à activité haustoriogène pour les récepteurs HK

Comme en témoigne le traitement simultané de la fraction 9 avec un inhibiteur de la perception des CK, le Pi-55, qui entraîne une diminution de l'activité haustoriogène de cette fraction, la perception des CK exsudées par les plantes hôtes par les récepteurs HK de *P. ramosa* est un élément fondamental pour l'haustoriogénèse chez ce parasite. En outre, des particularités des récepteurs HK des plantes parasites ont été mises en évidence. Ainsi, seuls deux des trois récepteurs HK identifiés chez les plantes autotrophes (HK3 et HK4) sont présents chez les plantes parasites comme *P. ramosa* et *O. cumana*. L'absence du récepteur HK2 a ainsi été observée chez l'ensemble des plantes parasites dont le transcriptome est accessible, incluant *S. hermonthica* ou *P. aegyptiaca*. Une telle absence pourrait être considérée comme une spécificité des plantes parasites et potentiellement une adaptation au mode de vie parasitaire. Une telle adaptation est par ailleurs également suggérée par l'analyse phylogénétique des domaines CHASE des récepteurs HK qui a démontré que les séquences CHASE HK3 et HK4 sont conservées au sein des plantes parasites par rapport aux plantes autotrophes, mais également que des spécificités résident entre les récepteurs HK3 et HK4 au niveau de ces domaines de liaisons aux CK.

Nos résultats ont ainsi démontré que l'haustoriogénèse chez *P. ramosa* déclenchée par les CK fait intervenir les mêmes processus de perception des CK que chez les plantes autotrophes en impliquant les récepteurs HK3 et HK4. Puisque les CK à activité haustoriogène ont des propriétés spécifiques entraînant des niveaux d'affinité différents selon les récepteurs, il serait intéressant de déterminer quel récepteur est plus spécifiquement sollicité lors de la perception des CK haustoriogènes. Afin de répondre à cette question, l'utilisation d'un système bactérien permettant de produire les protéines réceptrices HK couplées à un rapporteur serait à envisager (**Figure 3.2**; Yamada *et al.*, 2001; Spíchal *et al.*, 2004; Romanov *et al.*, 2006; Spíchal, 2011). Ce système d'expression nous permettrait ainsi non seulement d'identifier le ou les récepteurs impliqué(s) dans la perception du signal haustoriogène mais également d'évaluer la sensibilité des récepteurs HK3 et HK4 de *P. ramosa* aux CK haustoriogènes identifiées dans les extraits racinaires d'*A. thaliana*.



Ce travail a déjà été amorcé en fin de ces travaux de thèse en insérant les séquences codantes des gènes *HK* de *P. ramosa* et *O. cumana*, préalablement clonées, dans le plasmide permettant l'expression des protéines réceptrices en système bactérien (Suzuki *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2001; Spíchal, 2011). Les analyses pourront être ensuite poursuivies en collaboration avec le Laboratory of Growth Regulators (LGR, Université de Palacký, Olomouc, République tchèque).

En complément de ces expérimentations, il serait par ailleurs intéressant de réaliser des tests *in silico* afin d'évaluer l'affinité des récepteurs de *P. ramosa* et d'*O. cumana* pour les CK. Plus particulièrement, des simulations d'amarrage moléculaire (docking moléculaire) des CK à activité haustoriogène identifiées dans la fraction 9, comme la *tZ*, la *cZ* ou la *DHZ*, pourraient être réalisées sur une structure cristalline des récepteurs prédite à partir des séquences clonées dans cette étude. En utilisant une approche similaire, la modélisation biochimique de l'interaction entre les CK et les récepteurs HK d'*Arabidopsis* et de *S. tuberosum* par Arkhipov *et al.* (2019) a permis d'identifier des résidus d'acides aminés spécifiquement impliqués dans l'interaction. Par des approches de modélisation, Hothorn *et al.* (2011) ont également pu préciser la façon dont l'iP se lie à AHK4 en insérant sa partie adénine mais également sa chaîne isopentenyl dans la cavité formée par le domaine CHASE. Les contacts entre le domaine CHASE d'AHK4 et les différentes CK semblent également être médiés par l'aspartate (Asp) Asp262 et la thréonine (Thr) Thr294, qui assurent ainsi le bon fonctionnement de la liaison des composés avec le récepteur (Hothorn *et al.*, 2011). Ainsi, les résultats issus de ces expériences de modélisation permettront de compléter l'approche *in vivo* et *in vitro* en déterminant le mode de liaison optimal de ligands spécifiques de PrHK3 et PrHK4. *P. ramosa* présente différentes affinités pour les CK, ce qui se traduit par différents niveaux d'activité haustoriogène (**Figure 2.16**). Aussi, la façon dont les récepteurs impliqués sont capables de distinguer non pas une mais un ensemble de CK est particulièrement intrigante. Un prérequis pour réaliser ce projet est d'établir un inventaire de la structure et de l'activité des CK à activité haustoriogène (SAR) pour valider le mode de liaison de ces stimulants sur les protéines réceptrices HK. Cette première phase permettrait également de déterminer les groupements chimiques essentiels à l'activité haustoriogène. Dans un deuxième temps, ces groupements chimiques peuvent être combinés pour générer une chimiothèque virtuelle dédiée qui peut elle aussi être criblée. L'analyse de ces criblages virtuels aurait pour but de déterminer les spécificités de ligands dans le processus d'induction de l'haustoriogénèse. Une telle approche a été menée par Hothorn *et al.* (2011) et a permis de préciser que les CK reconnues pour AHK4 étaient pourvues entre autres d'une structure cyclique plane déterminante pour établir une liaison spécifique avec ce récepteur. En parallèle, pour enrichir la diversité des molécules à envisager, des chimiothèques publiques peuvent également être criblées à grande échelle,



en s'appuyant sur les infrastructures de calcul du CCIPL (Centre de Calcul Intensif des Pays de la Loire). Les ligands présentant des propriétés intéressantes *in silico* ainsi déterminés pourront ensuite être testés *in vitro* selon leur disponibilité commerciale et/ou en synthèse.

Ces résultats soulèvent également d'autres questions. Notamment si l'on considère la diversité génétique des plantes parasites ; est-ce que les mêmes niveaux d'affinités des HK pour les CK sont observés chez différentes populations de *P. ramosa* récoltées sur d'autres plantes hôtes. En effet, la caractérisation génétique et phénotypique réalisée par Stojanova *et al.* (2019) a mis en évidence trois principaux génotypes de *P. ramosa* en France, avec des comportements différents en fonction des extraits rhizosphériques des plantes hôtes (tabac, chanvre, tomate). Il pourrait donc être intéressant de tester l'activité haustoriogène des CK sur d'autres génotypes de *P. ramosa*. Il conviendrait en particulier de vérifier s'il existe des différences entre les affinités des récepteurs HK de différents génotypes pour les CK. En effet, il a déjà été démontré que les réponses des groupes génétiques de *P. ramosa* aux stimulants de germination (énantiomères du *rac*-GR24 et 2-PEITC) sont très spécifiques (Stojanova *et al.*, 2019). La mise en évidence de telles affinités différentielles pour les CK permettraient ainsi de révéler des processus d'adaptation et de spécialisation moléculaires des différents génotypes de *P. ramosa* pour un type d'hôte particulier. De telles connaissances, qui nous permettraient alors de mieux comprendre les mécanismes qui déterminent la reconnaissance ou la préférence pour un hôte, sont essentielles pour envisager des méthodes de contrôle efficaces de ces plantes parasites.

## 5. Crosstalk phytohormonal des CK haustoriogènes

Le décryptage de la voie de signalisation des CK au sein de la plante parasite conduisant à la formation des EHS serait également l'occasion d'étudier les interactions possibles avec d'autres phytorégulateurs connus pour affecter la communication entre la plante hôte et la plante parasite tels que les auxines, l'éthylène, l'acide abscissique ou les strigolactones (Bouwmeester *et al.*, 2007). En mettant l'accent sur l'interaction hormonale entre la plante hôte et la plante parasite en tant que dialogue écologique important au sein de la rhizosphère, ce travail pourrait ainsi apporter un éclairage nouveau sur la régulation de cette interaction.

L'interaction de la signalisation mettant en jeu les CK avec des phytohormones comme les strigolactones pourrait être étudiée au cours du développement haustorial en s'appuyant sur des approches de séquençage NGS (RNA-seq) utilisant des graines germées de *P. ramosa* traitées avec les CK simultanément ou non avec d'autres phytohormones. Une analyse bio-informatique des réseaux de gènes impliqués serait également judicieuse pour mettre en évidence les relations entre les cascades transcriptionnelles activées par ces phytohormones.

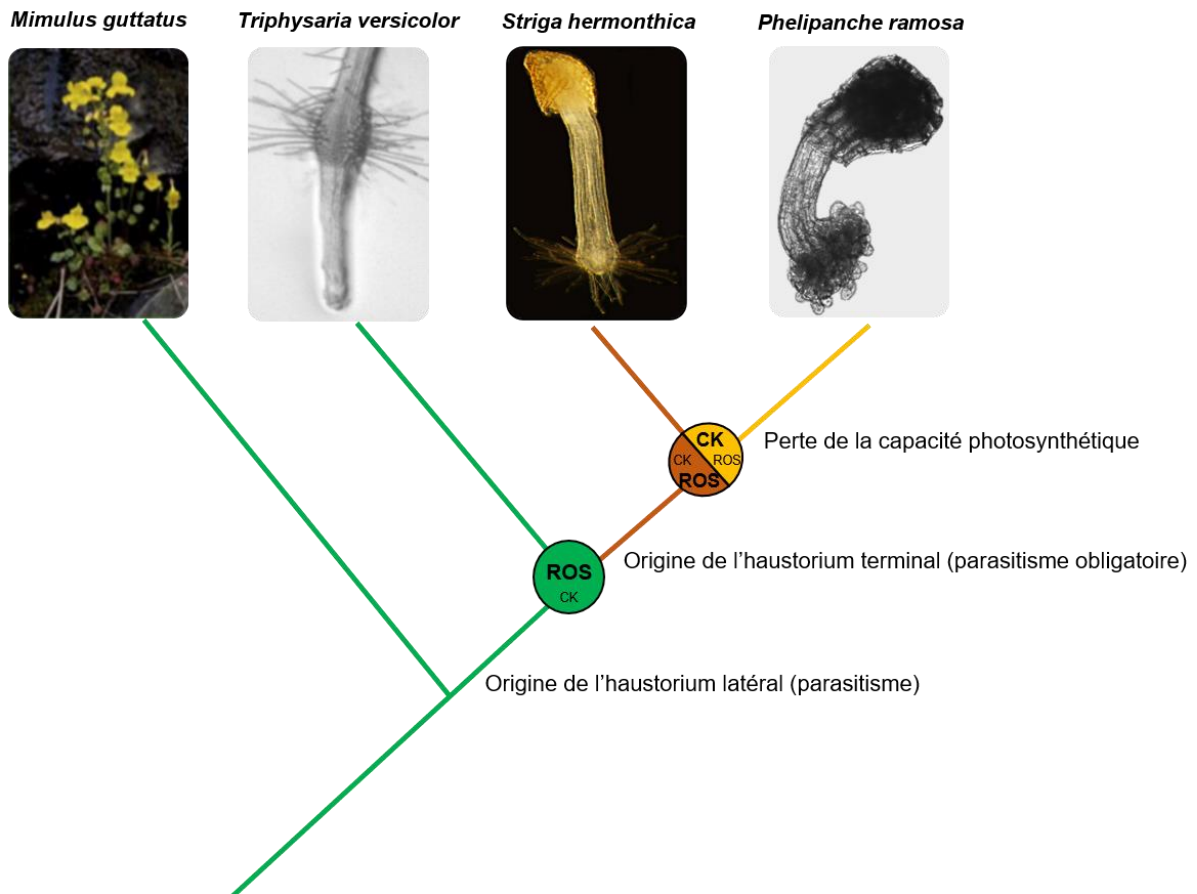


Les strigolactones (SL) sont en effet connues pour être exsudées par la plante hôte à l'instar des CK et induisent la levée de dormance puis la germination des graines de *P. ramosa* (Brun *et al.*, 2019). Le processus de germination comprend ainsi une élévation de la radicule tandis que les CK contribuent à l'arrêt de l'élévation avec la différenciation des cellules épidermiques pour la mise en place des papilles haustoriales. Il a notamment été démontré chez *A. thaliana* que le récepteur des CK, AHK3 et les régulateurs de réponses ARR1 et ARR2 interagissent spécifiquement avec des composants de la voie de signalisation des strigolactones pour moduler le développement des racines latérales via des changements probables du transport de l'auxine (Jiang *et al.*, 2016). Ces deux phytohormones (CK, SL) fonctionnent donc de manière antagoniste pour les deux étapes clés de la vie de la plante parasite, et l'interférence entre ces deux voies de signalisation moléculaires serait donc intéressante à explorer.

## 6. Crosstalk entre les voies de signalisations F9 et F16

Enfin à travers ces travaux de thèse, nous avons démontré que les extraits rhizosphériques de *B. napus*, *S. lycopersicum* et *A. thaliana* contenaient des composés allélochimiques haustoriogènes distincts des CK au sein de la fraction 16. Ces composés tout comme les CK présentes dans la fraction 9 s'avèrent essentiels pour *P. ramosa* en étant capables d'induire la formation des EHS sur des graines germées de la plante parasite et en augmentant par conséquent l'agressivité du parasite envers sa plante hôte. Par ailleurs, les composés de deux fractions 9 et 16 ont un effet additif en contribuant ensemble à augmenter l'activité haustoriogène des extraits rhizosphériques. La présence de ce second signal haustoriogène est particulièrement intrigante et pose de nombreuses questions quant à l'identité des composés impliqués mais également quant à la régulation connexe qui peut exister avec les CK haustoriogènes.

Afin de préciser ces interactions possibles, une étude transcriptomique plus globale pourrait être conduite sur des graines germées de *P. ramosa* traitées avec les fractions 9 et 16 des extraits rhizosphériques d'*A. thaliana*, seules ou combinées, afin d'établir des réseaux de gènes impliqués dans ces réponses. Une telle approche nous renseignerait plus précisément sur la cascade de signalisation empruntée par les molécules contenues dans ces fractions et sur leurs interactions possibles. Un tel travail pourrait ainsi être mené en collaboration avec l'équipe de recherche de Biomolécules et Biotechnologies Végétales (Université de Tours) qui ont mis au point un algorithme de prédiction des réseaux de gènes comprenant environ 9000 analyses transcriptomiques des CK (Liesecke *et al.*, 2018). Cet algorithme permet ainsi d'analyser les corrélations entre transcrits et de classer les gènes, ce qui devrait permettre de



**Figure 3.3. Evolution de la capacité à percevoir les molécules inductrices d'EHS (d'après Westwood et al., 2010).**

L'acquisition de l'haustorium latéral puis terminal et la perte de la capacité à réaliser la photosynthèse, marquent les étapes de la vie parasitaire entre les hémiparasites facultatives, obligatoires puis les holoparasites. La formation des EHS est inductible par les composés phénoliques induisant une signalisation ROS chez les plantes hémiparasites facultatives (*T. versicolor*) et obligatoires (*S. hermonthica*). Les CK induisent la formation de structures semblables aux EHS chez les plantes hémiparasites et constituent l'HIF principal de l'holoparasite *P. ramosa* avec la formation d'EHS fonctionnelles chez cette espèce. L'holoparasite de racine *P. ramosa* est capable de percevoir un second signal haustoriogène impliquant des ROS bien que modifié par rapport aux hémiparasites en ne permettant plus la détection des acides phénoliques simples et de leur forme quinone.

révéler plus précisément de nouveaux acteurs moléculaires impliqués dans la voie de réponse aux CK et à la fraction 16.

Ce travail serait à compléter par l'identification de la ou des molécules à activité haustoriogène contenue(s) dans la fraction 16. Ainsi, afin de poursuivre les analyses déjà engagées, il pourrait être envisagé dans un premier temps de purifier et d'isoler le pic d'intérêt de la fraction 16 pour confirmer son activité à travers un test d'induction haustoriogène sur des graines germées de *P. ramosa*. Une analyse RMN sur le pic purifié de la fraction 16 serait alors appropriée pour déterminer la structure fine de ce composé.

En dernier lieu, nous pouvons nous demander si les deux signaux haustoriogènes de ces fractions sont perçus de la même façon par les plantes hémiparasites obligatoires ou facultatives. En effet, d'un point de vue évolutif, le passage d'une plante hémiparasite facultative tel que *T. versicolor* à une plante hémiparasite obligatoire comme *S. hermonthica* est notamment marqué par l'apparition de l'haustorium terminal (**Figure 9**) (Westwood *et al.*, 2010). Toutefois, en dépit de la distinction morphologique qui existe entre ces deux groupes, les EHS se forment de la même façon en réponse à la détection de composés phénoliques provenant de l'hôte et qui initient une signalisation impliquant des ROS (Albrecht *et al.*, 1999; Wada *et al.*, 2019). A l'inverse, les plantes holoparasites telles que *P. ramosa* et *P. aegyptiaca*, distinctes des plantes hémiparasites obligatoires par la perte de la capacité à former des haustoria latéraux et à réaliser la photosynthèse, ne sont pas sensibles à ces composés phénoliques en tant qu'HIF (Westwood *et al.*, 2010; Goyet *et al.*, 2017). En revanche, les CK sont non seulement les acteurs majoritaires de l'induction haustoriale chez l'holoparasite *P. ramosa*, mais elles sont également capables d'induire des EHS chez les plantes hémiparasites facultatives (*T. versicolor*, *P. japonicum*) et obligatoires (*S. asiatica*) ainsi que chez l'épiphyte hémiparasite obligatoire *C. reflexa* (Wrobel and Yoder, 2001; Keyes *et al.*, 2001; Goyet *et al.*, 2017; Shimizu and Aoki, 2019). Les CK représenteraient donc une voie haustoriogène commune entre ces différentes plantes parasites, avec une spécialisation des plantes holoparasites comme *P. ramosa* pour la perception de ce signal haustoriogène. A supposer qu'une implication de certains ROS soit confirmée dans la signalisation liée à la fraction 16, ce second signal haustoriogène pourrait ainsi correspondre à une forme de conservation de la voie haustoriogène privilégiée par les plantes hémiparasites, bien qu'ayant été modifiée et ne permettant plus la détection des acides phénoliques simples et de leur forme quinone (**Figure 3.3**). Pour considérer ces hypothèses, nous pourrions élargir nos travaux sur l'haustoriogénèse induite par les CK à d'autres plantes holoparasites et hémiparasites. Des résultats très récents sur l'haustoriogénèse de l'holoparasite *O. cumana* obtenus au cours de la thèse de Sabine Tourneur, dirigée par le Pr. Philippe Delavault (LBPV, EA1157, Nantes) et le Dr. Jean-Philippe Combiér (LRSV, UMR 5546 UPS-CNRS, Toulouse), ont permis de



confirmer l'activité HIF des CK chez cette espèce. En outre, l'induction haustoriale par les CK a été également observée chez l'hémiparasite obligatoire *S. hermonthica*, avec les mêmes activités des CK que pour *P. ramosa* (**Annexe 2**). Ces résultats soutiendraient ainsi l'hypothèse de l'universalité des CK haustoriogènes pour les plantes parasites. Ces travaux ouvrent ainsi de nouvelles perspectives en adressant des questions évolutives sur l'haustoriogenèse des plantes parasites en lien avec l'adaptation au parasitisme.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



## Références bibliographiques

- Abbes Z, Kharrat M, Delavault P, Chaïbi W, Simier P.** 2009. Osmoregulation and nutritional relationships between *Orobanche foetida* and faba bean. *Plant Signaling & Behavior* **4**, 336–338.
- Agrios GN.** 2005. *Plant Pathology- 5th ed.* Academic Press,.
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H.** 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**, 824–827.
- Albrecht H, Yoder JI, Phillips DA.** 1999. Flavonoids Promote Haustoria Formation in the Root Parasite *Triphysaria versicolor*. *Plant Physiology* **119**, 585–592.
- Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI.** 2006. Role of Cytokinin and Auxin in Shaping Root Architecture: Regulating Vascular Differentiation, Lateral Root Initiation, Root Apical Dominance and Root Gravitropism. *Annals of Botany* **97**, 883–893.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403–410.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389–3402.
- Aly R, Cholakh H, Joel DM, Leibman D, Steinitz B, Zelcer A, Naglis A, Yarden O, Gal-On A.** 2009. Gene silencing of mannose 6-phosphate reductase in the parasitic weed *Orobanche aegyptiaca* through the production of homologous dsRNA sequences in the host plant. *Plant Biotechnology Journal* **7**, 487–498.
- Aly R, Dubey NK, Yahyaa M, Abu-Nassar J, Ibdah M.** 2014. Gene silencing of CCD7 and CCD8 in *Phelipanche aegyptiaca* by tobacco rattle virus system retarded the parasite development on the host. *Plant Signaling & Behavior* **9**, e29376.
- Antoniadi I, Plačková L, Simonovik B, Doležal K, Turnbull C, Ljung K, Novák O.** 2015. Cell-Type-Specific Cytokinin Distribution within the Arabidopsis Primary Root Apex. *The Plant Cell* **27**, 1955–1967.
- Argueso CT, Ferreira FJ, Kieber JJ.** 2009. Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant, cell & environment* **32**, 1147–1160.
- Argueso CT, Raines T, Kieber JJ.** 2010. Cytokinin signaling and transcriptional networks. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 533–539.
- Arhipov DV, Lomin SN, Myakushina YA, Savelieva EM, Osolodkin DI, Romanov GA.** 2019. Modeling of Protein–Protein Interactions in Cytokinin Signal Transduction. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 2096.
- Ashraf MF, Aziz MA, Kemat N, Ismail I.** 2014. Effect of cytokinin types, concentrations and their interactions on in vitro shoot regeneration of *Chlorophytum borivilianum* Sant. & Fernandez. *Electronic Journal of Biotechnology* **17**, 275–279.
- Atsatt PR.** 1973. Parasitic Flowering Plants: How Did They Evolve? *The American Naturalist* **107**, 502–510.
- Auge GA, Penfield S, Donohue K.** 2019. Pleiotropy in developmental regulation by flowering-pathway genes: is it an evolutionary constraint? *New Phytologist* **224**, 55–70.
- Auger B, Pouvreau J-B, Pouponneau K, Yoneyama K, Montiel G, Le Bizec B, Yoneyama K, Delavault P, Delourme R, Simier P.** 2012. Germination Stimulants of *Phelipanche ramosa* in the

Rhizosphere of *Brassica napus* Are Derived from the Glucosinolate Pathway. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**, 993–1004.

**Badri DV, Vivanco JM.** 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant, cell & environment* **32**, 666–681.

**Bai L, Zhou Y, Zhang X, Song C, Cao M.** 2007. Hydrogen peroxide modulates abscisic acid signaling in root growth and development in *Arabidopsis*. *Chinese Science Bulletin* **52**, 1142–1145.

**Baird WV, Riopel JL.** 1985. Surface characteristics of root and haustorial hairs of parasitic Scrophulariaceae. *Botanical Gazette* **146**, 63–69.

**Bandaranayake PCG, Filappova T, Tomilov A, Tomilova NB, Jamison-McClung D, Ngo Q, Inoue K, Yoder JI.** 2010. A Single-Electron Reducing Quinone Oxidoreductase Is Necessary to Induce Haustorium Development in the Root Parasitic Plant *Triphysaria*[C][W]. *The Plant Cell* **22**, 1404–1419.

**Bandaranayake PCG, Tomilov A, Tomilova NB, Ngo QA, Wickett N, dePamphilis CW, Yoder JI.** 2012. The TvPirin Gene Is Necessary for Haustorium Development in the Parasitic Plant *Triphysaria versicolor*. *Plant Physiology* **158**, 1046–1053.

**Bao YZ, Yao ZQ, Cao XL, Peng JF, Xu Y, Chen MX, Zhao SF.** 2017. Transcriptome analysis of *Phelipanche aegyptiaca* seed germination mechanisms stimulated by fluridone, TIS108, and GR24. *PLOS ONE* **12**, e0187539.

**Barkman TJ, McNeal JR, Lim S-H, Coat G, Croom HB, Young ND, dePamphilis CW.** 2007. Mitochondrial DNA suggests at least 11 origins of parasitism in angiosperms and reveals genomic chimerism in parasitic plants. *BMC Evolutionary Biology* **7**, 248.

**Bartrina I, Jensen H, Novák O, Strnad M, Werner T, Schmülling T.** 2017. Gain-of-function mutants of the cytokinin receptors AHK2 and AHK3 regulate plant organ size, flowering time and plant longevity. *Plant physiology* **173**, 1783–1797.

**Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Patron NJ, Nekrasov V.** 2015. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Current Opinion in Biotechnology* **32**, 76–84.

**Benková E, Hejátko J.** 2008. Hormone interactions at the root apical meristem. *Plant Molecular Biology* **69**, 383.

**Bennett JR, Mathews S.** 2006. Phylogeny of the parasitic plant family Orobanchaceae inferred from phytochrome A. *American Journal of Botany* **93**, 1039–1051.

**Bewley JD, Bradford K, Hilhorst H, nonogaki hiroyuki.** 2012. *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*. Springer Science & Business Media.

**Billard E, Goyet V, Delavault P, Simier P, Montiel G.** 2020. Cytokinin treated microcalli of *Phelipanche ramosa*: an efficient model for studying haustorium formation in holoparasitic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*.

**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.

**Boivin S, Fonouni-Farde C, Frugier F.** 2016. How Auxin and Cytokinin Phytohormones Modulate Root Microbe Interactions. *Frontiers in Plant Science* **7**.

**Borghi L, Kang J, Ko D, Lee Y, Martinoia E.** 2015. The role of ABCG-type ABC transporters in phytohormone transport. *Biochemical Society Transactions* **43**, 924–930.

**Bouwmeester HJ, Roux C, Lopez-Raez JA, Bécard G.** 2007. Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends in Plant Science* **12**, 224–230.

- Brandstatter I, Kieber JJ.** 1998. Two Genes with Similarity to Bacterial Response Regulators Are Rapidly and Specifically Induced by Cytokinin in Arabidopsis. *The Plant Cell* **10**, 1009–1019.
- Brault M, Maldiney R.** 1999. Mechanisms of cytokinin action. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**, 403–412.
- Bromham L, Cowman PF, Lanfear R.** 2013. Parasitic plants have increased rates of molecular evolution across all three genomes. *BMC Evolutionary Biology* **13**, 126.
- Bruex A, Kainkaryam RM, Wieckowski Y, et al.** 2012. A Gene Regulatory Network for Root Epidermis Cell Differentiation in Arabidopsis. *PLoS Genetics* **8**.
- Brugière N, Jiao S, Hantke S, Zinselmeier C, Roessler JA, Niu X, Jones RJ, Habben JE.** 2003. Cytokinin Oxidase Gene Expression in Maize Is Localized to the Vasculature, and Is Induced by Cytokinins, Abscisic Acid, and Abiotic Stress. *Plant Physiology* **132**, 1228–1240.
- Brun G, Thoiron S, Braem L, Pouvreau J-B, Montiel G, Lechat M-M, Simier P, Gevaert K, Goormachtig S, Delavault P.** 2019. CYP707As are effectors of karrikin and strigolactone signalling pathways in Arabidopsis thaliana and parasitic plants. *Plant, Cell & Environment* **42**, 2612–2626.
- Cao Z-Y, Sun L-H, Mou R-X, Zhang L-P, Lin X-Y, Zhu Z-W, Chen M-X.** 2016. Profiling of phytohormones and their major metabolites in rice using binary solid-phase extraction and liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1451**, 67–74.
- Carroll L.** 1871. *Through the Looking Glass* by Carroll, Lewis. Henry Altemus 1897, 209 pp.
- Ćavar S, Zwanenburg B, Tarkowski P.** 2015. Strigolactones: occurrence, structure, and biological activity in the rhizosphere. *Phytochemistry Reviews* **14**, 691–711.
- Cedzich A, Stransky H, Schulz B, Frommer WB.** 2008. Characterization of Cytokinin and Adenine Transport in Arabidopsis Cell Cultures. *Plant Physiology* **148**, 1857–1867.
- Chahtane H, Kim W, Lopez-Molina L.** 2017. Primary seed dormancy: a temporally multilayered riddle waiting to be unlocked. *Journal of Experimental Botany* **68**, 857–869.
- Chang M, Lynn DG.** 1986. The haustorium and the chemistry of host recognition in parasitic angiosperms. *Journal of Chemical Ecology* **12**, 561–579.
- Chang L, Ramireddy E, Schmölling T.** 2013a. Lateral root formation and growth of Arabidopsis is redundantly regulated by cytokinin metabolism and signalling genes. *Journal of Experimental Botany* **64**, 5021–5032.
- Chang N, Sun C, Gao L, Zhu D, Xu X, Zhu X, Xiong J-W, Xi JJ.** 2013b. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in Zebrafish embryos. *Cell Research* **23**, 465–472.
- Chen Y-H, Chao Y-Y, Hsu YY, Kao CH.** 2013. Heme oxygenase is involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced lateral root formation in apocynin-treated rice. *Plant Cell Reports* **32**, 219–226.
- Chen C-Y, Schmidt W.** 2015. The paralogous R3 MYB proteins CAPRICE, TRIPTYCHON and ENHANCER OF TRY AND CPC1 play pleiotropic and partly non-redundant roles in the phosphate starvation response of Arabidopsis roots. *Journal of Experimental Botany* **66**, 4821–4834.
- Chiu W-H, Chandler J, Cnops G, Van Lijsebettens M, Werr W.** 2007. Mutations in the TORNADO2 gene affect cellular decisions in the peripheral zone of the shoot apical meristem of Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology* **63**, 731–744.
- Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim J-S.** 2013. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology* **31**, 230–232.

- Clarke CR, Timko MP, Yoder JI, Axtell MJ, Westwood JH.** 2019. Molecular Dialog Between Parasitic Plants and Their Hosts. *Annual Review of Phytopathology* **57**, 279–299.
- Cnops G, Wang X, Linstead P, Montagu MV, Lijsebettens MV, Dolan L.** 2000. Tornado1 and tornado2 are required for the specification of radial and circumferential pattern in the Arabidopsis root. *Development* **127**, 3385–3394.
- Coic Y, Lesaint C.** 1975. Mineral and water nutrition of plants in advanced horticulture. *Doc. Tech. SCPA* **23**, 1–21.
- Cove D.** 2005. The Moss *Physcomitrella patens*. *Annual Review of Genetics* **39**, 339–358.
- Crane PR, Friis EM, Pedersen KR.** 1995. The origin and early diversification of angiosperms. *Nature* **374**, 27–33.
- Crepet WL, Niklas KJ.** 2009. Darwin's second "abominable mystery": Why are there so many angiosperm species? *American Journal of Botany* **96**, 366–381.
- Cui H, Hao Y, Kovtun M, Stolc V, Deng X-W, Sakakibara H, Kojima M.** 2011. Genome-Wide Direct Target Analysis Reveals a Role for SHORT-ROOT in Root Vascular Patterning through Cytokinin Homeostasis. *Plant Physiology* **157**, 1221–1231.
- Cui S, Suzaki T, Tominaga-Wada R, Yoshida S.** 2018a. Regulation and functional diversification of root hairs. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **83**, 115–122.
- Cui S, Wada S, Tobimatsu Y, Takeda Y, Saucet SB, Takano T, Umezawa T, Shirasu K, Yoshida S.** 2018b. Host lignin composition affects haustorium induction in the parasitic plants *Phtheirospermum japonicum* and *Striga hermonthica*. *New Phytologist* **218**, 710–723.
- Cui S, Wakatake T, Hashimoto K, Saucet SB, Toyooka K, Yoshida S, Shirasu K.** 2016. Haustorial Hairs Are Specialized Root Hairs That Support Parasitism in the Facultative Parasitic Plant *Phtheirospermum japonicum*. *Plant Physiology* **170**, 1492–1503.
- Dautel R, Wu XN, Heunemann M, Schulze WX, Harter K.** 2016. The Sensor Histidine Kinases AHK2 and AHK3 Proceed into Multiple Serine/Threonine/Tyrosine Phosphorylation Pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* **9**, 182–186.
- Delavault P, Montiel G, Brun G, Pouvreau J-B, Thoiron S, Simier P.** 2017. Chapter Three - Communication Between Host Plants and Parasitic Plants. In: Becard G, ed. *How Plants Communicate with their Biotic Environment*. *Advances in Botanical Research*. Academic Press, 55–82.
- dePamphilis CW, Young ND, Wolfe AD.** 1997. Evolution of plastid gene *rps2* in a lineage of hemiparasitic and holoparasitic plants: Many losses of photosynthesis and complex patterns of rate variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 7367–7372.
- Doudna JA, Charpentier E.** 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**.
- Dunand C, Crèvecoeur M, Penel C.** 2007. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. *New Phytologist* **174**, 332–341.
- Durán-Medina Y, Díaz-Ramírez D, Marsch-Martínez N.** 2017. Cytokinins on the Move. *Frontiers in Plant Science* **8**, 146.
- Duval B, Shetty K, Thomas WH.** 1999. Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. *Journal of Applied Phycology* **11**, 559.
- Edgar RC.** 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* **32**, 1792–1797.

- El-Showk S, Ruonala R, Helariutta Y.** 2013. Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development* **140**, 1373–1383.
- Endo M, Mikami M, Toki S.** 2015. Multigene Knockout Utilizing Off-Target Mutations of the CRISPR/Cas9 System in Rice. *Plant and Cell Physiology* **56**, 41–47.
- Estabrook EM, Yoder JI.** 1998. Plant-Plant Communications: Rhizosphere Signaling between Parasitic Angiosperms and Their Hosts. *Plant Physiology* **116**, 1–7.
- Feild TS, Brodribb TJ.** 2005. A unique mode of parasitism in the conifer coral tree *Parasitaxus ustus* (Podocarpaceae). *Plant, Cell & Environment* **28**, 1316–1325.
- Felsenstein J.** 1985. CONFIDENCE LIMITS ON PHYLOGENIES: AN APPROACH USING THE BOOTSTRAP. *Evolution; International Journal of Organic Evolution* **39**, 783–791.
- Feng Z, Mao Y, Xu N, Zhang B, Wei P, Yang D-L, Wang Z, Zhang Z, Zheng R, Yang L.** 2014. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 4632–4637.
- Fernández-Aparicio M, Flores F, Rubiales D.** 2009. Recognition of root exudates by seeds of broomrape (*Orobanche* and *Phelipanche*) species. *Annals of Botany* **103**, 423–431.
- Fernández-Aparicio M, Masi M, Maddau L, Cimmino A, Evidente M, Rubiales D, Evidente A.** 2016a. Induction of Haustorium Development by Sphaeropsidones in Radicles of the Parasitic Weeds *Striga* and *Orobanche*. A Structure–Activity Relationship Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **64**, 5188–5196.
- Fernández-Aparicio M, Reboud X, Gibot-Leclerc S.** 2016b. Broomrape Weeds. Underground Mechanisms of Parasitism and Associated Strategies for their Control: A Review. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Fernández-Aparicio M, Rubiales D, Bandaranayake PC, Yoder JI, Westwood JH.** 2011. Transformation and regeneration of the holoparasitic plant *Phelipanche aegyptiaca*. *Plant Methods* **7**, 36.
- Frébort I, Kowalska M, Hluska T, Frébortová J, Galuszka P.** 2011. Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2431–2452.
- Friedman WE.** 2009. The meaning of Darwin's "abominable mystery". *American Journal of Botany* **96**, 5–21.
- Furuhashi T, Furuhashi K, Weckwerth W.** 2011. The parasitic mechanism of the holostemparasitic plant *Cuscuta*. *Journal of Plant Interactions* **6**, 207–219.
- Gajdošová S, Spíchal L, Kamínek M, et al.** 2011. Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of cis-zeatin-type cytokinins in plants. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2827–2840.
- Galuszka P, Popelková H, Werner T, Frébortová J, Pospíšilová H, Mik V, Köllmer I, Schmölling T, Frébort I.** 2007. Biochemical Characterization of Cytokinin Oxidases/Dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* Expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**, 255–267.
- Gaudinová A, Dobrev PI, Šolcová B, Novák O, Strnad M, Friedecký D, Motyka V.** 2005. The Involvement of Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase and Zeatin Reductase in Regulation of Cytokinin Levels in Pea (*Pisum sativum* L.) Leaves. *Journal of Plant Growth Regulation* **24**, 188–200.
- Gayomba SR, Muday GK.** 2020. Flavonols regulate root hair development by modulating accumulation of reactive oxygen species in the root epidermis. *Development*.

- Gibot-Leclerc S, Abdennebi-Abdemessed N, Reibel C, Colbach N.** 2013. Non-host facilitators, a new category that unexpectedly favours parasitic weeds. *Agronomy for sustainable development* **33**, 787–793.
- Gibot-Leclerc S, Brault M, Pinochet X, Sallé G.** 2003. Potential role of winter rape weeds in the extension of broomrape in Poitou-Charentes. *Comptes Rendus Biologies* **326**, 645–658.
- Gibot-Leclerc S, Pinochet X, Sallé G.** 2006. Orobanche rameuse (*Orobanche ramosa* L.) du colza : un risque émergent sous surveillance. *Oléagineux, Corps gras, Lipides* **13**, 200–205.
- Gibot-Leclerc S, Sallé G, Reboud X, Moreau D.** 2012. What are the traits of *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel that contribute to the success of its biological cycle on its host *Brassica napus* L.? *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **207**, 512–521.
- Girke C, Daumann M, Niopek-Witz S, Möhlmann T.** 2014. Nucleobase and nucleoside transport and integration into plant metabolism. *Frontiers in Plant Science* **5**.
- Gomez-Roldan V, Roux C, Girard D, Becard G, Puech V.** 2007. Strigolactones. *Plant Signaling & Behavior* **2**, 163–164.
- González-Verdejo CI, Barandiaran X, Moreno MT, Cubero JI, Di Pietro A.** 2006. A peroxidase gene expressed during early developmental stages of the parasitic plant *Orobanche ramosa*. *Journal of Experimental Botany* **57**, 185–192.
- Goyet V.** 2017. Analyse transcriptomique globale et génétique fonctionnelle chez la plante parasite *Phelipanche ramosa*. Thèse de Doctorat. Université de Nantes.
- Goyet V, Billard E, Pouvreau J-B, et al.** 2017. Haustorium initiation in the obligate parasitic plant *Phelipanche ramosa* involves a host-exudated cytokinin signal. *Journal of Experimental Botany* **68**, 5539–5552.
- Goyet V, Wada S, Cui S, Wakatake T, Shirasu K, Montiel G, Simier P, Yoshida S.** 2019. Haustorium Inducing Factors for Parasitic Orobanchaceae. *Frontiers in Plant Science* **10**.
- Grierson C, Schiefelbein J.** 2002. Root Hairs. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists* **1**.
- Ha S, Vankova R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran L-SP.** 2012. Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. *Trends in Plant Science* **17**, 172–179.
- Haichar F el Z, Santaella C, Heulin T, Achouak W.** 2014. Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biology and Biochemistry* **77**, 69–80.
- Hart DS, Keightley A, Sappington D, Nguyen PTM, Chritton C, Seckinger GR, Torres KC.** 2016. Stability of adenine-based cytokinins in aqueous solution. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **52**, 1–9.
- Heide-Jørgensen H.** 2008. *Parasitic flowering plants*. Brill.
- Heide-Jørgensen HS.** 2013. Introduction: The Parasitic Syndrome in Higher Plants. In: Joel DM, In: Gressel J, In: Musselman LJ, eds. *Parasitic Orobanchaceae: Parasitic Mechanisms and Control Strategies*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1–18.
- Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M.** 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine* **15**, 639–652.
- Henry JT, Crosson S.** 2011. Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annual review of microbiology* **65**, 261–286.

- Hershenthorn J, Eizenberg H, Dor E, Kapulnik Y, Goldwasser Y.** 2009. Phelipanche aegyptiaca management in tomato. *Weed research* **49**, 34–47.
- Heyl A, Riefler M, Romanov GA, Schmölling T.** 2012. Properties, functions and evolution of cytokinin receptors. *European Journal of Cell Biology* **91**, 246–256.
- Heyl A, Schmölling T.** 2003. Cytokinin signal perception and transduction. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 480–488.
- Heyl A, Wulfetange K, Pils B, Nielsen N, Romanov GA, Schmölling T.** 2007. Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain. *BMC evolutionary biology* **7**, 62.
- Hibberd JM, Dieter Jeschke W.** 2001. Solute flux into parasitic plants. *Journal of Experimental Botany* **52**, 2043–2049.
- Hirose N, Takei K, Kuroha T, Kamada-Nobusada T, Hayashi H, Sakakibara H.** 2007. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany* **59**, 75–83.
- Hluska T, Dobrev PI, Tarkowská D, et al.** 2016. Cytokinin metabolism in maize: Novel evidence of cytokinin abundance, interconversions and formation of a new trans-zeatin metabolic product with a weak anticytokinin activity. *Plant Science* **247**, 127–137.
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJ, Schilperoort RA.** 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**, 179–180.
- Holst K, Schmölling T, Werner T.** 2011. Enhanced cytokinin degradation in leaf primordia of transgenic *Arabidopsis* plants reduces leaf size and shoot organ primordia formation. *Journal of Plant Physiology* **168**, 1328–1334.
- Hood ME, Condon JM, Timko MP, Riopel JL.** 1998. Primary Haustorial Development of *Striga asiatica* on Host and Nonhost Species. *Phytopathology* **88**, 70–75.
- Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A.** 1993. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research* **2**, 208–218.
- Hothorn M, Dabi T, Chory J.** 2011. Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 4. *Nature chemical biology* **7**, 766–768.
- Huang Z, Haig T, Wu H, An M, Pratley J.** 2003. Correlation Between Phytotoxicity on Annual Ryegrass (*Lolium rigidum*) and Production Dynamics of Allelochemicals Within Root Exudates of an Allelopathic Wheat. *Journal of Chemical Ecology* **29**, 2263–2279.
- Huang H, Ullah F, Zhou D-X, Yi M, Zhao Y.** 2019. Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses. *Frontiers in Plant Science* **10**.
- Hwang I, Sheen J.** 2001. Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**, 383–389.
- Ioio RD, Nakamura K, Moubayidin L, Perilli S, Taniguchi M, Morita MT, Aoyama T, Costantino P, Sabatini S.** 2008. A Genetic Framework for the Control of Cell Division and Differentiation in the Root Meristem. *Science* **322**, 1380–1384.
- Ishida JK, Wakatake T, Yoshida S, Takebayashi Y, Kasahara H, Wafula E, dePamphilis CW, Namba S, Shirasu K.** 2016. Local Auxin Biosynthesis Mediated by a YUCCA Flavin Monooxygenase Regulates Haustorium Development in the Parasitic Plant *Phtheirospermum japonicum*. *The Plant Cell* **28**, 1795–1814.

- Ishida JK, Yoshida S, Ito M, Namba S, Shirasu K.** 2011. Agrobacterium rhizogenes-Mediated Transformation of the Parasitic Plant Phtheirospermum japonicum. *PLOS ONE* **6**, e25802.
- Jiang F, Jeschke WD, Hartung W.** 2004. Abscisic acid (ABA) flows from *Hordeum vulgare* to the hemiparasite *Rhinanthus minor* and the influence of infection on host and parasite abscisic acid relations. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2323–2329.
- Jiang L, Matthys C, Marquez-Garcia B, De Cuyper C, Smet L, De Keyser A, Boyer F-D, Beeckman T, Depuydt S, Goormachtig S.** 2016. Strigolactones spatially influence lateral root development through the cytokinin signaling network. *Journal of Experimental Botany* **67**, 379–389.
- Jiang F, Veselova S, Veselov D, Kudoyarova G, Jeschke WD, Hartung W.** 2005. Cytokinin flows from *Hordeum vulgare* to the hemiparasite *Rhinanthus minor* and the influence of infection on host and parasite cytokinins relations. *Functional Plant Biology* **32**, 619–629.
- Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP.** 2013. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Research* **41**, e188.
- Jimenez-Jimenez S, Santana O, Lara-Rojas F, et al.** 2019. Differential tetraspanin genes expression and subcellular localization during mutualistic interactions in *Phaseolus vulgaris*. *PLoS ONE* **14**.
- Jiskrová E, Novák O, Pospíšilová H, Holubová K, Karády M, Galuszka P, Robert S, Frébort I.** 2016. Extra- and intracellular distribution of cytokinins in the leaves of monocots and dicots. *New Biotechnology* **33**, 735–742.
- Joel DM, Gressel J, Musselman LJ.** 2013. *Parasitic Orobanchaceae: Parasitic Mechanisms and Control Strategies*. Springer Science & Business Media.
- Joel DM, Hershenhorn J, Eizenberg H, Aly R, Ejeta G, Rich PJ, Ransom JK, Sauerborn J, Rubiales D.** 2007. Biology and management of weedy root parasites. *HORTICULTURAL REVIEWS-WESTPORT THEN NEW YORK-* **33**, 267.
- Joel DM, Losner-Goshen D.** 1994. The attachment organ of the parasitic angiosperms *Orobanche cumana* and *O. aegyptiaca* and its development. *Canadian Journal of Botany* **72**, 564–574.
- Jones B, Gunnerås SA, Petersson SV, Tarkowski P, Graham N, May S, Dolezal K, Sandberg G, Ljung K.** 2010. Cytokinin Regulation of Auxin Synthesis in Arabidopsis Involves a Homeostatic Feedback Loop Regulated via Auxin and Cytokinin Signal Transduction. *The Plant Cell* **22**, 2956–2969.
- Kang NY, Cho C, Kim NY, Kim J.** 2012. Cytokinin receptor-dependent and receptor-independent pathways in the dehydration response of Arabidopsis thaliana. *Journal of Plant Physiology* **169**, 1382–1391.
- Kang J, Lee Y, Sakakibara H, Martinoia E.** 2017. Cytokinin Transporters: GO and STOP in Signaling. *Trends in Plant Science* **22**, 455–461.
- Kemen AC, Honkanen S, Melton RE, Findlay KC, Mugford ST, Hayashi K, Haralampidis K, Rosser SJ, Osbourn A.** 2014. Investigation of triterpene synthesis and regulation in oats reveals a role for  $\beta$ -amyirin in determining root epidermal cell patterning. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 8679–8684.
- Kereszt A, Li D, Indrasumunar A, Nguyen CD, Nontachaiyapoom S, Kinkema M, Gresshoff PM.** 2007. Agrobacterium rhizogenes -mediated transformation of soybean to study root biology. *Nature Protocols* **2**, 948–952.
- Keyes WJ, O'Malley RC, Kim D, Lynn DG.** 2000. Signaling Organogenesis in Parasitic Angiosperms: Xenognosin Generation, Perception, and Response. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**, 217–231.

- Keyes WJ, Palmer AG, Erbil WK, Taylor JV, Apkarian RP, Weeks ER, Lynn DG.** 2007. Semagenesis and the parasitic angiosperm *Striga asiatica*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **51**, 707–716.
- Keyes WJ, Taylor JV, Apkarian RP, Lynn DG.** 2001. Dancing Together. Social Controls in Parasitic Plant Development. *Plant Physiology* **127**, 1508–1512.
- Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH.** 2013. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* **18**, 2328–2375.
- Kieber JJ, Schaller GE.** 2014. Cytokinins. *The arabidopsis book* **12**, e0168–e0168.
- Kim D, Kocz R, Boone L, John Keyes W, Lynn DG.** 1998. On becoming a parasite: evaluating the role of wall oxidases in parasitic plant development. *Chemistry & Biology* **5**, 103–117.
- Kiran NS, Benková E, Reková A, Dubová J, Malbeck J, Palme K, Brzobohatý B.** 2012. Retargeting a maize  $\beta$ -glucosidase to the vacuole – Evidence from intact plants that zeatin-O-glucoside is stored in the vacuole. *Phytochemistry* **79**, 67–77.
- Kirigia D, Runo S, Alakonya A.** 2014. A virus-induced gene silencing (VIGS) system for functional genomics in the parasitic plant *Striga hermonthica*. *Plant methods* **10**, 16.
- Ko D, Kang J, Kiba T, et al.** 2014. Arabidopsis ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 7150–7155.
- Kokla A, Melnyk CW.** 2018. Developing a thief: Haustoria formation in parasitic plants. *Developmental Biology* **442**, 53–59.
- Kryvych S, Nikiforova V, Herzog M, Perazza D, Fisahn J.** 2008. Gene expression profiling of the different stages of *Arabidopsis thaliana* trichome development on the single cell level. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**, 160–173.
- Kuderová A, Gallová L, Kuricová K, Nejedlá E, Čurdová A, Micenková L, Plíhal O, Šmajš D, Spíchal L, Hejátko J.** 2015. Identification of AHK2- and AHK3-like cytokinin receptors in *Brassica napus* reveals two subfamilies of AHK2 orthologues. *Journal of Experimental Botany* **66**, 339–353.
- Kudo T, Makita N, Kojima M, Tokunaga H, Sakakibara H.** 2012. Cytokinin Activity of cis-Zeatin and Phenotypic Alterations Induced by Overexpression of Putative cis-Zeatin-O-glucosyltransferase in Rice. *Plant Physiology* **160**, 319–331.
- Kuijt J.** 1969. *The biology of parasitic flowering plants*. University of California Press, Berkeley.
- Kuijt J.** 1977. *Haustoria of Phanerogamic Parasites*. *Annual Review of Phytopathology* **15**, 91–118.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K.** 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution* **35**, 1547–1549.
- Kuroha T, Tokunaga H, Kojima M, Ueda N, Ishida T, Nagawa S, Fukuda H, Sugimoto K, Sakakibara H.** 2009. Functional Analyses of LONELY GUY Cytokinin-Activating Enzymes Reveal the Importance of the Direct Activation Pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**, 3152–3169.
- Kwak S-H, Song S-K, Lee MM, Schiefelbein J.** 2015. TORNADO1 regulates root epidermal patterning through the WEREWOLF pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior* **10**, e1103407.
- Labrousse P, Arnaud MC, Griveau Y, Fer A, Thalouarn P.** 2004. Analysis of resistance criteria of sunflower recombined inbred lines against *Orobanche cumana* Wallr. *Crop Protection* **23**, 407–413.

- Lechat M-M.** 2014. Études des mécanismes impliqués dans la perception des molécules stimulant la germination des plantes parasites des genres *Orobanche* et *Phelipanche*. Thèse de Doctorat. Université de Nantes.
- Lechat M-M, Brun G, Montiel G, Véronési C, Simier P, Thoiron S, Pouvreau J-B, Delavault P.** 2015. Seed response to strigolactone is controlled by abscisic acid-independent DNA methylation in the obligate root parasitic plant, *Phelipanche ramosa* L. Pomel. *Journal of Experimental Botany*, *erv119*.
- Lechat M-M, Pouvreau J-B, Péron T, et al.** 2012. PrCYP707A1, an ABA catabolic gene, is a key component of *Phelipanche ramosa* seed germination in response to the strigolactone analogue GR24. *Journal of Experimental Botany*.
- Lechowski Z, Bialczyk J.** 1996. Cytokinins in the hemiparasite *Melampyrum arvense* L. before and after attachment to the host. *Biologia Plantarum* **38**, 481.
- Lee DJ, Park J-Y, Ku S-J, Ha Y-M, Kim S, Kim MD, Oh M-H, Kim J.** 2007. Genome-wide expression profiling of ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 7 (ARR7) overexpression in cytokinin response. *Molecular Genetics and Genomics* **277**, 115–137.
- Lenzemo V, Kuyper TW, Vierheilig H.** 2009. Striga seed-germination activity of root exudates and compounds present in stems of Striga host and nonhost (trap crop) plants is reduced due to root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **19**, 287–294.
- Lesaint C.** 1981. Coïc method: principle and practical application. Symposium on Substrates in Horticulture other than Soils In Situ 126.367–374.
- Levesque MP, Vernoux T, Busch W, et al.** 2006. Whole-Genome Analysis of the SHORT-ROOT Developmental Pathway in Arabidopsis. *PLoS Biology* **4**.
- Li Y, Kurepa J, Smalle J.** 2013. AXR1 promotes the Arabidopsis cytokinin response by facilitating ARR5 proteolysis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **74**, 13–24.
- Libiaková D, Ruyter-Spira C, Bouwmeester HJ, Matusova R.** 2018. Agrobacterium rhizogenes transformed calli of the holoparasitic plant *Phelipanche ramosa* maintain parasitic competence. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **135**, 321–329.
- Liesecke F, Daudu D, Bernonville RD de, et al.** 2018. Ranking genome-wide correlation measurements improves microarray and RNA-seq based global and targeted co-expression networks. *Scientific Reports* **8**, 1–16.
- Lin Q, Ohashi Y, Kato M, Tsuge T, Gu H, Qu L-J, Aoyama T.** 2015. GLABRA2 directly suppresses basic helix-loop-helix transcription factor genes with diverse functions in root hair development. *The Plant Cell* **27**, 2894–2906.
- Liszak A, Zalm E van der, Schopfer P.** 2004. Production of Reactive Oxygen Intermediates (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and ·OH) by Maize Roots and Their Role in Wall Loosening and Elongation Growth. *Plant Physiology* **136**, 3114–3123.
- Lomin S, Krivosheev D, Steklov MY, Osolodkin D, Romanov G.** 2012. Receptor properties and features of cytokinin signaling. *Acta Naturae (англоязычная версия)* **4**.
- Lu C, Fedoroff N.** 2000. A Mutation in the Arabidopsis HYL1 Gene Encoding a dsRNA Binding Protein Affects Responses to Abscisic Acid, Auxin, and Cytokinin. *The Plant Cell* **12**, 2351–2365.
- Lupia R, Crane PR, Lidgard scott.** 2000. Angiosperm diversification and Cretaceous environmental change. *Biotic Response to Global Change*, 207.
- Lynn DG, Steffens JC, Kamut VS, Graden DW, Shabanowitz J, Riopel JL.** 1981. Isolation and characterization of the first host recognition substance for parasitic angiosperms. *Journal of the American Chemical Society* **103**, 1868–1870.

- Ma X, Zhang Q, Zhu Q, et al.** 2015. A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. *Molecular Plant* **8**, 1274–1284.
- Mähönen AP, Bonke M, Kauppinen L, Riikonen M, Benfey PN, Helariutta Y.** 2000. A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the Arabidopsis root. *Genes & development* **14**, 2938–2943.
- Masferrer A, Arró M, Manzano D, Schaller H, Fernández-Busquets X, Moncaleán P, Fernández B, Cunillera N, Boronat A, Ferrer A.** 2002. Overexpression of Arabidopsis thaliana farnesyl diphosphate synthase (FPS1S) in transgenic Arabidopsis induces a cell death/senescence-like response and reduced cytokinin levels. *The Plant Journal* **30**, 123–132.
- Matías-Hernández L, Aguilar-Jaramillo AE, Cigliano RA, Sanseverino W, Pelaz S.** 2016. Flowering and trichome development share hormonal and transcription factor regulation. *Journal of Experimental Botany* **67**, 1209–1219.
- Matvienko M, Wojtowicz A, Wrobel R, Jamison D, Goldwasser Y, Yoder JI.** 2001. Quinone oxidoreductase message levels are differentially regulated in parasitic and non-parasitic plants exposed to allelopathic quinones. *The Plant Journal* **25**, 375–387.
- McNeal JR, Bennett JR, Wolfe AD, Mathews S.** 2013. Phylogeny and origins of holoparasitism in Orobanchaceae. *American Journal of Botany* **100**, 971–983.
- Mendoza L, Alvarez-Buylla ER.** 2000. Genetic Regulation of Root Hair Development in Arabidopsis Thaliana: A Network Model. *Journal of Theoretical Biology* **204**, 311–326.
- Miller CO, Skoog F, Okumura F, Von Saltza M, Strong F.** 1956. Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division<sup>1</sup>, 2. *Journal of the American Chemical Society* **78**, 1375–1380.
- Mohamed KI, Papes M, Williams R, Benz BW, Peterson AT.** 2006. Global Invasive Potential of 10 Parasitic Witchweeds and Related Orobanchaceae. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* **35**, 281–288.
- Mok DW, Mok MC.** 2001. Cytokinin metabolism and action. *Annual review of plant biology* **52**, 89–118.
- Motyka V, Vaňková R, Čapková V, Petrášek J, Kamínek M, Schmölling T.** 2003. Cytokinin-induced upregulation of cytokinin oxidase activity in tobacco includes changes in enzyme glycosylation and secretion. *Physiologia Plantarum* **117**, 11–21.
- Muraro D, Byrne H, King J, Voß U, Kieber J, Bennett M.** 2011. The influence of cytokinin–auxin cross-regulation on cell-fate determination in Arabidopsis thaliana root development. *Journal of Theoretical Biology* **283**, 152–167.
- Murashige T, Skoog F.** 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473–497.
- Murdoch AJ, Kebreab E.** 2013. Germination Ecophysiology. In: Joel DM,, In: Gressel J,, In: Musselman LJ, eds. *Parasitic Orobanchaceae: Parasitic Mechanisms and Control Strategies*. Berlin, Heidelberg: Springer, 195–219.
- Mylona P, Owatworakit A, Papadopoulou K, et al.** 2008. Sad3 and Sad4 Are Required for Saponin Biosynthesis and Root Development in Oat. *The Plant Cell* **20**, 201–212.
- Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JDG, Kamoun S.** 2013. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology* **31**, 691–693.

- Ngo QA, Albrecht H, Tsuchimatsu T, Grossniklaus U.** 2013. The differentially regulated genes TvQR1 and TvPirin of the parasitic plant *Triphysaria* exhibit distinctive natural allelic diversity. *BMC Plant Biology* **13**, 28.
- Nickrent DL, Duff RJ, Colwell AE, Wolfe AD, Young ND, Steiner KE, dePamphilis CW.** 1998. Molecular Phylogenetic and Evolutionary Studies of Parasitic Plants. In: Soltis DE., In: Soltis PS., In: Doyle JJ, eds. *Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing*. Boston, MA: Springer US, 211–241.
- Nishimura C, Ohashi Y, Sato S, Kato T, Tabata S, Ueguchi C.** 2004. Histidine Kinase Homologs That Act as Cytokinin Receptors Possess Overlapping Functions in the Regulation of Shoot and Root Growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* **16**, 1365–1377.
- Nishiyama R, Watanabe Y, Fujita Y, et al.** 2011. Analysis of Cytokinin Mutants and Regulation of Cytokinin Metabolic Genes Reveals Important Regulatory Roles of Cytokinins in Drought, Salt and Abscisic Acid Responses, and Abscisic Acid Biosynthesis. *The Plant Cell* **23**, 2169–2183.
- Nisler J, Zatloukal M, Popa I, Doležal K, Strnad M, Spíchal L.** 2010. Cytokinin receptor antagonists derived from 6-benzylaminopurine. *Phytochemistry* **71**, 823–830.
- Novák O, Hauserová E, Amakorová P, Dolezal K, Strnad M.** 2008. Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* **69**, 2214–2224.
- Olivier A, Benhamou N, Leroux GD.** 1991. Cell surface interactions between sorghum roots and the parasitic weed *Striga hermonthica*: cytochemical aspects of cellulose distribution in resistant and susceptible host tissues. *Canadian Journal of Botany* **69**, 1679–1690.
- Pacifici E, Polverari L, Sabatini S.** 2015. Plant hormone cross-talk: the pivot of root growth. *Journal of Experimental Botany* **66**, 1113–1121.
- Palmer AG, Chen MC, Kinger NP, Lynn DG.** 2009. Parasitic angiosperms, semagenesis and general strategies for plant–plant signaling in the rhizosphere. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science* **65**, 512–519.
- Parker C.** 2009. Observations on the current status of Orobanche and *Striga* problems worldwide. *Pest Management Science* **65**, 453–459.
- Parker C.** 2012. Parasitic Weeds: A World Challenge. *Weed Science* **60**, 269–276.
- Pattanaik S, Patra B, Singh SK, Yuan L.** 2014. An overview of the gene regulatory network controlling trichome development in the model plant, *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **5**.
- Paul S, Wildhagen H, Janz D, Teichmann T, Hänsch R, Polle A.** 2016. Tissue- and Cell-Specific Cytokinin Activity in *Populus x canescens* Monitored by ARR5::GUS Reporter Lines in Summer and Winter. *Frontiers in Plant Science* **7**, 652.
- Pérez-De-Luque A, Fondevilla S, Pérez-Vich B, et al.** 2009. Understanding Orobanche and Phelipanche–host plant interactions and developing resistance. *Weed Research* **49**, 8–22.
- Péron T.** 2010. Caractérisation moléculaire et régulation de la force de puits de la plante parasite *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel vis à vis du saccharose prélevé chez son hôte. Thèse de Doctorat. Université de Nantes.
- Péron T, Candat A, Montiel G, Veronesi C, Macherel D, Delavault P, Simier P.** 2017. New Insights into Phloem Unloading and Expression of Sucrose Transporters in Vegetative Sinks of the Parasitic Plant *Phelipanche ramosa* L. (Pomel). *Frontiers in Plant Science* **7**, 2048.

- Péron T, Véronési C, Mortreau E, Pouvreau J-B, Thoiron S, Leduc N, Delavault P, Simier P.** 2011. Role of the Sucrose Synthase Encoding PrSus1 Gene in the Development of the Parasitic Plant *Phelipanche ramosa* L. (Pomel). *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**, 402–411.
- Phillips DR, Rasbery JM, Bartel B, Matsuda SP.** 2006. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 305–314.
- Poulin R, Morand S.** 2000. The Diversity of Parasites. *The Quarterly Review of Biology* **75**, 277–293.
- Pouvreau J-B, Gaudin Z, Auger B, Lechat M-M, Gauthier M, Delavault P, Simier P.** 2013. A high-throughput seed germination assay for root parasitic plants. *Plant Methods* **9**, 32.
- Press MC.** 1998. Dracula or Robin Hood? A Functional Role for Root Hemiparasites in Nutrient Poor Ecosystems. *Oikos* **82**, 609–611.
- Press M, Graves J.** 1995. *Parasitic Plants*. Springer Science & Business Media.
- Quandt HJ, Pühler A, Broer I.** 1993. Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: a fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions* **6**, 699–706.
- Ramasubramanian TS, Paliyath G, Rajagopal I, Maheshwari R, Mahadevan S.** 1988. Hormones and *Cuscuta* development: In vitro induction of haustoria by cytokinin and its inhibition by other hormones. *Journal of Plant Growth Regulation* **7**, 133–144.
- Ranjan A, Ichihashi Y, Farhi M, Zumstein K, Townsley B, David-Schwartz R, Sinha NR.** 2014. De Novo Assembly and Characterization of the Transcriptome of the Parasitic Weed Dodder Identifies Genes Associated with Plant Parasitism. *Plant Physiology* **166**, 1186–1199.
- Reimann R, Kost B, Dettmer J.** 2017. TETRASPANINs in Plants. *Frontiers in Plant Science* **8**.
- Riefler M, Novak O, Strnad M, Schmülling T.** 2006. Arabidopsis Cytokinin Receptor Mutants Reveal Functions in Shoot Growth, Leaf Senescence, Seed Size, Germination, Root Development, and Cytokinin Metabolism. *The Plant Cell* **18**, 40–54.
- Ritz C, Streibig JC.** 2014. From additivity to synergism – A modelling perspective. *Synergy* **1**, 22–29.
- Romanov GA.** 2002. The Phytohormone Receptors. *Russian Journal of Plant Physiology* **49**, 552–560.
- Romanov GA, Lomin SN, Schmülling T.** 2006. Biochemical characteristics and ligand-binding properties of Arabidopsis cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *Journal of Experimental Botany* **57**, 4051–4058.
- Saha S, Mori H, Hattori K.** 2007. Synergistic Effect of Kinetin and Benzyl Adenine Plays a Vital Role in High Frequency Regeneration from Cotyledon Explants of Bottle Gourd (*Lagenaria siceraria*) in Relation to Ethylene Production. *Breeding Science* **57**, 197–202.
- Saini S, Sharma I, Kaur N, Pati PK.** 2013. Auxin: a master regulator in plant root development. *Plant cell reports* **32**, 741–757.
- Sakakibara H.** 2006. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 431–449.
- Sakakibara H.** 2010. Cytokinin biosynthesis and metabolism. *Plant Hormones*. Springer, 95–114.
- Salazar-Henao JE, Vélez-Bermúdez IC, Schmidt W.** 2016. The regulation and plasticity of root hair patterning and morphogenesis. *Development* **143**, 1848–1858.

- Salcedo-Morales G, Jiménez-Aparicio AR, Cruz-Sosa F, Trejo-Tapia G.** 2014. Anatomical and histochemical characterization of in vitro haustorium from roots of *Castilleja tenuiflora*. *Biologia Plantarum* **58**, 164–168.
- Sauquet H, von Balthazar M, Magallón S, et al.** 2017. The ancestral flower of angiosperms and its early diversification. *Nature Communications* **8**, 16047.
- Schäfer M, Meza-Canales ID, Navarro-Quezada A, Brütting C, Vanková R, Baldwin IT, Meldau S.** 2015. Cytokinin levels and signaling respond to wounding and the perception of herbivore elicitors in *Nicotiana attenuata*. *Journal of integrative plant biology* **57**, 198–212.
- Schaller GE, Street IH, Kieber JJ.** 2014. Cytokinin and the cell cycle. *Current Opinion in Plant Biology* **21**, 7–15.
- Schenk PW, Snaar-Jagalska BE.** 1999. Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1449**, 1–24.
- Schmülling T, Werner T, Riefler M, Krupková E, Bartrina y Manns I.** 2003. Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, Arabidopsis and other species. *Journal of Plant Research* **116**, 241–252.
- Seo M, Nambara E, Choi G, Yamaguchi S.** 2008. Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant Molecular Biology* **69**, 463.
- Seto Y, Sado A, Asami K, Hanada A, Umehara M, Akiyama K, Yamaguchi S.** 2014. Carlactone is an endogenous biosynthetic precursor for strigolactones. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 1640–1645.
- Shimizu K, Aoki K.** 2019. Development of Parasitic Organs of a Stem Holoparasitic Plant in Genus *Cuscuta*. *Frontiers in Plant Science* **10**.
- Shimotohno A, Heidstra R, Blilou I, Scheres B.** 2018. Root stem cell niche organizer specification by molecular convergence of PLETHORA and SCARECROW transcription factor modules. *Genes & Development* **32**, 1085–1100.
- Shirin F, Rana PK.** 2007. In vitro plantlet regeneration from nodal explants of field-grown culms in *Bambusa glaucescens* Willd. *Plant Biotechnology Reports* **1**, 141–147.
- Skoog F, Armstrong DJ.** 1970. Cytokinins. *Annual Review of Plant Physiology* **21**, 359–384.
- Sneath PH, Sokal RR.** 1973. *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification.*
- Soltis DE, Albert VA, Leebens-Mack J, Bell CD, Paterson AH, Zheng C, Sankoff D, Pamphilis CW de, Wall PK, Soltis PS.** 2009. Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany* **96**, 336–348.
- Sompornpailin K, Khunchuay C.** 2016. Synergistic effects of BAP and kinetin media additives on regeneration of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides* L. Nash). *Australian Journal of Crop Science* **10**, 726.
- Sørensen JL, Benfield AH, Wollenberg RD, et al.** 2018. The cereal pathogen *Fusarium pseudograminearum* produces a new class of active cytokinins during infection. *Molecular Plant Pathology* **19**, 1140–1154.
- Sørensen H, Cedergreen N, Skovgaard IM, Streibig JC.** 2007. An isobole-based statistical model and test for synergism/antagonism in binary mixture toxicity experiments. *Environmental and Ecological Statistics* **14**, 383–397.

- Spallek T, Gan P, Kadota Y, Shirasu K.** 2018. Same tune, different song—cytokinins as virulence factors in plant–pathogen interactions? *Current Opinion in Plant Biology* **44**, 82–87.
- Spallek T, Melnyk CW, Wakatake T, Zhang J, Sakamoto Y, Kiba T, Yoshida S, Matsunaga S, Sakakibara H, Shirasu K.** 2017. Interspecies hormonal control of host root morphology by parasitic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, 5283–5288.
- Spíchal L.** 2011. Bacterial assay to study plant sensor histidine kinases. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) **779**, 139–147.
- Spíchal L, Rakova NY, Riefler M, Mizuno T, Romanov GA, Strnad M, Schmülling T.** 2004. Two Cytokinin Receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, Differ in their Ligand Specificity in a Bacterial Assay. *Plant and Cell Physiology* **45**, 1299–1305.
- Spíchal L, Werner T, Popa I, Riefler M, Schmülling T, Strnad M.** 2009. The purine derivative PI-55 blocks cytokinin action via receptor inhibition. *FEBS Journal* **276**, 244–253.
- Staden JV.** 1976. Seasonal Changes in the Cytokinin Content of *Ginkgo biloba* Leaves. *Physiologia Plantarum* **38**, 1–5.
- Steffens JC, Lynn DG, Kamat VS, Riopel JL.** 1982. Molecular Specificity of Haustorial Induction in *Agalinis purpurea* (L.) Raf. (Scrophulariaceae). *Annals of Botany* **50**, 1–7.
- Steffens JC, Lynn DG, Riopel JL.** 1986. An haustoria inducer for the root parasite *Agalinis purpurea*. *Phytochemistry* **25**, 2291–2298.
- Steklov MYu, Lomin SN, Osolodkin DI, Romanov GA.** 2013. Structural basis for cytokinin receptor signaling: an evolutionary approach. *Plant Cell Reports* **32**, 781–793.
- Stephens EL.** 1912. The structure and development of the haustorium of *Striga lutea*. *Annals of Botany* **26**, 1067–1076.
- Stirk WA, Václavíková K, Novák O, Gajdošová S, Kotland O, Motyka V, Strnad M, van Staden J.** 2012. Involvement of cis-Zeatin, Dihydrozeatin, and Aromatic Cytokinins in Germination and Seedling Establishment of Maize, Oats, and Lucerne. *Journal of Plant Growth Regulation* **31**, 392–405.
- Stirk W, Van Staden J.** 2010. Flow of cytokinins through the environment. *Plant Growth Regulation* **62**, 101–116.
- Stoeckle D, Thellmann M, Vermeer JE.** 2018. Breakout-lateral root emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology* **41**, 67–72.
- Stojanova B, Delourme R, Duffé P, Delavault P, Simier P.** 2019. Genetic differentiation and host preference reveal non-exclusive host races in the generalist parasitic weed *Phelipanche ramosa*. *Weed Research* **59**, 107–118.
- Stolz A, Riefler M, Lomin SN, Achazi K, Romanov GA, Schmülling T.** 2011. The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. *The Plant Journal* **67**, 157–168.
- Strehmel N, Böttcher C, Schmidt S, Scheel D.** 2014. Profiling of secondary metabolites in root exudates of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **108**, 35–46.
- Sun J, Hirose N, Wang X, Wen P, Xue L, Sakakibara H, Zuo J.** 2005. *Arabidopsis* SOI33/AtENT8 Gene Encodes a Putative Equilibrative Nucleoside Transporter That Is Involved in Cytokinin Transport In Planta. *Journal of Integrative Plant Biology* **47**, 588–603.
- Sundaravelpandian K, Chandrika NNP, Schmidt W.** 2013. PFT1, a transcriptional Mediator complex subunit, controls root hair differentiation through reactive oxygen species (ROS) distribution in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **197**, 151–161.

**Sung J, Lee S, Lee Y, Ha S, Song B, Kim T, Waters BM, Krishnan HB.** 2015. Metabolomic profiling from leaves and roots of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants grown under nitrogen, phosphorus or potassium-deficient condition. *Plant Science* **241**, 55–64.

**Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler R, Miller G.** 2012. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell & Environment* **35**, 259–270.

**Suzuki T, Miwa K, Ishikawa K, Yamada H, Aiba H, Mizuno T.** 2001. The Arabidopsis Sensor Histidine Kinase, AHK4, Can Respond to Cytokinins. *Plant and Cell Physiology* **42**, 107–113.

**Svačinová J, Novák O, Plačková L, Lenobel R, Holík J, Strnad M, Doležal K.** 2012. A new approach for cytokinin isolation from Arabidopsis tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction. *Plant Methods* **8**, 17.

**Tadano T, Tanaka A.** 1976. Comparison of adaptability to ammonium and nitrate among crop plants, 1: Selective absorption between and responses to ammonium and nitrate of crop plants during early growth stage. *Journal of the Science of Soil and Manure*.

**Tarkowski P, Ge L, Yong JWH, Tan SN.** 2009. Analytical methods for cytokinins. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **28**, 323–335.

**Thimmappa R, Geisler K, Louveau T, O'Maille P, Osbourn A.** 2014. Triterpene Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **65**, 225–257.

**Tian Q, Nagpal P, Reed JW.** 2003. Regulation of Arabidopsis SHY2/IAA3 protein turnover. *The Plant Journal* **36**, 643–651.

**Tognetti VB, Bielach A, Hrtyan M.** 2017. Redox regulation at the site of primary growth: auxin, cytokinin and ROS crosstalk. *Plant, Cell & Environment* **40**, 2586–2605.

**Tokunaga H, Kojima M, Kuroha T, Ishida T, Sugimoto K, Kiba T, Sakakibara H.** 2012. Arabidopsis lonely guy (LOG) multiple mutants reveal a central role of the LOG-dependent pathway in cytokinin activation. *The Plant Journal* **69**, 355–365.

**Tomaz R, Marina D.** 2010. Cytokinins and their function in developing seeds. *Acta Chim Slov* **57**, 617–629.

**Tomilov AA, Tomilova NB, Abdallah I, Yoder JI.** 2005. Localized Hormone Fluxes and Early Haustorium Development in the Hemiparasitic Plant *Triphysaria versicolor*. *Plant Physiology* **138**, 1469–1480.

**Tomilov A, Tomilova N, Yoder JI.** 2004. In Vitro Haustorium Development in Roots and Root Cultures of the Hemiparasitic Plant *Triphysaria Versicolor*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **77**, 257–265.

**Tomilov A, Tomilova N, Yoder JI.** 2007. *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots of the parasitic plant *Triphysaria versicolor* retain parasitic competence. *Planta* **225**, 1059–1071.

**Tominaga-Wada R, Wada T.** 2014. Regulation of root hair cell differentiation by R3 MYB transcription factors in tomato and Arabidopsis. *Frontiers in plant science* **5**, 91.

**Torres-Vera R, García JM, Pozo MJ, López-Ráez JA.** 2016. Expression of molecular markers associated to defense signaling pathways and strigolactone biosynthesis during the early interaction tomato-*Phelipanche ramosa*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **94**, 100–107.

**Ueguchi C, Koizumi H, Suzuki T, Mizuno T.** 2001. Novel Family of Sensor Histidine Kinase Genes in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology* **42**, 231–235.

**Vančura V, Hovadík A.** 1965. Root exudates of plants. *Plant and Soil* **22**, 21–32.

- Veronesi C, Bonnin E, Calvez S, Thalouarn P, Simier P.** 2007. Activity of secreted cell wall-modifying enzymes and expression of peroxidase-encoding gene following germination of *Orobanche ramosa*. *Biologia plantarum* **51**, 391–394.
- Wada S, Cui S, Yoshida S.** 2019. Reactive Oxygen Species (ROS) Generation Is Indispensable for Haustorium Formation of the Root Parasitic Plant *Striga hermonthica*. *Frontiers in Plant Science* **10**, 328.
- Wang F, Vandepoele K, Van Lijsebettens M.** 2012. Tetraspanin genes in plants. *Plant Science* **190**, 9–15.
- Waters MT, Smith SM.** 2013. KAI2- and MAX2-Mediated Responses to Karrikins and Strigolactones Are Largely Independent of HY5 in *Arabidopsis* Seedlings. *Molecular Plant* **6**, 63–75.
- Waweru DN, Kuria EK, Bradley JM, Scholes JD, Runo S.** 2019. Tissue culture protocols for the obligate parasitic plant *Striga hermonthica* and implications for host-parasite co-cultivation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **138**, 247–256.
- Werner T, Hanuš J, Holub J, Schmülling T, Onckelen HV, Strnad M.** 2003. New cytokinin metabolites in IPT transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. *Physiologia Plantarum* **118**, 127–137.
- Werner T, Köllmer I, Bartrina I, Holst K, Schmülling T.** 2006. New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant biology* **8**, 371–381.
- Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmülling T.** 2001. Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 10487–10492.
- Werner T, Schmülling T.** 2009. Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 527–538.
- Westwood JH, dePamphilis CW, Das M, Fernández-Aparicio M, Honaas LA, Timko MP, Wafula EK, Wickett NJ, Yoder JI.** 2012. The Parasitic Plant Genome Project: New Tools for Understanding the Biology of *Orobanche* and *Striga*. *Weed Science* **60**, 295–306.
- Westwood JH, Yoder JI, Timko MP, dePamphilis CW.** 2010. The evolution of parasitism in plants. *Trends in Plant Science* **15**, 227–235.
- White DB, Faessel HM, Slocum HK, Khinkis L, Greco WR.** 2004. Nonlinear Response Surface and Mixture Experiment Methodologies Applied to the Study of Synergism. *Biometrical Journal* **46**, 56–71.
- Windsor DA.** 1998. Controversies in parasitology, Most of the species on Earth are parasites. *International Journal for Parasitology* **28**, 1939–1941.
- Wrobel RL, Yoder JI.** 2001. Differential RNA expression of  $\alpha$ -expansin gene family members in the parasitic angiosperm *Triphysaria versicolor* (Scrophulariaceae). *Gene* **266**, 85–93.
- Wulfetange K, Saenger W, Schmülling T, Heyl A.** 2011. E. coli-based cell-free expression, purification and characterization of the membrane-bound ligand-binding CHASE-TM domain of the cytokinin receptor CRE1/AHK4 of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular biotechnology* **47**, 211–219.
- Yamada T.** 1993. The Role of Auxin in Plant-Disease Development. *Annual Review of Phytopathology* **31**, 253–273.
- Yamada H, Suzuki T, Terada K, Takei K, Ishikawa K, Miwa K, Yamashino T, Mizuno T.** 2001. The *Arabidopsis* AHK4 Histidine Kinase is a Cytokinin-Binding Receptor that Transduces Cytokinin Signals Across the Membrane. *Plant and Cell Physiology* **42**, 1017–1023.
- Yoder JI.** 1999. Parasitic plant responses to host plant signals: a model for subterranean plant–plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 65–70.

- Yoder JI.** 2001. Host-plant recognition by parasitic Scrophulariaceae. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 359–365.
- Yoneyama K, Xie X, Yoneyama K, Takeuchi Y.** 2009. Strigolactones: structures and biological activities. *Pest Management Science* **65**, 467–470.
- Yoshida S, Cui S, Ichihashi Y, Shirasu K.** 2016. The Haustorium, a Specialized Invasive Organ in Parasitic Plants. *Annual Review of Plant Biology* **67**, 643–667.
- Yoshida S, Shirasu K.** 2012. Plants that attack plants: molecular elucidation of plant parasitism. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, 708–713.
- van Zeijl A, Liu W, Xiao TT, Kohlen W, Yang W-C, Bisseling T, Geurts R.** 2015. The strigolactone biosynthesis gene DWARF27 is co-opted in rhizobium symbiosis. *BMC Plant Biology* **15**, 260.
- Zhang X, Berkowitz O, Teixeira da Silva JA, Zhang M, Ma G, Whelan J, Duan J.** 2015. RNA-Seq analysis identifies key genes associated with haustorial development in the root hemiparasite *Santalum album*. *Frontiers in Plant Science* **6**.
- Zhang W, To JPC, Cheng C-Y, Schaller GE, Kieber JJ.** 2011. Type-A response regulators are required for proper root apical meristem function through post-transcriptional regulation of PIN auxin efflux carriers. *The Plant Journal* **68**, 1–10.
- Zhang H, Zhang J, Wei P, et al.** 2014. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnology Journal* **12**, 797–807.
- Zhou Z, Sun L, Zhao Y, An L, Yan A, Meng X, Gan Y.** 2013. Zinc Finger Protein 6 (ZFP6) regulates trichome initiation by integrating gibberellin and cytokinin signaling in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **198**, 699–708.
- Zhou WJ, Yoneyama K, Takeuchi Y, Iso S, Rungmekarat S, Chae SH, Sato D, Joel DM.** 2004. In vitro infection of host roots by differentiated calli of the parasitic plant *Orobanche*. *Journal of Experimental Botany* **55**, 899–907.
- Zuckerkindl E, Pauling L.** 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins. *Evolving genes and proteins*. Elsevier, 97–166.
- Zürcher E, Liu J, di Donato M, Geisler M, Müller B.** 2016. Plant development regulated by cytokinin sinks. *Science (New York, N.Y.)* **353**, 1027–1030.





## **ANNEXES**



# Annexes

## Annexe 1. Séquences en acides aminés des récepteurs HK de *P. ramosa*, *O. cumana* et *A. thaliana*.

Les domaines CHASE sont en rouge, les domaines Histidine Kinase (HK) en bleu et les domaines correspondant aux Régulateurs de Réponse (RR) sont en vert.

> *Phelipanche ramosa\_HK3*

MHLLHIIGFGLKVGHLFLCCWFLSLISLNWLSNESIMTTKTSLLGGRGRIWMRLGGRVSNCGYKIHYYHSQYIGSRRVNKNWW  
RKVLIAWIVFIVASVTAFWYMWSTQAVEKRDTLASMCDERARMLQDQFNVMNHIQAMSV**NPSAIDQSTFARYTERTSFERPL**  
**TSGVAYAVRVLHTEREQFEIQGWTIKRMKDKVEKNPVRKDYDPKDELESPVQEEYAPVIFAQEIVAHVISVDVLSGKEDRENV**  
**LRARESGKGVLTAPFRLLKTNRLGVILTFVYKGDLPVDATHTQRIQETAGYLGGFIDIESLVEKLLHQLASKQTILVNVYDTTNF**  
**SHPISMYGSNTSSAGMHVSYLNFQDPPFRKHEMH**CRFKQKQPCCAAIFTSVGLVISLLVAQIFYATVNRIAKVEDDYHAMEELK  
KRAEAADVAKSQFLAT**VSHEIRTPMNGVLGMLQMLMDTRLDETQQDYVRTARESGKALVSLINEVLDQAKIESGKLEAVSFD**  
**LRILDDVLSLFSGKSQDKKVELAVYVSSKVPSTLVGDPGRFRQIVTNLVGNSIKFTDKGHIFVTVHLVEEVEIESETDPSSSL**  
**GLPVVDRRRSWSGFRSFCQETSTSPSSSDQVNIIVSVEDTGGIPIEAQSRVFNPFMQVGPSITRTHGGTGIGLSISKCLVHLMK**  
**GEIGLASTPHTGSTFTTAVFTTFNEQTSQQINNQSNSISSEFREM**RALLVDSNPVRAEVSKYHIQRLGIDVEVSDIELGFTGLS  
**PRTAPTHMVFIEEIIWDKNLGMFSVLINLNSKDCGVTPKTLILSNYASSNRTSSSTSGVTPFVVKPLRASMLAATLQRAM**GV  
RGNRGNQELHKLSSLNLLQGR**KILVDDNPVNLVAAGCLKYGADVVNADRGQKAIKLTTPHLYDACFMDIQMPMDGFE**  
**ATRQIREIECRIQWHRAWRTLRLGSLWKCFELACADFGHDCRYPGNSMLQVWNGWLRQLTVGRPTLSSFTLFSHGAGESLKA**  
**PPKVYILTVHIFAYW**KKRKRKIVLKGNNIKVEILCGDFCELLGMKPCSIIRDLICMMAIRLVKPINVDNVFIVYVLEFEK

> *Phelipanche ramosa\_HK4*

MLFISAKIYDRMDGKQKDRRKEVLVSMCDQARMLQDKFSVSINHVHALAILVSTFHYCK**NPSAIDQETFAEYARTAFERPLLS**  
**GVAYAQRILVSEREEFERRHGWIRRTMEKEPSPVRDEYAPVIFSQETVSYIESLDMMSGEEDRENILRARATGKAVLTPSPFLL**  
**NSHLGVVLTFFPVYKQFLPTNPTVKERIEATAGPGGSDFVESLVENLMGQLAGNQAIVNVYDTTNSSDPLIMYGHLAGDGDVSL**  
**KHVSGLDFGDPFRKHEMI**CRYLQEAPTSIALQTAGFVFMIGFLVGYMGYSASVSHIVKVEDDFNKMQLKVQAEAAADVAKSQFL  
AT**VSHEIRTPMNGILGMLQLLLDTELSSTQRDFAQTAQGCGEALITLINEVLDRAKIEAGKLELEAVPFDLRSILDDVLSLFSSEK**  
**RQKGIELAVFVSDKVPDIVMGPGRFRQVIINLVGNSVFKTEEGHIFVQVHLAEPKSMKDSKSTLSIGESDGPKSCTRPFNTL**  
**SGKVALADNRSSWETFKHLDAEFLYDTSDDIMTNNCPNVALTVCVEDTGIGIPEQAQKRIFSPFMQADSSTSRNYGGTGIGLSI**  
**SKCLVELMGGKMSFISYPIQIGSTFSFVFEFQR**CERSAVIGVSKSLSGDLPIAFKGL**KALVVDGKPVRAAVTRYHLRRLGIEAEAV**  
**GSIRAAIGLYANNEKLPDMFLVEKDTWISSEDDNSMHLNWRQNGPPYKPKLILLATNITLSESNKARSAGFSDTVIMKPLRS**  
**SMLAACLEQVVLGIGRKNGRSAANGSNLHGLLGGKILVDDNLVNRVAAGALKKFGADVQCAESGQEAALKWLQIPHDFDA**  
**CFMDIQMPMDGFEATCLIREMESKANMQTNRGTTNNREWHIPILAMTADVIHATLDECLKYGMDGYVSKPFQEKSLYQAVA**  
**KFFESKPISSKTE**

> *Orobanche cumana\_HK3*

MSLLDIIGFGLKVGHLILLVCYWFLSLISLNWLSNERSMSNDDKTGTGQIWIKLLDRVSKCVYKIHYYHCQYIGWRRVRKNWWWR  
KVLIAWIGLGIASLTAFWYISSQAMEKRDTLASMCDERARMLQDQFNVMNHIQAMSVMSIFHHGK**NPSAIDQTTFARYTERT**  
**SFERPLTSGVAYAVRVLHTEREQFEVQGWTIKRMKDKVEKTPVHEDEYDQADLEPSPVQDEYAPVIFAQEIVAHVISVDVLSGK**  
**EDRENVLRARESGKGVLTAPFRLLKTNRLGVILTFVYKGDISADATPAERIQETAGYLGGFIDIESLVEKLLHQLASKQAILNVV**  
**YDTTNFSSHPISMYGSNTSPDGMHRVSSLNFQDPPFRKHEMH**CRFKQKQWPWCAAIFTSIGILVISLLVAQIFYATVNRIAKVEDDYH  
AMEELKRAEAADVAKSQFLAT**VSHEIRTPMNGVLGMLQMLMDTCLDETQQDYVRTARESGKALVSLINEVLDQAKIESGKLEL**  
**EAVTFDLRAILDDVLSLFSGKSQDKKVELAVYVSSKVPSTLVGDPGRFRQIVTNLVGNSIKFTDKGHIFVTVHLVEEVWETEAE**  
**DTTSSLSGLPVVNRGWSGFKSFDQDMSTSFSLPSSADQVTVVSVEDTGGIPIEAQSRVFNPFMQVGPSITRTHGGTGIGL**  
**SISKCLVQLMRGEIGLSTPQVSTFTTAVFTT**SNDETSQQVGNQLNSISSGEFRGMRALLVDPNPVRAKVEYHIIHRLGIDVE  
**VVSDISLGSGLRTRTARTDMVIEEIIWDKNLGMFSVLLNEVSKDCVAPKTLILSNSTGFNRTGLVSTTSGVTPFVVKPL**  
**RRSMIAASLQRAM**GVRGGDRGSRRELHKLSSLNLLQGR**KILVDDNMVNLVAAGALKKYGADVLLAVSGKEAIVSLTPHFLD**  
**ACFMDIQMPMDGFEATRRIRDMESSIEKIGDSGELSVEAYGNVSNWHVPILAMTADVIQATNEACSKCGMDGYVSKPFQADQI**  
**YREVSRRFQTLDPDENH**

> *Orobanche cumana\_HK4*

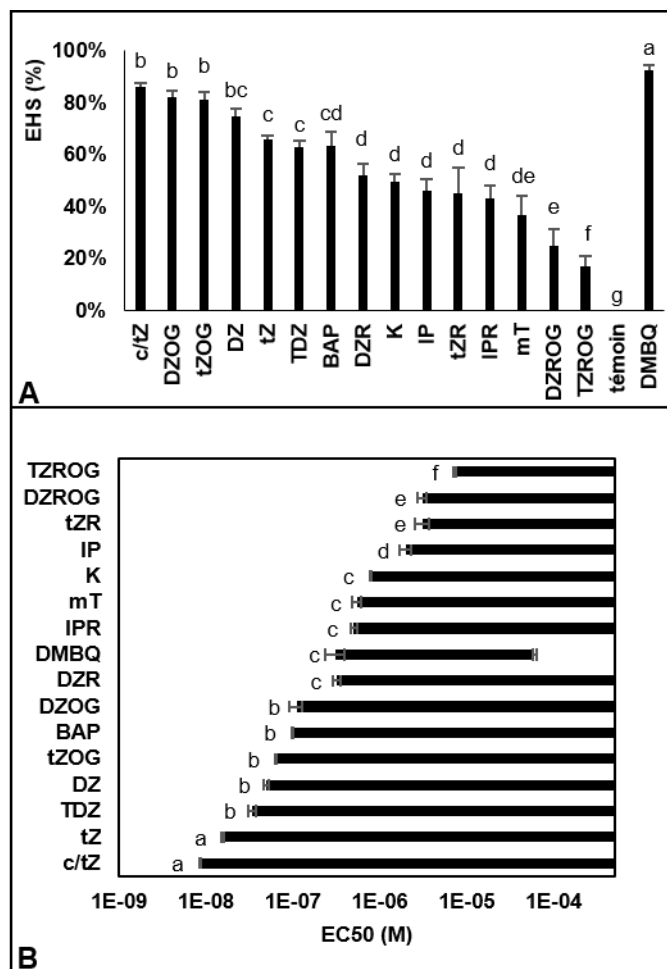
MGEKRQGGYHVPLNEQLGTTKYSALHRASDTRFLKVVVMIVLVSAYVYKRMKQKQKERTVLSMCDQARMLQDQFS  
VSVNHVHALAILVSTFHYCK**SPSAIDQETFAEYARTAFERPLLSGVAYAQRILVSEREEFERRNGWTIRTEKEPSPVRDEYAPV**  
**IFSQETVSYIESLDMMSGEEDRENILRARATGKAVLTPFRLLNSHLGVVLTFFPVYKSKLPPNPTVEERIGATAGYLGGAFDVES**  
**LVENLLGQLAGNQAIVNVYDTTNSSDPLIYHLSQDGDMSLQHVSGLDGDPFRKHEMI**CRYLQEAPTSWFVLTQTFVFIG  
CLLGYMGYSASVSHIVRVEDDFNKMQLKVQAEAAADVAKSQFLAT**VSHEIRTPMNGILGMLQLLLDTELSSTQRDFAQTAQGCGE**  
**ALITLINEVLDRAKIEAGKLELEEVFDRSILDDVLSLFSSEKSRQKGIELAVFVSDKVPDIVMGPGRFRQVIINLVGNSVFKTEE**  
**GHIFVQVHLAEPKPIKDGKAGTFLNGIPETCSLFPNTLSGKQSDNRSSWETFKHLDDDELYGASTDNTNNSNHTVLTVN**  
**SSTSRNRYGGTGIGLSISKCLVQLMGGHMSFVSRPQIGSTFSFVFEFQR**CEKSAVIGVSKSLSDDLPTAFKGL**KALVVDGKPVRS**  
**VTMYHLRRLGIEAEAVSSISTALALYAKYGSLSISNEKLPDMFLVEKDTWAGEEDFSMQLSNWTVQNGRSCVLPRIILLATNITR**  
**SESDKSKAAGFADTVIMKPLRSSMVAACLQVVLGMGRKNGKRSRNLHCLLGGKILVDDNLVNRVAAGSLRKFADVQC**  
**AESGHEALKWLQIPHDFACFMDIQMPLMDGFEATRLIREMESKANKGTTKSNRPWHLPIAMTADVIHATLDECLKCGMDGY**  
**VSKPFQEKSLYQAVAKFFETK**

>Arabidopsis thaliana\_HK3

MSLFHVLGFGVKIGHLFWMLCCWFVSWFVNDNGIEDKSGLLVGSVGDLEKTKMTTLKKNKMWFWNKiSSSGLKIPSFYSYQFLGS  
VKFNKAWWRKLVVVVVVFWVLSIWTFWYFSSQAMEKRKETLASMCDERARMLQDQFNVMNHVQAMSILISTFHHGK**IPSAI**  
**DQRTFSEYTDRTSFERPLTSGVAYAMRVLHSEREEFERQQGWITIRKMYSLQNPVHKDDYDLEALEPSPVQEEYAPVIFAQDT**  
**VSHVVSLDMLSGKEDRENVLRARSSGKGVLTAPFPLIKTNRLGVILTFVYKRDLPNATPKERIEATNGYLGGVFDIESLVENL**  
**LQQLASKQTILVNVYDITNHSQPISMYGTNVSADGLERVSPLIFGDPLRKHEMR**CRFKQKPPWPVLSMVTSGILVIALLVAHIIHA  
TVSRIHKVEEDCDKMKQLKKAEEADVAKSQFLAT**VSHEIRTPMNGVLGMLHMLMDELDTVQQDYVRTAQASGKALVSLINEV**  
**LDQAKIESGKLEEEVRFDLRGILDDVLSLFSSKSQQKGVELAVYISDRVPDMLIGDPGRFRQILTNLMGNSIKFTEKGHIFVTVH**  
**LVDELFEIDGETASSPESTLSGLPVADRQRSWENFKAFSSNGHRSFEPSPDINLIVSVEDTGVGIPVEAQSRIFTPMMQVGP**  
**SRTHGGTGIGLSISKCLVGLMKGEIGFSSTPKVGTFTTFAVFSNGM**QPAERKNDNNQPIFSEFRGM**KAVVVDHRPARAKVSW**  
**YHFQRLGIRVEVPRVEQALHYLKIGTTTTNMLIEQEIWNREADDFIKKLQKDPLFLSPKLILLANSVSEISEALCTGIDPPVIVK**  
**PLRASMLAATLQRGL**GIGIREPPQHKGPPALILRNLGR**KILVDDNNVNLVAAAGALKKYGADVCAESGIKAIKLLKPPHEFD**  
**ACFMDIQMPMDGFEATRIRDMEEEMNKRIKNGEALIVENGNKTSWHLPVLA**MTADVIQATHEECLKCGMDGYVSKPF**EAE**  
**QLYREVSRRFFNSP**SDTES

> Arabidopsis thaliana\_HK4

MRRDFVYNNAMFNPLTTHYSSDMNWALNNHQEEEEPRRIEISDSELENLKSSDFYQLGGGGALNSSEKPRKIDFWRSGLM  
GFAKMQQQQLQHSVAVKMNNNNNDLMGNKKGSTFIQEHRALLPKALILWIIIVGFISGGIYQWMDANKIRREEVLVSMCDQR  
ARMLQDQFSVSNHVHALAILVSTFHYHK**NPSAIDQETFAEYARTAFERPLLSGVAYAEKVVNFEREMFERQHNWVIKMDRG**  
**EPSVPRDEYAPVIFSQDSVSYLES**LDMMSGEEDRENILRARETGKAVLTSPFRLLETHHLGVVLTFFPVYKSSLPENPTVEERIAA  
**TAGYLGGAFDVESLVENLLGQLAGNQAIVVHYDITNASDPLVMYGNQDEEADRSLSHESKLDGDFPRKHKMICRYHQKAPI**  
PLNVLTTPVPLFFAIGFLVGYLYGAAMHIVKVEDDFHEMQELKVRAEADVAKSQFLAT**VSHEIRTPMNGILGMLAMLLDTELSST**  
**QRDYAQTAVCGKALIALINEVLDRAKIEAGKLELESVPFDIRSILDDVLSLFSEESRNKSIELAVFVSDKVPEIVKGDSDGRFRQIII**  
**NLVGNSVKFTEKGHIFVKVHLAEQSKDESEPKNALNGGVSEEMIVSKQSSYNTLSGYEADGRNSWDSFKHLVSEEQSLSEF**  
**DISSNVRLMVSIEDTGIGIPLVAQGRVFMFPMQADSSTSRNYGGTGIGLSISKCLVELMRGQINFISRPHIGSTFWFTAVLEKCDK**  
CSAINHMKKPNVEHLPSTFKGM**KAVVDAKPVRAAVTRYHMKRLGINVDVVTSLKTAVVAAAAFERNGSPLTPKPLDMILVEK**  
**DSWISTEDNDSEIRLLNSRTNGNVHHKSPKLALFATNITNSEFDRAKSAGFADTVIMKPLRASMIGACLQVLELRKTRQQHPE**  
GSSPATLKSLLTG**KILVDDNIVNRRVAAGALKKFGAEVVAESGQVALGLLQIPH**TFD**ACFMDIQMPQMDGFEATRQIRMMME**  
**KETKEKTNLEWHLPI**LA**MTADVI**HATYEECLKSGMDGYVSKPF**EENLYKSVAKSFKPNPIS**SS



**Annexe 2. Activité haustoriogène des cytokinines chez *S. hermonthica*.**

**A.** Pourcentage maximal d'induction des EHS à l'apex des racines de graines germées de *S. hermonthica* évalué après 48h de traitement. Les concentrations optimales des CK utilisées sont : tZROG ( $10^{-6}$  M), DHZROG ( $10^{-6}$  M), tZOG ( $10^{-8}$  M), DHZ ( $10^{-8}$  M), tZ ( $10^{-8}$  M), TDZ ( $10^{-8}$  M), BAP ( $10^{-8}$  M), DHZR ( $10^{-7}$  M), K ( $10^{-7}$  M), iP ( $10^{-6}$  M), tZR ( $10^{-6}$  M), iPR ( $10^{-7}$  M), mT ( $10^{-7}$  M), DHZROG ( $10^{-6}$  M), tZROG ( $10^{-6}$  M). Le DMBQ est utilisé ici comme témoin positif de l'induction haustoriale chez *S. hermonthica*. **B.** L'intervalle de concentrations de l'activité des CK correspondant aux concentrations efficaces médianes. Les moyennes sont représentées avec leurs erreurs standards (n=6). Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes du contrôle (Tukey-HSD,  $p < 0,01$ ).





**Titre :** Implication des cytokinines dans la formation de l'haustorium chez la plante parasite *Phelipanche ramosa*

**Mots clés :** Cytokinines, extraits rhizosphériques, haustorium, microcals, orobanche, signalisation

**Résumé :** Le mode de vie hétérotrophe des plantes parasites repose sur le développement de l'haustorium, organe infectieux essentiel pour l'exploitation des ressources de l'hôte. Alors qu'il a été démontré que le développement de l'haustorium était initié par des composés phénoliques (HIFs : Haustorium Inducing Factors) dérivés des racines de la plante hôte chez les plantes hémiparasites, l'induction de la formation de l'haustorium reste encore méconnue chez les parasites non chlorophylliens obligatoires, comme *Phelipanche ramosa*. Récemment, il a pu être démontré que la formation de structures haustoriales précoces (EHS) chez *P. ramosa* était induite par les extraits rhizosphériques de *Brassica napus* qui contiendraient notamment un HIF de type cytokinine. Ces travaux de thèse ont permis d'une part de développer un système d'étude de l'haustoriogenèse chez *P. ramosa* basé sur l'utilisation de microcals infectieux sensibles aux cytokinines et ouvrant la voie vers des études de validation fonctionnelle. D'autre part, nous avons pu montrer que les extraits rhizosphériques de plantes hôtes (*B. napus*,

*Solanum lycopersicum*, *Arabidopsis thaliana*) contiennent toutes un double signal haustoriogène impliquant des composés biochimiquement distincts qui augmentent l'agressivité du parasite envers les plantes hôtes de manière synergique. La présence dans l'un de ces signaux d'un bouquet de cytokinines actives constitutivement exsudées par la plante hôte est démontrée. Ces composés sont perçus par les récepteurs histidine kinase de *P. ramosa* déclenchant une voie de signalisation impliquant des gènes marqueurs des cytokinines (*PrRR5*, *PrCKXs*) et de la différenciation cellulaire (*PrZFP6*, *PrTRN2*). Le second signal haustoriogène impliquerait une molécule s'apparentant aux triterpènes et dépend de la formation de peroxyde d'hydrogène. Il induit une voie de signalisation distincte de celle déclenchée par les cytokinines mais qui converge vers le même intégrateur du signal *PrTRN2*, présentant ainsi l'induction haustoriale de *P. ramosa* comme un signal complexe.

**Title:** Cytokinins involvement in haustorium formation in the parasitic plant *Phelipanche ramosa*

**Keywords:** Cytokinins, haustorium, microcalli, orobanche, receptors, rhizospheric extracts, signaling

**Abstract:** The heterotrophic lifestyle of parasitic plants relies on the development of a haustorium, a key infectious organ required for the spoliation of host's resources. While haustorium development in hemiparasitic plants was shown to be triggered by phenolic compounds (HIF: Haustorium Inducing Factor) derived from host roots, the induction of haustorium formation remains largely misunderstood in obligate achlorophyllous species such as *Phelipanche ramosa*. Recently, it was shown that the development of early haustorial structures (EHS) in *P. ramosa* is triggered by *Brassica napus* rhizospheric extracts which contain cytokinins-like molecules. On one hand this thesis work allowed to develop an efficient system to study haustoriogenesis in *P. ramosa* using cytokinin-sensitive infectious microcalli and which can further be used as a tool for functional validation studies. On the other hand, this work showed that rhizospheric

extracts from host plants (*B. napus*, *Solanum lycopersicum*, *Arabidopsis thaliana*) contain two distinct haustorium inducing signals which synergistically increase the aggressiveness of the parasitic plant towards host plants. One of these signals contains a small group of active cytokinins constitutively exuded from the host roots. These compounds are recognized by *P. ramosa* histidine kinase receptors and trigger a signaling pathway involving cytokinin marker genes (*PrRR5*, *PrCKXs*) and cell differentiation genes (*PrZFP6*, *PrTRN2*). The second haustorium inducing signal contains triterpenoid-like molecules and relies on hydrogen peroxide formation. It induces a signaling pathway distinct from the cytokinin one but converging toward the same *PrTRN2* signal integrator. This thus present the cue governing haustorium induction as a complex signal.