



HAL
open science

Régulation des échanges de nutriments au sein de la mycorhize à arbuscules

Marine Forges

► **To cite this version:**

Marine Forges. Régulation des échanges de nutriments au sein de la mycorhize à arbuscules. Sciences du Vivant [q-bio]. 2015. hal-02792846

HAL Id: hal-02792846

<https://hal.inrae.fr/hal-02792846>

Submitted on 5 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université de Bourgogne
Dates de soutenance : 17 et 18 juin 2015
Ecole Doctorale Environnement-Santé
Master 2 Recherche Signalisation Cellulaire et Moléculaire
2014 – 2015

Par : Marine FORGES

Régulation des échanges de nutriments au sein de la mycorhize à arbuscules



UMR Agroécologie 1347 INRA, Agrosup Dijon, U. de Bourgogne,
pôle Interactions Plantes-Microorganismes, ERL 6300 CNRS
17 Rue Sully
21000 Dijon (France)

Maîtres de stage : Daniel WIPF et Pierre-Emmanuel COURTY
Enseignant responsable du diplôme : David WENDEHENNE

Sommaire

Abréviations	2
I. Introduction	3
1. Symbiose : interaction entre deux organismes	3
2. Symbioses mutualistes entre microorganismes telluriques et plantes	3
A. Nodosités : interactions entre rhizobiums et légumineuses	3
B. Mycorhize à arbuscules : interaction entre champignons et plantes	4
3. Projet de recherche	8
A. Objectifs	8
B. Stratégies d'étude	8
II. Matériels et méthodes	9
1. Etude 1 : Flux de carbone et d'azote dans un réseau mycélien et expression des gènes codant pour des transporteurs de sucres et d'ammonium à l'interface du réseau mycélien	9
A. Organismes	9
B. Microcosmes	10
C. Substrat	10
D. Conditions de culture	10
E. Récolte	10
F. Mesures	11
G. Analyses statistiques	13
2. Etude 2 : Régulation spatiale des transporteurs de sucres par le biais de l'endocytose	13
A. Organismes	13
B. Substrat et milieu de culture	13
C. Conditions de culture et traitements	14
D. Récolte des plantes	14
II. Résultats	15
1. Etude 1 : Flux de carbone et d'azote dans un réseau mycélien et expression des gènes codant pour des transporteurs de sucres et d'ammonium à l'interface du réseau mycélien	15
2. Etude 2 : Régulation spatiale des transporteurs de sucres par le biais de l'endocytose	18
A. Effet de la perturbation de l'endocytose sur l'absorption de saccharose	18
B. Effet de la perturbation de l'endocytose sur la mise en place de la mycorhize à arbuscules	18
III. Discussion et conclusions	19
1. Etude 1 : Flux de carbone et d'azote dans un réseau mycélien et expression des gènes codant pour des transporteurs de sucres et d'ammonium à l'interface du réseau mycélien	19
2. Etude 2 : Régulation spatiale des transporteurs de sucres par le biais de l'endocytose	21
A. Effet de l'endocytose sur l'absorption de saccharose à l'échelle cellulaire	21
B. Effet de la perturbation de l'endocytose sur la mise en place de la mycorhize à arbuscules (plantes entières)	22
Références bibliographiques	22

Abréviations

A / a : intensité arbusculaire du système racinaire / de la partie mycorhizée ; ADN_c : Acide DésoxyriboNucléique ; AMT : AMmonium Transporter ; APP : Appareil de Pré-Pénétration ; ARN : Acide RiboNucléique ; ATP : Adénosine TriPhosphate ; C : carbone ; CaCl₂ : chlorure de calcium ; CaMV 35S : Cauliflower Mosaic Virus 35S ; CF-IRMS : Continuous-Flow Isotope-Ratio Mass Spectrometer ; CMA : Champignon Mycorhizien à Arbuscules ; dNTP : désoxy-Nucléotide Tri-Phosphate ; DO : Densité Optique ; AE : Analyseur Élémentaire ; EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique ; EPA : Espace PeriArbuscular ; F : fréquence de mycorhization ; FAD : Flavine Adénine Dinucléotide ; GFP : Green Fluorescent Protein ; GS-GOGAT : Glutamine Synthétase / Glutamine – Oxoglutarate Amino Transférase ; HC : Hyphal Compartment ; INV SUC : INVertase synthase SUCrose ; IPM : Interaction Plante-Microorganisme ; KOH : hydroxide de potassium ; LA-HC : Low Affinity – High Capacity ; LC-HF : Low Capacity – High Affinity ; LCoS : LipoChitooligoSaccharide ; M : intensité globale de mycorhization ; MA : Mycorhize à Arbuscules ; MER : Mycélium Extra-Radiculaire ; MES : acide 2-(N-morpholino)-éthanesulfonique ; MIR : Mycélium Intra-Radiculaire ; MPA : Membrane PeriArbuscular ; Mo : Molybdène ; MP : Membrane Plasmique ; MS : Murashige and Skoog ; MST : MonoSaccharide Transporter ; N : azote ; N₂ : diazote ; NAD / NADP : Nicotianine Adénine Dinucléotide (Phosphate) ; NH₄⁺ : ammonium ; NO₃⁻ : nitrate ; NR : Nitrate Réductase ; P : Phosphate ; PCR : Polymerase Chain Reaction ; RHC : Root Hyphal Compartment ; RMC : Réseau Mycorhizien Commun ; RT : Reverse Transcription ; SUT : SUCrose Transporter ; TY : Tryptone-Yeast.

I. Introduction

1. Symbiose : interaction entre deux organismes

Dans leur environnement les organismes vivants sont en interaction permanente : les plantes sont sans cesse confrontées à des microorganismes bénéfiques ou pathogènes. Certaines de ces interactions sont stables dans le temps et ont un impact sur le déroulement de la vie de l'un ou des deux organismes impliqués. D'un point de vue étymologique ces interactions peuvent être nommées « symbiose » puisque ce terme provient du grec $\sigma\upsilon\nu$ (syn), « avec », « ensemble », et $\beta\iota\omicron\upsilon\tilde{\nu}$ (bios), « vivre », et signifie donc « vivre avec », « vivre ensemble ». Cependant, d'un point de vue biologique, Anton De Bary a été le premier biologiste à distinguer (De Bary, 1879) le parasitisme, au cours duquel un seul partenaire tire profit de l'interaction (développement non contrôlé des microorganismes pathogènes conduisant souvent à la maladie de l'hôte), le commensalisme où l'un des partenaires tire des bénéfices sans causer de tort à l'hôte, et le mutualisme où les deux partenaires jouissent de bénéfices réciproques (Smith and Read, 2008). L'usage actuel que nous adopterons tend à réserver le terme symbiose aux interactions à bénéfices réciproques. Ce type d'interaction permet aux organismes d'acquérir de nouvelles fonctions biologiques sans les inventer *de novo*. Ainsi, il semble que ce genre d'interaction à bénéfices réciproques soit à l'origine de grands bonds évolutifs comme l'acquisition des mitochondries par les eucaryotes et des plastes par les végétaux.

Il existe une très grande diversité de symbioses impliquant tous types d'organismes et différents degrés d'association. Certaines interactions symbiotiques se distinguent par le fait que l'un des partenaires réside, entièrement ou partiellement, à l'intérieur des cellules de l'autre partenaire, d'où leur nom d'endosymbioses. Ces interactions requièrent la mise en place de mécanismes de perception, de reconnaissance et de régulation sophistiqués. Chacun des deux partenaires doit être en mesure de percevoir l'autre et de le reconnaître en tant qu'organisme symbiotique ; de plus le partenaire dont les cellules sont envahies doit être en mesure de contrôler et de réguler cette infection. Les endosymbioses représentent donc un stade très avancé d'association entre deux organismes et nécessitent la mise en place de processus physiologiques et moléculaires spécifiques.

Dans le règne végétal, parmi les symbioses les plus importantes, on distingue les endosymbioses racinaires formées entre des plantes, vasculaires ou non, et certains microorganismes telluriques. Ces interactions se caractérisent par la présence dans certaines cellules de la racine de microorganismes bactériens ou fongiques formant des structures appelées symbiosomes. Les symbiosomes constituent pour la plante de nouveaux « organites » qui sont le site des échanges de nutriments entre les deux partenaires. Au cours de ces interactions, les microorganismes fournissent au végétal hôte des composés nécessaires à leur croissance. En retour, la plante fournit des composés carbonés issus de la photosynthèse. D'un point de vue évolutif, ces endosymbioses racinaires et notamment la plus répandue, la symbiose mycorhizienne, sont suspectées d'avoir joué un rôle crucial dans la colonisation des terres en mettant à la disposition des plantes les composés minéraux indispensables à leur croissance et peu disponibles dans les sols primitifs pauvres. Ce type de symbiose implique un photosymbiote, la plante, et un mycosymbiote, le champignon.

2. Symbioses mutualistes entre microorganismes telluriques et plantes

A. Nodosités : interactions entre rhizobiums et légumineuses

Les bactéries capables de fixer l'azote (N) sont dites diazotrophes : elles existent sous forme « libre » ou « en symbiose ». Comme les plantes ne sont pas en mesure d'utiliser l'N sous forme de N_2 et ne peuvent pas le réduire, certaines d'entre elles, et plus particulièrement les légumineuses, forment alors une symbiose avec des bactéries fixatrices d'azote appelées les *Rhizobiums*. La spécificité d'hôte est ici beaucoup plus élevée que pour la symbiose de type mycorhize à arbuscules (MA : cf. chapitre suivant). Contrairement aux champignons MA (CMA), la symbiose entre une plante et des bactéries fixatrices d'azote est facultative pour les deux organismes. Dans les sols riches en éléments nutritifs, les plantes et les rhizobiums ne vivent pas en symbiose. C'est seulement lorsque l'N dans le sol est limité que les plantes interagissent avec les Rhizobiums (Kondorosi *et al.* 2013). En contrepartie les plantes fournissent des sucres provenant des photoassimilats.

Ces bactéries sont Gram-négatives et vivent en aérobie et, pour la plupart, sont mobiles grâce à la présence d'un ou plusieurs flagelles. Bien qu'elles puissent vivre en conditions non-symbiotiques dans les sols, les Rhizobiums fixent généralement l'N uniquement au cours de la symbiose.

B. Mycorhize à arbuscules : interaction entre champignons et plantes

Le terme mycorhize est d'origine grecque, « mukes » pour champignon et « rhiza » pour racine, ce qui désigne l'interaction entre la racine d'une plante et un champignon du sol. Ce type de symbiose se retrouve de façon ubiquitaire dans les environnements naturels puisqu'on estime que plus de 90 % des plantes terrestres sont capables d'être mycorhizées (Smith and Read, 2008). Il existe différents types de mycorhizes, en fonction de la morphologie de l'interaction (structures mises en place au niveau des racines), caractérisés par une interaction superficielle (ectomycorhize : incapacité du mycelium à pénétrer dans les cellules racinaires) ou interne (endomycorhize telle que la MA : pénétration du mycélium dans les racines). Il existe également les ectendomycorhizes qui ont des structures intermédiaires à ces deux types.

La MA est une interaction symbiotique ancienne et très répandue entre des CMA appartenant à l'embranchement des Gloméromycètes (Schüssler and Walker, 2010) et les racines de la grande majorité des plantes vasculaires, dont la plupart des plantes cultivées. La symbiose MA remonte à la première apparition des plantes terrestres (plus ancien fossile enregistré), il y a environ 450 millions d'années (Ordovicien), et est considérée comme ayant joué un rôle majeur dans la colonisation des terres et l'évolution des plantes (Redecker *et al.* 2000 ; Smith and Read, 2008). La MA ne présente pas de spécificité d'hôte marquée. Une plante donnée peut être mycorhizée par différentes espèces de champignons n'appartenant pas obligatoirement au même genre. De la même façon, une espèce de champignon est généralement capable de mycorhizer une grande variété de plantes n'appartenant pas au même taxon. De plus, il a été montré qu'un même individu fongique est capable de mycorhizer simultanément deux plantes adjacentes d'espèces différentes en formant ainsi un réseau mycélien commun (RMC). L'absence de spécificité stricte peut s'expliquer par le caractère obligatoire de la symbiose pour ces champignons puisqu'ils ont besoin de la plante pour compléter leur cycle de vie. Pour assurer sa multiplication, le CMA est contraint d'établir une relation symbiotique avec les plantes de son environnement immédiat, ce qui favorise un large spectre d'hôte.

Cette interaction mutualiste est basée sur des échanges réciproques entre la plante et le partenaire fongique. La plante fournit des glucides au CMA, et en retour celui-ci apporte à la plante de l'eau et des nutriments notamment du phosphate (Graham, 2000). En outre, le CMA contribue à la protection de la plante en apportant une certaine tolérance à divers stressés biotiques (agents pathogènes) et abiotiques (manque d'eau, sols pollués). L'importance écologique et agronomique de cette association de plantes fongique bénéfique unique est largement reconnue (Smith and Read, 2008 ; Gianinazzi *et al.* 2010 ; Fitter *et al.* 2011).

- Caractéristiques structurales et cycle de vie des CMA

La mise en place de la MA se déroule en trois phases :

- La *phase asymbiotique* (Figure 1A) durant laquelle la spore, même en l'absence d'une plante hôte, germe spontanément en formant de courts hyphes exploratoires et produit un ou plusieurs tubes germinatifs. Les spores représentent des propagules importantes contenant des lipides et des glucides de stockage (Beilby, 1980 ; Selvaraj and Subramanian, 1990). La croissance du CMA, très limitée, en absence de plante hôte ne dure que quelques jours et ne consomme que très peu des réserves carbonées de la spore (Bécard *et al.* 1992). Selon les espèces, le cytoplasme des hyphes germinatifs peut se rétracter dans la spore ou servir à former de nouvelles spores. Dans tous les cas, le CMA

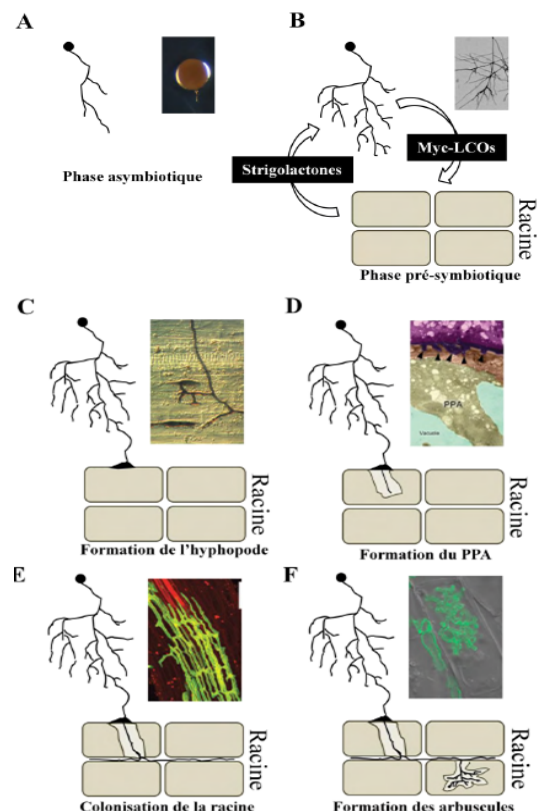


Figure 1 : Les différentes étapes de l'établissement de la mycorhize à arbuscules. A) Durant la phase asymbiotique la spore germe et développe des hyphes primaires. B) La phase pré-symbiotique voit les deux partenaires échanger des signaux, strigolactones et lipochitoooligosaccharides (Myc-LCOs). Le CMA entre en contact avec la racine de la plante et forme un hyphopode (Buée *et al.* 2000) C), puis s'immisce dans l'appareil de pré-pénétration (APP) développé par la plante. D) Enfin le CMA colonise la racine de façon intercellulaire E) et forme des structures intracellulaires hyper-ramifiées, F) les arbuscules (Pumplin *et al.* 2009).

maintient son potentiel de germination. Si une racine hôte est présente, les phases pré-symbiotique puis symbiotique se mettent en place.

- la *phase pré-symbiotique* (Figure 1B) commence lorsque le partenaire fongique a perçu la présence de son hôte et active son métabolisme et sa croissance. C'est une phase où sont échangés, avant tout contact physique, des signaux d'origines végétale et fongique. La perception des exsudats des plantes hôtes, parmi lesquels les strigolactones (phytohormone), qui reste le phénomène le plus documenté (Akiyama *et al.* 2005 ; Sbrana and Giovannetti, 2005 ; Besserer *et al.* 2006), permet l'induction de la ramification des hyphes, augmentant ainsi la probabilité d'un contact direct entre les deux symbiotes (Gomez-Roldan *et al.* 2008). Parallèlement, le CMA sécrète des signaux symbiotiques diffusibles, appelés facteurs Myc qui comprennent des lipochitoooligosaccharides sulfatés et non sulfatés simples (LCoS), qui stimulent la croissance des racines et leur ramification (Maillet *et al.* 2011). Un dialogue s'installe entre les partenaires ce qui modifie leur métabolisme et leur expression génique. Cela peut conduire à la mise en place d'une réponse morphologique adaptée pour favoriser l'interaction, telle que la ramification des hyphes, et la formation de racines latérales. Cette phase pré-symbiotique de la symbiose MA se termine une fois que les hyphes sont en contact avec l'épiderme racinaire.

- la *phase symbiotique* commence au contact de la racine où le champignon forme une structure particulière, l'appressorium (ou hyphopode, Figure 1C) (Genre *et al.* 2009 ; Bonfante and Genre, 2010 ; Heupel *et al.* 2010), correspondant à un renflement de l'hyphes qui permet un contact étroit entre la cellule fongique et les cellules épidermiques de la racine. Si les conditions sont favorables, la plante répond en développant dans la cellule située au contact de l'appressorium, un appareil de pré-pénétration (APP, Genre, 2005) permettant le passage du CMA (Figure 1D). Cet APP correspond à une profonde réorganisation du cytosquelette et forme une sorte de tunnel cytoplasmique dans lequel les hyphes du champignon s'immiscent (Genre, 2005). Le CMA colonise ensuite la racine *via* des hyphes intercellulaires (Figure 1E). La pénétration du CMA dans les tissus végétaux se fait de façon extrêmement contrôlée et requiert une participation active de la plante, qui met en place des réponses spécifiques. Une fois l'épiderme traversé, les hyphes fongiques se développent à l'intérieur de la racine. La symbiose devient effective avec le développement de structures fongiques particulières, les arbuscules, formées au sein des cellules du cortex racinaire (Figure 1F). L'arbuscule occupe la plus grande partie de la cellule hôte mais reste séparée de son cytoplasme par la membrane péri-arbusculaire (MPA) qui est en continu avec la membrane plasmique (MP) de la cellule végétale. Le développement de l'arbuscule et la sécrétion de la MPA créent un espace périarbusculaire apoplastique (EPA, Figure 1C) entre la MPA et la membrane fongique, qui est le site d'échanges réciproques de nutriments entre les deux partenaires et représente l'interface symbiotique (Délano-Frier and Tejada-Sartorius, 2008). Contrairement aux nodosités racinaires, la MA est un processus non synchrone où tous les stades de développement sont présents dans le système racinaire. En effet, le CMA se propage dans les tissus racinaires et il se développe simultanément un mycélium extra-radicalaire (MER) dans le sol. Le MER forme un réseau d'hyphes qui augmente considérablement la zone d'exploration du sol par les racines des plantes à la recherche d'éléments nutritifs supplémentaires (Smith and Read, 2008). En outre, le MER peut également servir à la colonisation d'autres racines *via* la formation d'hyphopodes. Enfin, le cycle de vie du CMA est complété par la formation de nouvelles spores qui se développent à partir du MER. Le processus de formation des arbuscules est un processus dynamique. Ces structures sont transitoires (une semaine maximum) et leur formation et leur dégénérescence sont continues au cours de la symbiose.

- Rôle de la MA

Les CMA jouent un rôle très important dans les écosystèmes à travers le cycle des nutriments (Barea and Jeffries, 1995 ; Wu *et al.* 2011; Yaseen *et al.* 2013). Les plantes mycorhizées peuvent explorer un volume de sol augmenté grâce au MER qui facilite l'absorption et la translocation de plus de nutriments que les plantes non-mycorhizées (Joner and Jakobsen, 1995 ; Guo *et al.* 2010). Les CMA jouent également un rôle important dans l'amélioration des propriétés physiques du sol. Cette amélioration des propriétés du sol pourrait être due à la production d'une glycoprotéine insoluble appelé glomaline (Gadkar and Rillig, 2006) qui joue un rôle important dans la stabilité du sol. Le CMA peut favoriser la croissance de la plante, non seulement en fournissant les nutriments nécessaires au développement des plantes, mais aussi en aidant la plante à tolérer des stress. Grâce à cette symbiose de type mutualiste, la plante est protégée contre divers stressés qu'ils soient abiotiques ou biotiques.

L'effet bénéfique des CMA sur la croissance des plantes est largement documenté dans des environnements stressants. Une multitude de mécanismes sont impliqués, tels que la régulation de la nutrition des plantes, la production d'hormones et d'enzymes antioxydantes, et la régulation des différents processus physiologiques (Nadeem *et al.* 2014).

En milieu naturel les CMA forment des réseaux (RMC) qui connectent entre elles des plantes voisines, parfois d'espèces différentes. Le développement de ces réseaux crée un pool commun de nutriments et de substrats carbonés qui peuvent circuler d'une plante à l'autre *via* le CMA. Cependant l'équilibre de la balance bénéfique/coût de la symbiose dépend du couple plante/CMA et de l'état physiologique de la plante. Ainsi au sein d'un réseau, les plantes ne profitent pas d'échanges équilibrés, certaines tirant un profit important et d'autres pouvant subir une perte énergétique (Wlader *et al.* 2012). L'existence de ces réseaux mycéliens a un impact déterminant dans les relations et la compétition entre plantes au sein d'un même environnement, et influe, par là même, sur la composition de la flore de surface (Selosse *et al.* 2007).

- Echanges de nutriments au cours de la mycorhize à arbuscules

De par sa structure et son organisation, l'arbuscule est considérée comme le lieu privilégié des échanges de nutriments entre les partenaires. La MA est basée sur un « commerce équitable » en terme d'échanges d'éléments nutritifs entre le CMA et la plante hôte (Smith and Read, 2008). Certains nutriments minéraux restent peu accessibles pour les racines des plantes. Les échanges se faisant *via* des transporteurs spécifiques. Le champignon « tire » du sol les minéraux, tels que le phosphore, l'azote, mais aussi l'eau, qu'il fournit à la plante en les transportant à l'interface biotrophe. En échange, la plante fournit au champignon des sucres issus de la photosynthèse. Le MER est peu capable de prélever les composés carbonés à partir du sol, et c'est donc le mycélium intra-radiculaire qui absorbe, depuis la plante, la quasi-totalité des composés carbonés nécessaires au champignon. Le carbone « investi » par la plante dans la mycorhize est probablement transféré au partenaire fongique sous forme de saccharose ou de ses deux composants, le glucose et le fructose. Les sucres, synthétisés dans les feuilles, ont besoin d'être transportés à travers la plante, sous forme de saccharose, jusque dans les racines puis à travers les arbuscules. Ainsi, cohabitent dans le CMA un flux de minéraux du MER vers la plante et un flux de carbone de la racine vers le MER.

- Sources carbonées : les sucres

La plante fournit à ses partenaires microbiens plus de 20 % des photoassimilats qu'elle produit (Smith and Read, 2008). Le transfert de carbone de la plante au champignon a été démontré par Ho and Trappe (1973), qui ont montré une accumulation de ¹⁴C, dérivés de plantes exposé à du ¹⁴CO₂, dans les spores de CMA.

- Les voies de transport des sucres chez les plantes

Dans les plantes, le transport à longue distance des sucres de la source photosynthétique aux organes cibles comprend différentes étapes cruciales (Figure 2). La plante synthétise des sucres au niveau des feuilles, qui représentent les organes « sources ». Le sucre est transporté à longue distance *via* le phloème (van Bel, 2003) jusqu'aux tissus hétérotrophes : les organes « puits » comprenant également les organes non-végétaux comme le CMA (Rennie and Turgeon, 2009). Le transport à longue distance se fait selon l'hypothèse de Münch (1930), grâce aux différences de pression osmotique créées d'un côté par le chargement du phloème (haute pression) et d'un autre côté par le déchargement dans les organes cibles (basse pression) (Knoblauch and Peters, 2010). Les photoassimilats sont temporairement stockés au niveau des vacuoles des cellules du mésophylle foliaire ou directement exportés vers d'autres tissus (Figure 2). Le saccharose est un disaccharide très stable et constitue la forme de carbone transportée la plus abondante. Le saccharose peut être chargé dans le complexe cellule compagne/cellule criblée par deux voies différentes : *apoplastique* ou

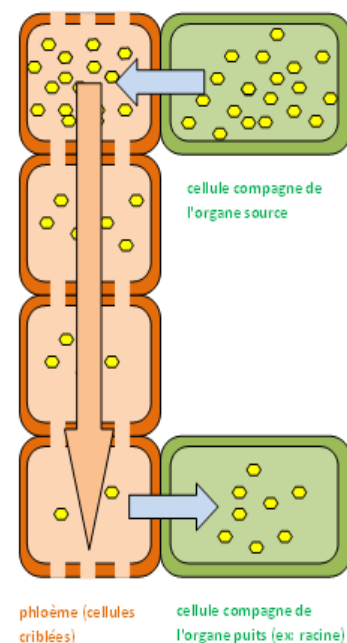


Figure 2 : Schéma simplifié du chargement/déchargement du saccharose (●) dans le phloème. Le phloème contient les glucides exportés à partir d'organes sources photosynthétiques vers les organes puits (racines, fleurs, ...). Le saccharose constitue le principal glucide pour ce transport longue distance par le phloème.

symplastique (Figure 3). Pour la voie *apoplastique*, le saccharose est exporté dans l'apoplasme puis importé par des transporteurs membranaires de saccharose (Sucrose Transporter ; SUT : transport actif). Pour la voie *symplastique*, le saccharose passe de cellule en cellule par les plasmodesmes de manière passive. Les plantes présentant un transport apoplastique *via* les SUT (ex: *Medicago truncatula* ou *Arabidopsis thaliana*) ont un nombre réduit de plasmodesmes et un gradient de concentration élevé entre les cellules du mésophylle et les cellules compagnes (Rennie and Turgeon, 2009). La voie *symplastique* et la voie *apoplastique* ne peuvent coexister pour une même espèce.

Au niveau des organes puits, le saccharose est déchargé par voie *apoplastique* ou *symplastique* selon la plante et l'organe cible (Turgeon and Wolf, 2009), mais, contrairement au chargement du phloème, un même individu peut posséder simultanément les deux systèmes de déchargement (Patrick, 1997).

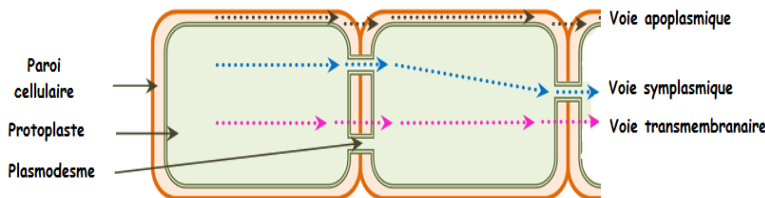


Figure 3 : Schéma des voies possibles de transport de sucres à travers les cellules végétales. La voie apoplastique utilise une circulation par la paroi (apoplasme) alors que la voie symplastique correspond à une circulation intercellulaire *via* les plasmodesmes (thèse Doidy, 2012).

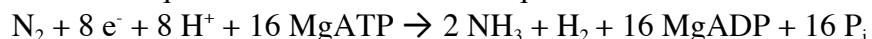
- Les transporteurs de sucres

Lorsque le saccharose atteint les cellules racinaires colonisées par le CMA, le phloème peut être déchargé par la voie symplastique de manière passive à travers les plasmodesmes cellulaires ou au moyen de SUTs *via* la voie apoplastique, où les protéines de type SUT1 (Sucrose transporter 1) contribuent au déchargement du phloème vers les cellules corticales arbusculaires (Carpaneto *et al.* 2005 ; Rennie and Turgeon, 2009 ; Doidy, 2012). Avant son transfert au symbiote fongique, le saccharose est clivé, soit dans l'EPA par des invertases de saccharose (INV-SUC) apoplastiques, soit par des synthétases de saccharose cytoplasmiques. Le glucose est ensuite principalement transféré au CMA (Figure 2) alors que le devenir du fructose est encore inconnu (retour à la plante, transfert au symbiote ?). La plupart des postulats indiquent que, après le déchargement du phloème, le saccharose est exporté vers l'espace apoplastique, situé entre la membrane végétale et la membrane arbusculaire, où il est clivé par des invertases de la paroi cellulaire végétale (Schaarschmidt *et al.* 2006). La régulation à la hausse des enzymes clivant le saccharose dans les racines mycorhizées de *M. truncatula* et d'autres espèces (Schaarschmidt *et al.* 2006 ; Tejada-Sartorius *et al.* 2008) indique que le clivage du saccharose se produit à la fois au niveau de l'apoplaste intercellulaire et dans le cytoplasme de l'hôte respectivement par des INV-SUC et des synthétases du saccharose (Schaarschmidt *et al.* 2006 ; Baier *et al.* 2010); avant le transfert du monosaccharide à l'interface de l'arbuscule.

Une fois à l'intérieur du MER, les hexoses sont soit convertis en glycogène (*via* la néoglucogénèse), soit en tri-acylglycérol (*via* la lipogénèse) ; les glucides et les lipides constituant les principales formes de transport de carbone (Bago *et al.* 2003). Dans le CMA, le glycogène et le tréhalose étant ensuite les principales formes de stockage du carbone alors que la chitine est le glucide structurel de la paroi cellulaire des champignons.

- Fixation biologique de l'azote chez les légumineuses

Sur terre, l'N est surtout présent sous forme de diazote (N₂). Sa fixation est très coûteuse en raison de sa triple liaison. L'équation de la réaction chimique est :



Cette réaction est catalysée par une métallo-enzyme : la NR, synthétisée par tous les organismes fixateurs d'azote (Burgess and Lowe, 1996). La nitrogénase la plus abondante est le molybdène (Mo). Cette enzyme est un complexe associant un homodimère donneur d'électrons ATP-dépendant, la protéine-Fe (codée par le gène *nifH*) et un hétérotétramère associant deux sous-unités α et β de la protéine-MoFe (codées par les gènes *nifD* et *nifK* respectivement) possédant le site catalytique (Yang *et al.* 2011). Afin de fournir les électrons nécessaires à la réduction de l'N moléculaire, la NR fonctionne avec des cofacteurs protéiques : la ferrédoxine chez les bactéries symbiotiques (cofacteur à NAD ou NADP), ou la flavodoxine chez les bactéries libres (cofacteur à FAD).

Une fois fixé en ammoniac, l'N atmosphérique est transféré chez le partenaire eucaryote sous une forme qui varie en fonction du couple de partenaires : ion ammonium, acides aminés... Chez la

plante, l’N est généralement intégré aux acides aminés *via* le cycle Glutamine Synthétase/Glutamine – Oxoglutarate Aminotransférase (GS-GOGAT).

- Absorption d’azote du sol par le CMA et translocation à la plante

L’N est un des nutriments dont la disponibilité est un facteur limitant pour la croissance des plantes, et pour lequel la MA est considérée comme étant un important fournisseur (Hodge *et al.* 2001). L’N du sol est repris par le MER sous forme de nitrate (NO_3^-), d’ammonium (NH_4^+) ou d’acides aminés. Dans le MER, le NO_3^- est catalysé en NH_4^+ par la nitrate réductase (NR) et converti en arginine, qui représente la forme de transport de l’azote du MER à l’interface biotrophe (Govindarajulu *et al.* 2005 ; Tian *et al.* 2010). L’arginine est ensuite décomposée libérant de l’urée et est encore catalysée par l’uréase en NH_4^+ qui semble être la source d’N préférentiellement assimilée par la plante hôte.

3. Projet de recherche

A. Objectifs

La disponibilité, l’absorption et l’échange d’éléments nutritifs dans les interactions MA affectent la croissance des plantes et modulent la biomasse. Par conséquent, la compréhension des mécanismes qui sous-tendent l’efficacité de l’utilisation des nutriments et de l’allocation de carbone entre symbiotes mycorhiziens est d’une importance majeure pour préserver le fonctionnement d’une association mycorhizienne. L’absorption et les échanges de nutriments et/ou de ses métabolites, aux interfaces biotrophes sont contrôlés par des transporteurs membranaires et leurs modes de régulation sont essentiels pour la détermination de l’interaction entre les deux partenaires et pour l’adaptation aux variations de la quantité et/ou de la qualité des éléments nutritifs du sol. L’objectif principal de mon étude a donc été de mieux comprendre les échanges de nutriments entre plantes et microorganismes bénéfiques, avec un focus particulier sur les échanges de sucre et d’azote. Un deuxième objectif a été une contribution à l’étude de la régulation éventuelle du transport de sucre dans les IPM par des phénomènes de dynamique membranaire

B. Stratégies d’étude

- Etude 1 : Flux de carbone et d’azote dans un réseau mycélien et expression des gènes codant pour des transporteurs de sucres et d’ammonium à l’interface du réseau mycélien

Cette étude a été réalisée sur les plantes modèles telles que *Sorghum bicolor* (Sorgho, métabolisme C4) et *Medicago truncatula* (Luzerne tronquée, métabolisme C3). Les différentes voies pour la fixation du carbone résultent d’une signature différente des isotopes du carbone qui peuvent être utilisés pour distinguer l’investissement de carbone dans un réseau mycélien commun (RMC). En tant que légumineuse, *M. truncatula* est un symbiote facultatif des bactéries fixatrices d’azote *Sinorhizobium meliloti*. Cela permet d’examiner si un partenaire symbiotique supplémentaire modifie le transfert d’éléments nutritifs ainsi que l’investissement de carbone des deux plantes hôtes dans le RMC. Lors d’une interaction de type symbiose mutualiste, nous nous attendons à un équilibre parfait entre les deux partenaires. Or, parfois la plante investit plus et inversement dans d’autres cas c’est le champignon qui apporte plus de nutriments à la plante (Figure 4). Des plantes ont été inoculées soit avec le champignon MA seul, ou en présence des rhizobactéries ont été comparés avec des témoins non inoculés. Nous nous sommes intéressés aux sucres que la plante peut fournir au CMA lors de la symbiose ainsi qu’à la quantité d’N fournit en retour.

Afin d’étudier le transfert d’éléments nutritifs tels que l’N et le C du CMA dans un réseau multitrophique (CMN connectant deux plantes de métabolismes différents : C3 vs C4), nous avons étudié l’expression de transporteurs d’ammonium (AMT) et de SUT par RT-qPCR (Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction). Nous avons également étudié le rapport

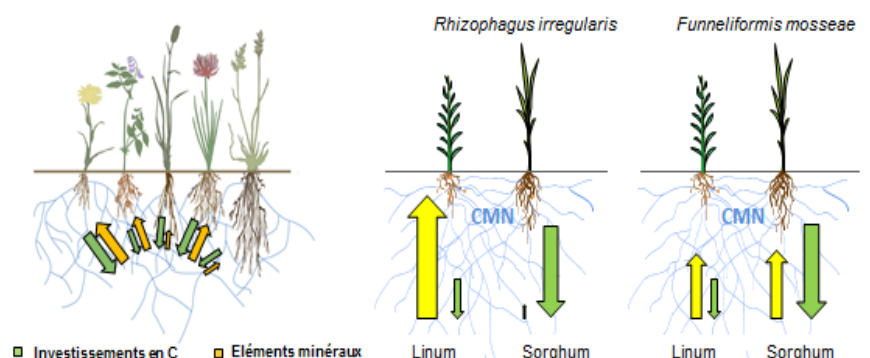


Figure 4 : Déséquilibre des échanges entre les deux partenaires végétaux lors d'une interaction de type symbiotique (Walder *et al.* 2012).

isotopique delta $^{13}\text{C}/^{14}\text{C}$ (Walder *et al.* 2012) et pour mesurer le transfert d'éléments nutritifs du RMC aux plantes hôtes, les nutriments traçables ^{15}N ont été ajoutés. Les plantes ont été mises en culture (monoculture Luzerne – Luzerne ou culture mixte Luzerne – Sorgho) selon un système expérimental appelé microcosme et une méthode très spécifique qui permet d'étudier l'interface de la symbiose (Figure 5, Walder *et al.* 2012). Cette partie nous a permis (i) d'appréhender les différentes stratégies des plantes lors des interactions avec les CMA en terme « d'investissement » en sucres vers son partenaire et (ii) de voir si les différents SUT impliqués dans le transport de sucres à longue distance, jouent un rôle dans la modulation de ces « investissements ».

- Etude 2 : Régulation spatiale des transporteurs de sucres par le biais de l'endocytose

Au sein des IPM, un trafic vésiculaire à destination et en provenance de la membrane plasmique (exocytose et endocytose) peut contrôler l'abondance et l'activité de protéines membranaires, reflétant les réponses de la cellule à son environnement (Leborgne-Castel and Bouhidel, 2014). La régulation de transporteurs de sucres permettant l'augmentation ou la limitation d'échanges de sucres entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule végétale, peut être envisagée par activation de différents mécanismes de dynamiques membranaires. Pour notre étude, nous nous sommes focalisé sur l'endocytose à titre d'exemple de dynamique membranaire. Notre étude a pour but d'identifier, à l'échelle cellulaire, les effets éventuels de l'endocytose de transporteurs sur l'établissement et le fonctionnement de la symbiose entre plante et champignon. En effet, il a été récemment montré que l'adressage et le recyclage à la MP d'un transporteur de saccharose, SUT1, est contrôlé par l'endocytose lors du développement végétal chez la pomme de terre (Krugel *et al.* 2012). De plus, le transporteur SUT2, essentiel pour la mycorhization, interagit avec des protéines localisées dans des vésicules suggérant également son internalisation (Bitterlich *et al.* 2014). Au laboratoire, nous disposons de lignées cellulaires et de plants de tabac dont l'endocytose est perturbée (Adam *et al.* 2012), ce qui constitue un atout pour appréhender l'étude de cette dynamique lors de la mycorhization. L'absorption de saccharose par les cellules de tabac en suspension a été étudiée dans différentes lignées *via* du saccharose radiomarqué comme il a été précédemment mené avec du glucose sur des cellules sauvages (Bourque *et al.* 2002). En ce qui concerne l'étude en plante entière, nous avons étudié l'impact de la perturbation de l'endocytose dans la mise en place de la MA.

II. Matériels et méthodes

1. Etude 1 : Flux de carbone et d'azote dans un réseau mycélien et expression des gènes codant pour des transporteurs de sucres et d'ammonium à l'interface du réseau mycélien

A. Organismes

- Matériel végétal

Le Sorgho (*Sorghum bicolor*, céréale) et la Luzerne tronquée (*Medicago truncatula*, légumineuse) ont été utilisés pour cette étude. Les graines de *S. bicolor* sont stérilisées pendant 5 minutes avec de l'hypochlorite de sodium à 3 % (Eau de Javel commerciale), puis lavées avec de l'eau stérilisée et mises à tremper toute la nuit. Ces graines sont ensuite mises à pré-germer dans du sable autoclavé (120°C, 20 min) dans des boîtes de Petri pendant 48 h à température ambiante (environ 28°C) et à l'obscurité. Les graines de *M. truncatula* (récolte de 2005, domaine Epoisses) sont scarifiées à l'aide de papier ponce dans le but de faciliter leur germination. La scarification permet outre de briser l'enveloppe protectrice pour faciliter la germination des graines, d'accélérer la germination et d'obtenir souvent une plante plus vigoureuse. Les graines sont ensuite mises à tremper dans de l'Eau de Javel à 3 % pendant 10 minutes, suivi de rinçages à l'eau osmosée. Les graines stérilisées sont ensuite pré-germées dans des boîtes de Petri contenant de l'agar à 1 % (Kalys) à l'obscurité à 4°C. Quand les racines atteignent une longueur de plus de 1 cm, les graines germées sont placées dans une chambre de croissance pendant environ 4 jours (16 h de jour à 25°C et 8 h de nuit à 20°C).

- Matériel fongique

S. bicolor et *M. truncatula* sont inoculés avec *Glomus intraradices* récemment renommé en *Rhizophagus irregularis* (Schüssler and Walker, 2010). Un mL de la solution contenant le CMA (DAOM 197198, Agronutrition Toulouse, environ 130 propagules/mL) est mis au contact des plantes.

- **Matériel bactérien**

Une préculture de *Sinorhizobium meliloti* est préparée dans 6 mL de milieu Tryptone-Yeast (TY) (tryptone à 5 g/L Fluka Analytical, extrait de levure à 3 g/L Sigma, chlorure de calcium CaCl₂ à 0,5 g/L Duchefa Biochemie) stérile. Après une nuit à 30°C sous agitation (150 rpm), 1 mL de préculture est ajoutée à 200 mL de milieu TY et incubée à 30°C sous agitation (150 rpm) jusqu'à une Densité Optique à 600 nm (DO₆₀₀) entre 0,6 et 0,8 (Photomètre, Eppendorf).

Le restant des colonies de la boîte de Petri est récolté avec de l'eau ultrapure (DO₆₀₀ entre 0,6 et 0,8). Un mL de cette solution bactérienne est ensuite ajouté dans les microcosmes un jour après semis. Seize jours plus tard, l'inoculation des plantes avec *S. meliloti* est répétée comme décrit précédemment.

B. Microcosmes

Les systèmes appelés microcosmes sont constitués de trois différentes parties (Figure 5, Walder *et al.* 2012) : deux compartiments RHC (Root Hyphal Compartment) contenant les racines de chaque plante et les hyphes du CMA, et un compartiment HC (Hyphal Compartment) pouvant contenir seulement les hyphes du CMA. Les compartiments RHC et HC sont séparés par une membrane de nylon de 25 µm entourée par deux filets de moustiquaire de 500 µm qui consolide le tout. La membrane de nylon empêche les racines de passer du compartiment RHC au HC mais permet le passage des hyphes du CMA. Dans un microcosme deux plantes partagent un RMC : en monoculture (Luzerne – Luzerne) ou en culture mixte (Sorgho – Luzerne).

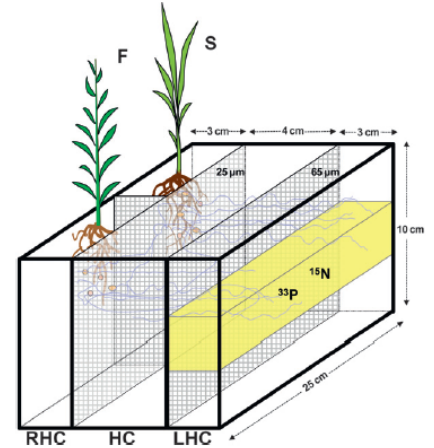


Figure 5 : Microcosme compartimenté pour étudier les réseaux mycéliens (Walder *et al.* 2012).

C. Substrat

Le substrat utilisé pour les microcosmes est un mélange 50 / 50 (masse / masse) de zéolite (Symbiom, République Tchèque) et de sable d'aquarium (Botanic) et il est autoclavé (120°C, 20 min).

D. Conditions de culture

Une fois par semaine, 10 mL de solution nutritive Long Ashton (classique et/ou avec du ¹⁵N) sont ajoutés aux compartiments correspondants. Cette solution évite la carence des plantes en nutriments, tels que le phosphate et l'ajout de ¹⁵N permet de suivre les échanges d'N du CMA vers les plantes. En plus de cette fertilisation, les plantes sont arrosées tous les jours avec 30 mL d'eau par compartiment.

La croissance des plantes est menée dans une chambre de culture avec les conditions suivantes : 12 h de jour à 22°C et 12 h de nuit à 19°C. Les microcosmes sont placés de manière randomisée dans la chambre et déplacés toutes les semaines afin d'éviter les « effets de bord ».

E. Récolte

Les plantes contenues dans les microcosmes sont récoltées après 12 semaines de croissance en séparant les parties aérienne et racinaires. La partie aérienne est pesée donnant le poids frais puis stockée dans des sacs en papier kraft et séchée pendant 24 h à 50 °C puis repesée permettant le calcul du poids sec. La partie racinaire des plantes est récoltée puis lavée à l'eau délicatement afin d'éliminer le substrat restant et le poids frais est mesuré. Pour les racines de *M. truncatula* cultivée en présence des bactéries *S. meliloti*, les nodules sont prélevés et stockés à 4°C afin de faire des analyses de delta ¹³C et ¹⁵N. Le poids frais des racines est mesuré avant de faire trois prélèvements correspondant d'environ 80 mg placés dans des tubes Eppendorfs, mis dans l'azote liquide puis stockés à - 80°C pour les extractions d'ARNs totaux. Pour l'estimation de la colonisation racinaire par le CMA (*R. irregularis*), environ 100 mg de racines sont prélevés. Le poids frais du restant des racines (après prélèvement) est mesuré avant séchage pendant 24 h à 55°C (poids sec). Pour récolter le mycélium du compartiment HC, le substrat est mélangé dans une bassine d'eau afin de faire remonter le mycélium à la surface. Le mycélium est ensuite prélevé en utilisant des tamis de 25 µm de diamètre. Les échantillons de mycélium sont séchés à l'étuve à 55°C pendant 24 h pour faire des analyses isotopiques de delta ¹³C et ¹⁵N.

F. Mesures

• Taux de mycorhization

Les racines prélevées sont mises en solution avec de l'hydroxyde de potassium (KOH) 10 % (100 g/L, Sigma – Aldrich) puis passées à l'étuve pendant 20 min à 90°C. Après rinçage à l'eau, les racines sont ensuite mises en contact avec le colorant bleu Trypan (330 mL/L de glycérol, Sigma – Aldrich ; 330 mL/L d'acide lactique, Fluka ; 75 mL/L de bleu Trypan, Fluka – Analytical). Les racines sont directement mises à l'étuve pendant 15 minutes à 90°C puis lavées et stockées dans un mélange de glycérol et d'acide lactique (volume / volume).

Pour mesurer le taux de mycorhization dans les échantillons inoculés avec le CMA, des lames sont préparées avec 30 fragments de 1 cm de racines colorées de chaque échantillon. Le barème utilisé permet d'estimer rapidement le degré d'infection mycorhizienne de chaque fragment au moyen de 6 classes notées de 0 à 5 (Figure 6A) et la richesse arbusculaire de l'infection par 4 classes notées A₀, A₁, A₂ et A₃ (Figure 6B). Les 5 paramètres d'infection (Figure 6) sont calculés à l'aide du programme MycoCalc (Trouvelot *et al.* 1986).

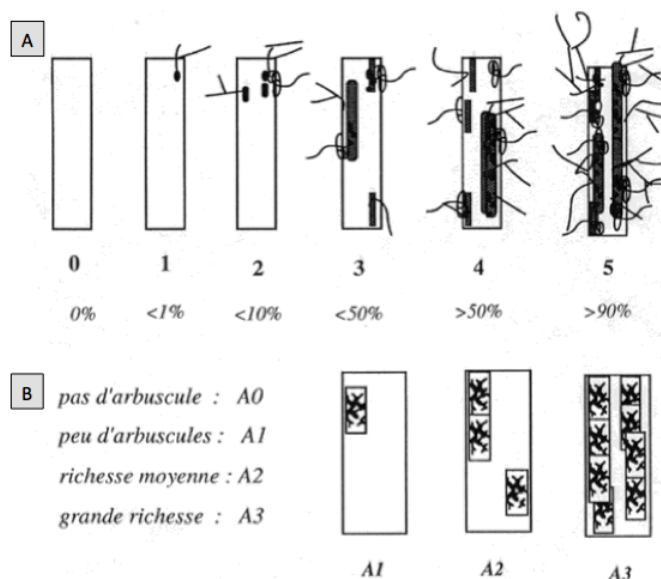


Figure 6 : Protocole d'estimation du taux de mycorhization. A) Degré d'infection mycorhizienne. B) Richesse arbusculaire de l'infection.

• Intensité de nodulation

Différentes mesures sont réalisées sur les nodules : nombre par plant, longueur (cm), surface et aire projetée (cm²) par le biais du logiciel WinRhizo (http://www.regentinstruments.com/assets/winrhizo_about.html).

• Delta ¹³C et delta ¹⁵N analysés par spectrométrie de masse pour l'étude des flux

Les parties aériennes et racinaires séchées sont broyées finement à l'aide d'un broyeur à billes (Retsch MM 200 Retsch pour la partie aérienne, MM 400 pour la partie racinaire). Les échantillons sont préparés à raison de 1,8 – 2,2 mg de matière dans des capsules d'étain. Des conditions contrôles sont également réalisées par le biais d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) et d'acide glutamique. Les mesures se sont réalisées à l'Université de Bale en Suisse : les échantillons ont été analysés pour la concentration totale de C et N ainsi que les ratios ¹³C/¹⁴C – ¹⁵N/¹⁴N via un analyseur élémentaire (AE) couplé à un spectromètre de masse de ratio isotopique à débit continu (AE-CF-IRMS, Integra2). La précision analytique des mesures est basée sur les analyses des réplicats (± 0,2 ‰).

• Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits de 100 mg de racines broyées et congelées en suivant les instructions provenant du kit RNeasy Plant Mini (Qiagen). La concentration et la pureté (A₂₆₀/A₂₈₀) des ARN extraits sont estimées à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop 2000c, Thermo).

• Transcription inverse des ARN

Les ARN totaux (1 µg) sont rétrotranscrits en ADN_c à l'aide des instructions provenant du kit iScript _cDNA Synthesis (BioRad), dans un volume final de 20 µL. Les ADN_c sont obtenus grâce au cycle suivant réalisé dans un thermocycler (Biometra) : 5 min à 25°C, 30 min à 42°C et 5 min à 85°C.

• Amplification des ADN par PCR quantitative

Les séquences de référence des gènes codant pour des transporteurs la *Glycine max* sont recherchées sur Phytozome (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) puis comparées au génome de *M. truncatula* afin de trouver les régions similaires ; les amorces spécifiques de chaque séquence sont conçues à l'aide du logiciel Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) et testées *in silico* via le

logiciel Amplify 3X (<http://engels.genetics.wisc.edu/amplify/>). Les autres amorces avaient déjà été publiées précédemment dans différentes études (thèse Doidy, 2012 ; Straub *et al.* 2014) (Tableau 1).

Afin d'étudier l'expression des gènes codant des SUT et AMT, des qPCR sont réalisées en utilisant les indications du kit ABsolute qPCR SYBR Green ROX mix (Thermo); le mélange contient 2 μL d'ADN_c dilué au 1/50, les amorces sens et antisens à 70 nM chacune, mélange qPCR SYBR Green 1X (contenant les dNTPs et l'enzyme de polymérisation), et est ajusté avec de l'eau sans ARNase dans un volume de réaction final de 10 μL . Les qPCR sont réalisées dans des plaques de 384 puits et les mesures sont effectuées à l'aide de l'appareil ViiA 7 Real Time PCR System (Life technologies, Biosystems) avec le programme suivant : une phase de dénaturation à 95°C pendant 15 sec, une phase d'hybridation à 60°C pendant 30 sec et une phase d'extension à 72°C de 30 sec, pendant 40 cycles. La détection de l'amplification est réalisée à la fin de chaque cycle PCR en mesurant la fluorescence à 530 nm émise par la sonde dérivant du SYBR Green I. Enfin une courbe de dénaturation est réalisée afin d'estimer la qualité de l'amplification. Après une dénaturation des produits PCR durant 15 sec à 95°C, les échantillons sont incubés 1 min à 58°C, puis la température est augmentée de 0,05°C par seconde jusqu'à 95°C et la fluorescence est mesurée tous les 0,05°C/s.

Nom	Amorces	Taux de GC (%)	T _m (°C)
<i>MtAMT1.1</i>	Sens AGATGAACTTGC GGGTATGG	50	57.3
	Antisens TTGGAGTAGGAGTGGAAAGAA GAA	43.5	58.9
<i>MtAMT1.2</i>	Sens GCTTAGGTCTTCAACCGAGG	60	61.4
	Antisens TGGCATGTCTTACAGCTCT	50	57.3
<i>MtAMT1.4</i>	Sens GCGTTTGGTATCTGCTGGA	55	59.4
	Antisens AACCTGCAATGCTCCAAACTT C	45.5	58.4
<i>MtAMT2.1</i>	Sens TCTTTGGGGTGGTGGATT TCT	47.6	57.9
	Antisens TGGTCCAACCAATAAGCAGC	52.4	59.8
<i>MtAMT2.3</i>	Sens GGGGTGATGGAGAAAGAATG	50	57.3
	Antisens CACATTCACACTCGAAACTTC A	40.9	56.5
<i>MtAMT1.a.mf</i>	Sens ATCGACTTGC CGGTTC A	50	53.7
	Antisens CGACGCGTATGTCCTTT	55.3	57.7
<i>MtAMT1.b.mf</i>	Sens ACCAACACCGGCAACCTA	55.6	56
	Antisens TCGAACCCTCAATTCGT	50	53.7
<i>MtAMT1.c.mf</i>	Sens TGGATGCACAGCAGCACT	55.6	56
	Antisens ATTGCAGCCCAAGGATCA	50	53.7
<i>MtAMT1.d.mf</i>	Sens GGCTATTGTTGCTTGGGTGA	50	57.3
	Antisens CCATCTCTTCTCGGGTGA	57.9	58.8
<i>MtAMT2.1.mf</i>	Sens GGCAAACCTTCTGTGATTGG	50	57.3
	Antisens AATAGCCGCCACGATTG	55.6	56
<i>MtAMT2.2.mf</i>	Sens CAGAGCAGGCTTGTGCAA	55.6	56
	Antisens TGGAGACCAAGGAATGC	55.6	56
<i>MtAMT3.mf</i>	Sens GCTCTGGTGGTGTCCAAA	55.6	56
	Antisens AGCAACTCTTCTCCGTCA	52.6	56.7
<i>MtAMT4.3.mf</i>	Sens TCCACACCCACGCCATA	58.8	55.2
	Antisens AGGCACGGCAAAGAAGC	58.8	55.2
<i>MtAMT4.4.mf</i>	Sens TGCTTGGAGGGTCTTTGC	55.6	56
	Antisens CCCCCGGCATAATCAA	56.3	51.7
<i>MtSUT1.1</i>	Sens AGTGGCATATTATCCGTAGTC	42.9	55.9
	Antisens TGAAGAAAATGTTCCACTG	38.1	54
<i>MtSUT1.2</i>	Sens TTGTTGTACCACAAATGATCG	38.1	54
	Antisens TAATTAATGGAAACCCTCC A	36.4	54.7
<i>MtSUT1.3</i>	Sens CCTACTCCAAAGTCTGTTGAT	42.9	55.9

Nom	Amorces	Taux de GC (%)	T _m (°C)
<i>SbAMT1.1</i>	Sens GCTGTGGTTCGGCTGGTA	61.1	58.2
	Antisens GGACTTGAGGATGGTGGTGA AA	52.4	59.8
<i>SbAMT1.2</i>	Sens TCCATTGCTCCTCGTTGC	55.6	56
	Antisens GGCTTTGCTCCCTCTTCC	61.1	58.2
<i>SbAMT2.1</i>	Sens TCCC GCCCGCTACAGCT	72.2	62.8
	Antisens GTCACCATT CAGCTGTAG	50	53.7
<i>SbAMT2.2</i>	Sens GCGGCTTCTCTACCAGTG	63.2	61
	Antisens CCTCTCCCTGTCGCTCTTC	63.2	61
<i>SbAMT3.1</i>	Sens GGCCCTCGTCTGCATCACT	61.1	58.2
	Antisens GGGTGTGCTCCACTTGCT	61.1	58.2
<i>SbAMT3.2</i>	Sens CCGCACGCACTCTATCTGTA	55	59.4
	Antisens TCGCTGCTTATTGGGGTTAG	50	57.3
<i>SbAMT3.3</i>	Sens CGTCATTGCCTGGAACATC	52.6	56.7
	Antisens AGCATCATCCCGATAAGC	52.6	56.7
<i>SbAMT4</i>	Sens CGAACAACTTCTCCTGACG	50	57.3
	Antisens CCCGAACACGAAGCAGTC	61.1	58.2
<i>SbSUT1</i>	Sens GTGCTCCTGTAATCTTTGTG TCC	47.8	60.6
	Antisens ACTATACTGCACATTGATTG ATCG	37.5	57.6
<i>SbSUT2</i>	Sens GCACATGCATTGAATGAAC C	45	55.3
	Antisens TTCGATTTGGAAATTCCTC	40	53.2
<i>SbSUT3</i>	Sens GGCCGGATCAAACAAGAT	50	53.7
	Antisens GGCATTGCGAAGGAATGA	50	53.7
<i>SbSUT4</i>	Sens CGATCCATGATGATGCCAG	50	57.3
	Antisens GTTCCAGGCTTGTGTGTC	61.1	58.2
<i>SbSUT5</i>	Sens CCCGTAGTGTGCGGAGTC	63.2	61
	Antisens CCAATGGATCGGAAAATAA AG	38.1	54
<i>SbSUT6</i>	Sens GCACAACAGCACAAAGAAG G	50	57.3
	Antisens AGGCAGAAGAGGCTGAGAT G	55	59.4
<i>SbUbi</i>	Sens CAAGGAGTGCCCAACAC	61.1	58.2
	Antisens GGTAGGCGGGTAAAGCAAA	52.6	56.7

	Antisens	TTAGTGGGACGTAATATGCC	45	55.3
<i>MtSUT2</i>	Sens	AACTGCCAAACCTTTCTAGC	45	55.3
	Antisens	CACAATCAACGTGCCTACTC	50	57.3
<i>MtSUT4.1</i>	Sens	GCAGATTGTGGTATCACTG	47.4	54.5
	Antisens	TAAGTGCCAAAAGAAAACAG C	38.1	54
<i>MtSUT4.2</i>	Sens	CAGTGGACTCATAGCTGTC	52.6	56.7
	Antisens	AGAAATCTGTGCCAAAGCAG	45	55.3
<i>MtUbi</i>	Sens	GCAGATAGACACGCTGGGA	57.9	58.8
	Antisens	AACTCTGGGCAGGCAATAA	45	55.3

Tableau 1 : Liste des amorces ciblant des gènes codant pour des transporteurs d'ammonium et de saccharose chez *M. truncatula* et *S. bicolor*. Les transporteurs d'ammonium sont des AMT et les transporteurs de saccharose sont des SUT, chez *Mt* (*M. truncatula*) et *Sb* (*S. bicolor*).

G. Analyses statistiques

Les échantillons ont d'abord été testés *via* un test de normalité afin de voir s'ils suivaient une loi normale. Comme ce n'était pas le cas, nous avons utilisé des tests non paramétriques avec une *p*-valeur inférieure à 0,05 % : test de Kruskal-Wallis au sein du même groupe et test de Wilcoxon entre les deux groupes.

2. Etude 2 : Régulation spatiale des transporteurs de sucres par le biais de l'endocytose

A. Organismes

- Matériel végétal

Afin d'étudier le rôle des transporteurs de sucres lors des IPM, nous avons utilisé un modèle biologique : le tabac (*Nicotiana tabacum*) variété Xanthi.

Des mutants de tabac, appelés « Hub », perturbés pour l'endocytose à clathrine ont été précédemment créés (Adam *et al.* 2012). Ces mutants expriment, sous la dépendance d'un promoteur constitutif fort CaMV 35S (Cauliflower Mosaic Virus 35S), un gène codant une chaîne lourde (CHC) de clathrine tronquée, ne contenant que la partie C-terminale (appelé domaine Hub) (Figure 7). La chaîne CHC tronquée exprimée dans les cellules entre en compétition avec la chaîne CHC endogène perturbant l'assemblage des triskèles du manteau à clathrine et donc l'endocytose. Nous avons travaillé à deux échelles : cellules isolées (permettant d'étudier l'entrée de saccharose) et plants entiers (afin d'étudier la MA) sauvages et mutants perturbés pour l'endocytose à clathrine. Deux lignées mutantes (appelées Hub 1.5 et Hub 14.11) et une lignée témoin transformée avec le vecteur d'expression vide (pMDC) ont été étudiées.

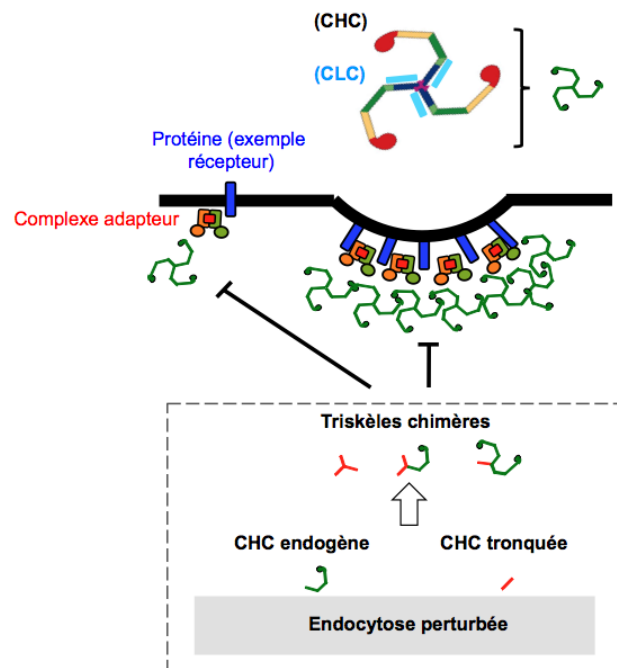


Figure 7 : Schéma représentant la perturbation de l'endocytose à clathrine.

- Matériel fongique

Les plants de tabac sont inoculés (inoculation solide avec les propagules produits par le laboratoire) avec *Rhizophagus irregularis* (CMA).

B. Substrat et milieu de culture

- Suspensions cellulaires

Les cellules sont cultivées dans un milieu de culture liquide Tbc (Chandler *et al.* 1972) contenant des sels MS (4,30 g/L de sels MO256 medium – Duchefa Biochemie), 0,2 g/L de L-glutamine (99 %, Biotechnology Sigma), 1 mL/L de kinétine à 0,1076 mg/mL, 30 g/L de saccharose (Sigma), 1,7 mL/L de 2,4-D à 0,1 mg/mL et 0,2 mL de pantothénate de calcium à 15 mg/mL, pH 5,5 ajusté à l'aide de KOH 1 M.

- Plantes entières

Les plants de tabac sont obtenus par semis en culture *in vitro* puis transférés sur un substrat en chambre de culture. Les graines sont d'abord stérilisées dans l'Eau de Javel à 10 % pendant 15 min puis subissent de plusieurs lavages avec de l'eau stérile. Les graines sont ensuite mises à germer sur un milieu contenant des sels MS (Murashige and Skoog ; 4,30 g/L de sels MO256 medium – Duchefa Biochemie), 10 g de saccharose (Sigma), 5 g/L de MES 14 % (acide 2-(N-Morpholino)éthansulfonique) et 2 mL/L de vitamine B1 (Thiamine) pH 5,6 ajusté avec du KOH. De l'hygromycine à 35 µg/mL est ajouté aux graines des lignées Hub et pMDC pour permettre la sélection des graines transformées génétiquement. Après 10 jours, les plants *in vitro* sont transférés sur un substrat contenant un mélange de zéolite et de terragreen 50 / 50 (masse / masse). Ce substrat est préalablement autoclavé (120°C, 20 min).

C. Conditions de culture et traitements

- Suspensions cellulaires

Les cellules de tabacs sont cultivées dans une chambre de croissance sur un agitateur rotatif (150 rpm, 25°C) en lumière continue. Les cellules sont « repiquées » chaque semaine à raison de 15 mL de cellules dans 100 mL de milieu de culture Tbc. Pour l'analyse du transport de sucre radioactif, la veille les cellules sont diluées au ½ afin qu'elles soient en phase exponentielle.

Le jour de la manipulation, les cellules en phase exponentielle sont filtrées et lavées à deux reprises avec le tampon I₂ (31,88 g/L de D-mannitol – 98 % – Sigma – Aldrich, 73,51 mg de CaCl₂ – 99 % – Sigma, 87,14 mg/L de sulfate de potassium – 99,5 % – Prolabo, 390,40 mg/L de MES – 99,5 % – Sigma – Life Science). Les cellules sont ensuite remises en suspension pendant 2 h (150 rpm, 25°C) à raison de 0,15 g de poids frais de cellules par mL de tampon I₂.

L'absorption de saccharose est mesurée après l'ajout de saccharose radiomarqué à 2 mM (saccharose-D-¹⁴C à 0,055 MBq/g de poids frais – PerkinElmer). Après différents temps de traitement (0 min, 30 min, 45 min, 60 min et 90 min), des duplicats de 2 mL sont prélevés puis filtrés *via* une trompe à vide. Les cellules sont ensuite lavées pendant 1 min avec 10 mL de tampon I₂ et puis pendant 20 sec avec 5 mL de tampon I₂. La galette de cellules est ensuite récoltée et pesée. Après une incubation dans un four à 80°C toute la nuit, les poids secs sont déduits. Ces derniers sont mélangés avec 10 mL de liquide à scintillation (cocktail Ready-Safe – Ultima Gold) afin de déterminer la radioactivité de chaque échantillon à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Beckman LS6500).

- Plantes entières

Les plants inoculés reçoivent une fois par semaine une solution nutritive sans phosphate (P⁻ : 1,5 g/L de 14.0.14 – Plant Prod, 1mL/L de 10.10.10 – Plantin specialist fertilization). Les plants non inoculés reçoivent également une fois par semaine une solution nutritive mais avec phosphate (P⁺ : 2,1 mL/L de 10.10.10 – Plantin specialist fertilization, 1 mL/L de sulfate de magnésium – Magplan).

La croissance des plantes se fait dans une chambre de culture dans les conditions suivantes : 10 h de jour à 23°C et 14 h de nuit à 18°C. Les pots sont placés de manière randomisée dans la chambre et sont déplacés toutes les semaines afin d'éviter les effets de bord.

D. Récolte des plantes

Les tabacs sont récoltés après 14 semaines de croissance. Pour la partie aérienne, la longueur de la tige (cm), le nombre de feuilles, l'aspect des feuilles et le poids frais sont pris en compte. La partie aérienne est ensuite placée dans des sacs en papiers kraft et séchée pendant 48 h à 50°C (poids sec).

Les racines sont lavées délicatement puis pesées (poids frais avant prélèvement). Puis différents échantillons sont pris afin d'estimer la colonisation racinaire du CMA mais aussi afin d'extraire des ARN pour d'éventuelles études ultérieures. Il faut alors reprendre le poids (poids frais après prélèvement). Comme pour la partie aérienne, le restant des racines est stocké dans des sacs en papier kraft puis séchés à l'étude pendant 48 h à 50°C (poids sec).

II. Résultats

1. Etude 1 : Flux de carbone et d'azote dans un réseau mycélien et expression des gènes codant pour des transporteurs de sucres et d'ammonium à l'interface du réseau mycélien

*N.B. : par la suite le terme culture mixte se réfère à la co-culture *M. truncatula* avec *S. bicolor*, alors que le terme monoculture se rapporte à la culture de deux plants de *M. truncatula*.*

- **Biomasse végétale**

Les poids secs des parties aériennes (Figure 8A) et racinaires (Figure 8B) de *M. truncatula* ont été mesurés.

En monoculture, les parties aériennes et racinaires des plants de *M. truncatula* sont toutes deux significativement plus développées lorsque les deux symbiotes microbiens sont présents (condition E).

En culture mixte, la partie aérienne des plants de *M. truncatula* est significativement plus développée lorsque seules le CMA est présent (condition D), comparativement à la monoculture. A l'inverse, toujours en culture mixte, la partie racinaire est significativement moins développée lorsque les deux symbiotes microbiens sont présents (condition E). De plus, pour la condition où les deux symbiotes sont présents (E), si on compare les deux types de culture, nous pouvons voir que la partie racinaire est significativement moins développée en culture mixte qu'en monoculture.

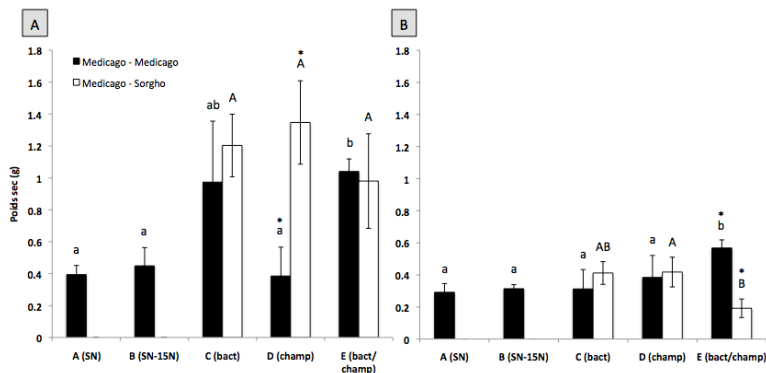


Figure 8 : Poids sec des parties aérienne et racinaire des plants de *Medicago truncatula* en condition de monoculture (*Medicago - Medicago*) ou en culture mixte (*Medicago - Sorgho*). A) Partie aérienne, B) partie racinaire. Les plants ont été soumis à différents traitements : A (SN) fertilisation avec de la solution nutritive classique Long Ashton, B (SN-15N) fertilisation avec une solution nutritive modifiée de Long Ashton contenant du ^{15}N , C (bact) inoculation *Sinorhizobium meliloti* et fertilisation avec de la solution ^{15}N dans le compartiment RC, D (champ) inoculation *Rhizophagus irregularis* et fertilisation avec de la solution ^{15}N dans le compartiment HC, E (bact/champ) co-inoculation par les deux symbiotes (*S. meliloti* et *R. irregularis*) et fertilisation avec de la solution ^{15}N dans le compartiment HC. Des tests statistiques non paramétriques ont été réalisés : lettres en minuscule signifiant une comparaison des échantillons au sein du groupe *Medicago - Medicago*, lettres en majuscule signifiant une comparaison au sein de groupe *Medicago - Sorgho* et (*) signifiant une comparaison entre les deux groupes cités précédemment.

- **Nodosités**

La colonisation des racines de *M. truncatula* (Figure 9) par les rhizobactéries en monoculture ou en culture mixte a été analysée en comptant le nombre de nodosités. Nous pouvons noter une différence significative entre les conditions rhizobactéries seules (condition C) et rhizobactéries avec CMA (condition E) pour les plants en monoculture. En effet, nous observons beaucoup plus de nodosités lorsque le CMA est présent avec la rhizobactérie (condition E).

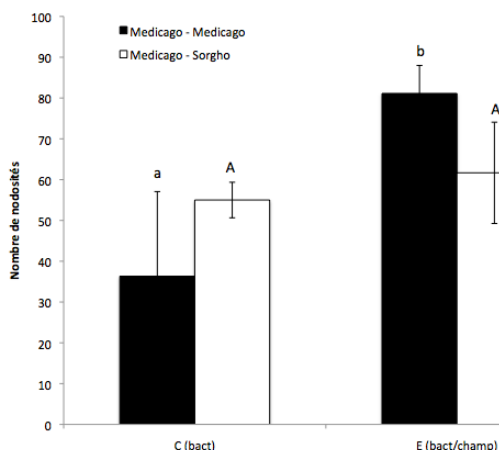


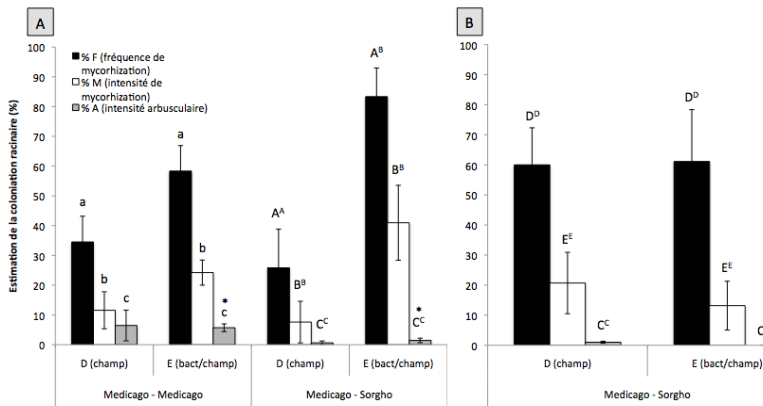
Figure 9 : Nodulation des plants de *Medicago truncatula* en condition de monoculture (*Medicago - Medicago*) ou en culture mixte (*Medicago - Sorgho*). Les plants ont été soumis à différents traitements : A (SN) fertilisation avec de la solution nutritive classique Long Ashton, B (SN-15N) fertilisation avec une solution nutritive modifiée de Long Ashton contenant du ^{15}N , C (bact) inoculation *Sinorhizobium meliloti* et fertilisation avec de la solution nutritive modifiée (^{15}N) dans le compartiment RC, D (champ) inoculation *Rhizophagus irregularis* et fertilisation avec de la solution nutritive modifiée (^{15}N) dans le compartiment HC, E (bact/champ) co-inoculation par les deux symbiotes (*S. meliloti* et *R. irregularis*) et fertilisation avec de la solution nutritive modifiée (^{15}N) dans le compartiment HC. Des tests statistiques non paramétriques ont été réalisés : lettres en minuscule signifiant une comparaison des échantillons au sein du groupe *Medicago - Medicago*, lettres en majuscule signifiant une comparaison au sein de groupe *Medicago - Sorgho* et (*) signifiant une comparaison entre les deux groupes cités précédemment.

- Mycorhization

Le mode de culture, monoculture vs culture mixte, n'a pas engendré de différences significatives pour la fréquence de mycorhization par le CMA. En culture mixte la présence de la rhizobactéries augmente significativement (28 vs 83%) la fréquence de mycorhization des plants de *M. truncatula*. (Figure 10A). Quand les deux symbiotes sont présents (condition E), le mode de culture influence également le développement de la mycorhize dans la mesure où significativement moins d'arbuscules sont formés dans les racines de *M. truncatula* en culture mixte.

En ce qui concerne les plants de *S. bicolor* (Figure 10B), la seule différence significative observée est la diminution du nombre d'arbuscules liée à la présence des deux symbiotes (condition E).

Figure 10 : Colonisation racinaire par le CMA *Rhizophagus irregularis* dans les racines inoculées de *Medicago truncatula* et *Sorghum bicolor*. A) *M. truncatula* et B) *S. bicolor*. Les plants ont été soumis à différents traitements : A (SN) fertilisation avec de la solution nutritive classique Long Ashton, B (SN-15N) fertilisation avec une solution nutritive modifiée de Long Ashton contenant du ¹⁵N, C (bact) inoculation *Sinorhizobium meliloti* et fertilisation avec de la solution nutritive modifiée (¹⁵N) dans le compartiment RC, D (champ) inoculation *Rhizophagus irregularis* et fertilisation avec de la solution nutritive modifiée (¹⁵N) dans le compartiment HC, E (bact/champ) co-inoculation par les deux symbiotes (*S. meliloti* et *R. irregularis*) et fertilisation avec de la solution nutritive modifiée (¹⁵N) dans le compartiment HC. Des tests statistiques non paramétriques ont été réalisés : a (% F) / b (%M) / c (% A) montrent des différences significatives au sein du groupe Medicago – Medicago pour *M. truncatula*, Aⁿ (% F) / Bⁿ (% M) / Cⁿ (% A) montrent des différences significatives au sein du groupe Medicago – Sorgho pour *M. truncatula*, Dⁿ (% F) / Eⁿ (% M) / Cⁿ (% A) montrent des différences significative pour *S. bicolor* et (*) signifiant une comparaison entre les deux groupes cités précédemment.



- Expression des AMT et SUT endogènes

L'expression de tous les gènes sélectionnés a pu être analysée par qPCR. Pour 18 gènes sur les 34 étudiés aucune différence significative n'a été observée. Il s'agit des gènes : *MtAMT1.1*, *MtAMT1.4*, *MtAMT1.a.mf*, *MtAMT1.b.mf*, *MtAMT1.c.mf*, *MtAMT1.d.mf*, *MtAMT2.1.mf*, *MtAMT2.2.mf*, *MtSUT1.2*, *MtSUT4.2* ; *SbAMT1.1*, *SbAMT1.2*, *SbAMT2.1*, *SbAMT2.2*, *SbAMT3.1*, *SbAMT3.2*, *SbAMT3.3*, *SbAMT4*, *SbSUT1*, *SbSUT2*, *SbSUT3*, *SbSUT4* et *SbSUT5*.

L'expression de 6 gènes codant pour des AMT de *M. truncatula* (*MtAMT1.2*, *MtAMT2.1.mf*, *MtAMT2.3*, *MtAMT3.mf*, *MtAMT4.3.mf* et *MtAMT4.4.mf*) est significativement différente en fonction des conditions de culture (monoculture vs culture mixte) et/ou les traitements (CMA seul, rhizobactéries seules ou co-inoculation) (Tableau 2 basé sur les résultats d'expression des gènes montrés Figure 11).

Gènes	Conditions					
	Monoculture			Culture mixte		
	C (bact)	D (champ)	E (bact/champ)	C (bact)	D (champ)	E (bact/champ)
<i>MtAMT1.2</i>						
<i>MtAMT2.1.mf</i>						
<i>MtAMT2.3</i>						
<i>MtAMT3.mf</i>						
<i>MtAMT4.3.mf</i>						
<i>MtAMT4.4.mf</i>						

Tableau 2 : Gènes de transporteurs d'ammonium de *M. truncatula* montrant une expression significativement différente selon les conditions étudiées. Les cases colorées en rouge montrent qu'il y a des différences significatives entre les traitements.

L'expression de cinq gènes (4 de *M. truncatula* et 1 de *S. bicolor*) codant pour des SUT (*MtSUT1.1*, *MtSUT1.3*, *MtSUT2*, *MtSUT4.1* et *SbSUT6*) est significativement différente selon les conditions de culture (monoculture vs culture mixte) et/ou les traitements (CMA seul, rhizobactéries seules ou co-inoculation) (Tableau 3 basé sur les résultats d'expression des gènes montrés Figure 11).

Gènes	Conditions					
	Monoculture			Culture mixte		
	C (bact)	D (champ)	E (bact/champ)	C (bact)	D (champ)	E (bact/champ)
<i>MtSUT1.1</i>						
<i>MtSUT1.3</i>						
<i>MtSUT2</i>						
<i>MtSUT4.1</i>						
<i>SbSUT6</i>						

Tableau 3 : Gènes de transporteurs d'ammonium et de saccharose de *M. truncatula* (*Mt*) et *S. bicolor* (*Sb*) montrant une expression significativement différente selon les conditions étudiées. Les cases colorées en rouge montrent qu'il y a des différences significatives entre les traitements.

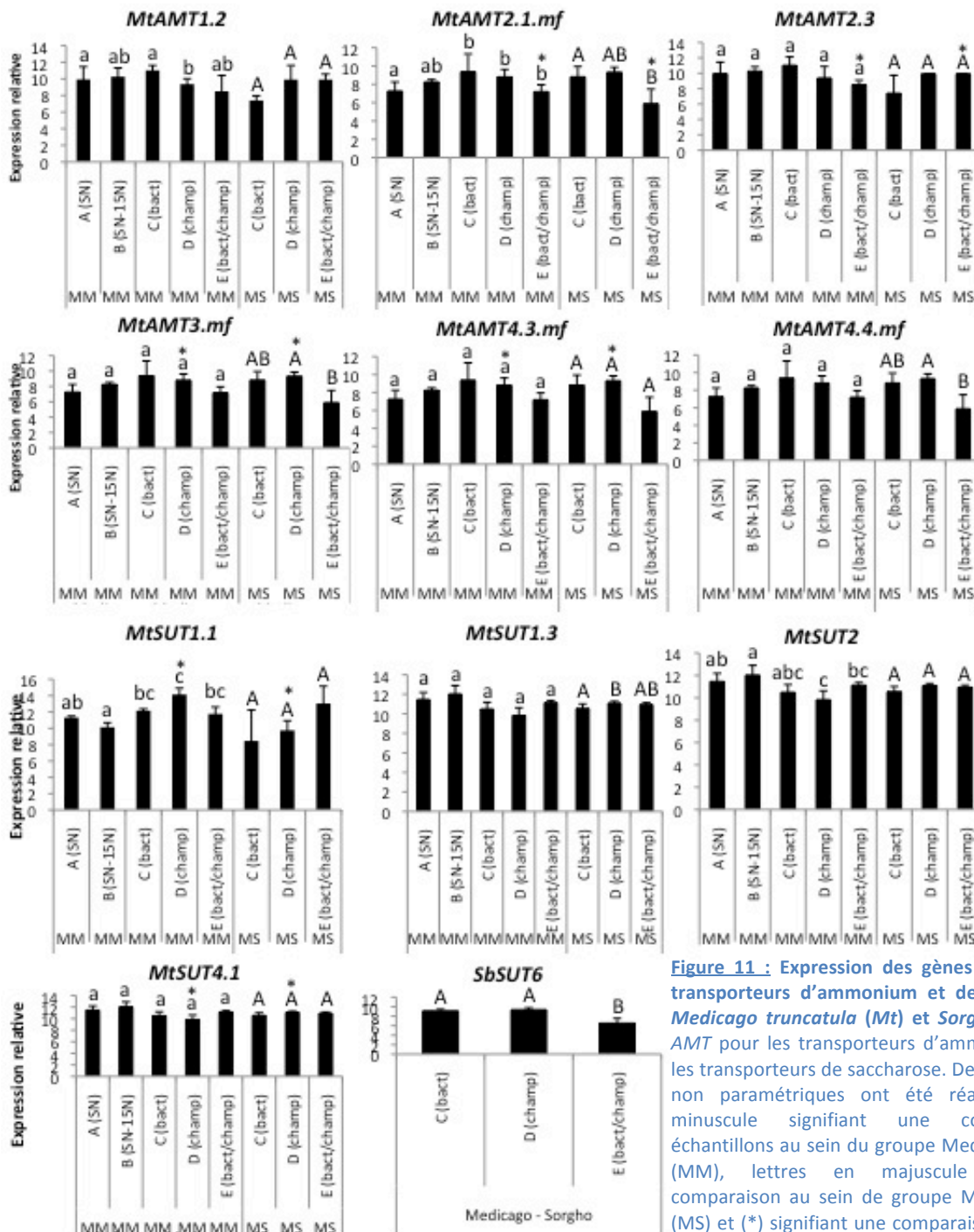


Figure 11 : Expression des gènes codant pour des transporteurs d'ammonium et de saccharose chez *Medicago truncatula* (*Mt*) et *Sorghum bicolor* (*Sb*). AMT pour les transporteurs d'ammonium, SUT pour les transporteurs de saccharose. Des tests statistiques non paramétriques ont été réalisés: lettres en minuscule signifiant une comparaison des échantillons au sein du groupe Medicago – Medicago (MM), lettres en majuscule signifiant une comparaison au sein de groupe Medicago – Sorgho (MS) et (*) signifiant une comparaison entre les deux groupes cités précédemment1.

Les mesures de spectrométrie de masse en phase gazeuse sont toujours en cours d'analyse.

2. Etude 2 : Régulation spatiale des transporteurs de sucres par le biais de l'endocytose

A. Effet de la perturbation de l'endocytose sur l'absorption de saccharose

Afin de mieux comprendre à l'échelle cellulaire l'effet de la perturbation de l'endocytose sur le transport de saccharose, nous avons travaillé en système cellulaire simplifié sur différentes lignées (voir matériel & méthodes).

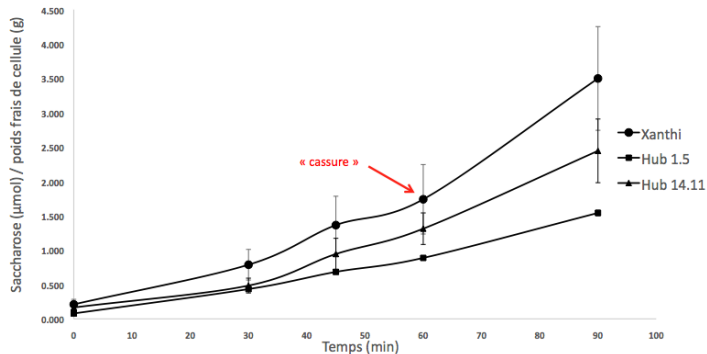


Figure 12 : Effet de la perturbation de l'endocytose sur l'absorption de saccharose radioactif dans les cellules de tabac. Les mesures ont été réalisées sur des cellules de tabac sauvages (lignée Xanthi) et mutées pour l'endocytose à clathrine (lignées Hub 1.5 et Hub 14.11). Quatre réplicats biologiques et deux prélèvements pour chaque temps ont été effectués.

Pour les cellules témoin Xanthi, nous pouvons observer sur la Figure 12 une absorption de saccharose radioactif croissante au cours du temps mais nous notons aussi la présence d'une « cassure » dans la courbe à 60 min. Pour les cellules Hub 14.11 (mutant exprimant plus fortement le « Hub », thèse Adam, 2012), l'allure de la courbe ressemble fortement à celle des cellules Xanthi mais l'absorption est ralentie. Pour les cellules Hub 1.5, l'absorption de saccharose est plus fortement ralentie par rapport au témoin Xanthi mais nous n'observons pas de « cassure » dans la courbe. Toutefois, le ralentissement de l'absorption de saccharose est moins important que dans les cellules Hub 1.5.

B. Effet de la perturbation de l'endocytose sur la mise en place de la mycorhize à arbuscules

Afin d'appréhender si l'endocytose, par son effet éventuel dans l'abondance des transporteurs à la membrane, joue un rôle dans l'établissement de la MA, nous avons estimé la colonisation racinaire par le CMA dans les plants de tabacs témoins (lignée sauvage Xanthi et lignée pMDC exprimant le vecteur de transformation vide) ou mutés pour l'endocytose à clathrine (lignées Hub), inoculés avec *R. irregularis*.

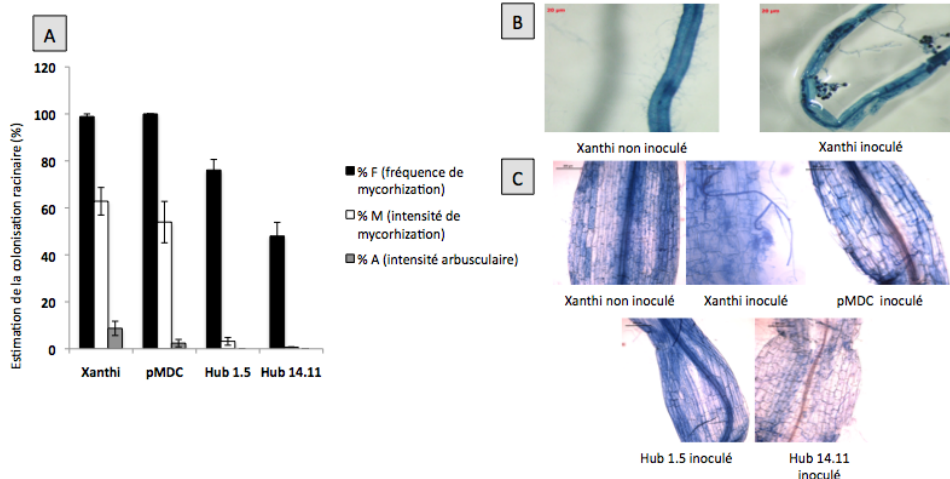


Figure 13 : Analyse du taux de mycorhization de plants de tabacs inoculés avec *Rizophagus irregularis*. A) Estimation de la colonisation racinaire calculée avec la fréquence de mycorhization (% F = efficacité de pénétration du CMA dans la racine), l'intensité de mycorhization (% M = zones racinaires colonisées donnant les futures régions symbiotiques) et l'intensité arbusculaire (% A = l'établissement de la symbiose via l'apparition des structures d'échanges). B) Images à la loupe binoculaire de racines de tabacs colorées au bleu Trypan (objectifs x10 et x2,5). C) Images de microscopie optique à champ large de racines de tabacs colorées au bleu Trypan (objectifs x10 et x40).

La fréquence de mycorhization (F) pour les plants de tabac sauvage est de 100 % (Figure 13A). Les plants témoins transformés avec le vecteur vide pMDC ont la même valeur de F que les Xanthi. En ce qui concerne les mutants, ce paramètre F est pour le Hub 1.5 et Hub 14.11 respectivement d'environ 80 % et 55 %. En ce qui concerne l'intensité globale de mycorhization (M), nous observons une diminution très marquée pour les plants mutants. L'intensité arbusculaire dans le système racinaire

(A) est d'environ 20 % pour les Xanthi, d'environ 5 % pour les plants pMDC et nulle pour les lignées Hub. Afin de vérifier la présence du CMA, des analyses à la loupe binoculaire ont été réalisées (Figure 14B) : nous voyons clairement que chez les plants non inoculés, le CMA est absent contrairement aux plants inoculés où l'on observe la présence d'hyphes et de spores. Au microscope photonique, des hyphes et des arbuscules sont observées dans les racines de plants Xanthi inoculés alors que chez les plants pMDC, seuls des hyphes sont visibles (Figure 14C). Pour la lignée exprimant plus fortement le transcrit Hub (thèse Adam, 2012), nous n'observons pas la présence du CMA.

III. Discussion et conclusions

1. Etude 1 : Flux de carbone et d'azote dans un réseau mycélien et expression des gènes codant pour des transporteurs de sucres et d'ammonium à l'interface du réseau mycélien

Dans cette étude, le transfert d'éléments nutritifs tels que l'N au sein d'un RMC entre deux plantes hôtes en monoculture (Medicago - Medicago) ou en culture mixte (Medicago - Sorgho), ainsi que le transfert de C de ces deux plantes hôtes vers le CMA ont été examinés. Les objectifs étaient d'étudier le transfert d'éléments nutritifs du CMA vers les plantes hôtes, l'investissement de C des plantes hôtes dans le CMA et le rôle des rhizobactéries comme deuxième symbiote impliqué dans le transfert d'N.

- Biomasse végétale

Nos résultats ont permis de montrer que la présence des deux symbiotes avait un effet sur le développement des plants de *M. truncatula*. En effet, en condition de culture mixte, lorsque les deux symbiotes sont présents, la partie aérienne est moins développée. Au contraire, en condition de monoculture, c'est la partie racinaire qui est plus développée lorsque les deux symbiotes sont présents. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'en culture mixte, il s'installe une concurrence entre les deux symbiotes et entre les deux plantes pour attirer le CMA et échanger des nutriments avec lui. En effet, les rhizobactéries ne peuvent établir de symbiose qu'avec *M. truncatula*. Ainsi, le CMA a tout intérêt à établir une symbiose avec *S. bicolor* afin de ne pas partager les ressources carbonées avec les rhizobactéries. Alors qu'en monoculture, la plante favorise le développement de son système racinaire afin de pouvoir « héberger » les deux symbiotes (Smith and Read, 2008).

- Nodosités

Dans notre étude, nous avons pu observer que les plants de *M. truncatula* cultivés en monoculture et qui sont mycorhizés (inoculés avec le CMA) présentaient un nombre significativement plus élevé de nodules. Ainsi dans notre système, nous pouvons affirmer que la présence du CMA est plutôt bénéfique pour le développement des rhizobactéries et non concurrentiel comme l'ont montré d'autres études : en présence de deux symbiotes, *Bradyrhizobium japonicum* (rhizobactérie) et *Glomus irregularis* (CMA), le taux de fixation d'N augmentait même si le nombre de nodules formés au niveau des racines de *Glycine max* diminuait, par rapport à la symbiose avec *B. japonicum* seul (Juge *et al.*, 2012) ; la formation de nodules sur les racines de *Medicago sativa* était réduite suite à l'inoculation avec le CMA (Catford *et al.* (2003) ; le mutant végétale (MYC+) affecte négativement la nodulation (NOD-) (Morandi *et al.*, 2009). Néanmoins toutes ces études ayant été menées sur une seule plante associée à deux symbiotes, la présence dans notre étude d'une deuxième plante connectée à la première par le RMC, peut expliquer cette opposition entre nos résultats. Dans notre cas, nous pouvons donc nous attendre à ce que les analyses en cours montrent qu'il y ait plus de fixation d'N lorsque les plants sont co-inoculés avec les deux symbiotes microbiens.

- Taux de mycorhization

Le taux de mycorhization peut varier selon la plante hôte, le partenaire fongique mais aussi et surtout selon les éléments nutritifs présents dans le sol. Dans notre étude, le taux de mycorhization des deux plantes est en accord avec ce qui a été précédemment décrit pour *M. truncatula* et *S. bicolor* (Morandi *et al.* 2009 ; Walder *et al.* 2012) puisque le taux de mycorhization se situe entre 40 et 70 %. De plus, les conditions de fertilisation jouent un rôle fondamental dans la mise en place de la MA. En effet, il a été démontré que la restriction combinée d'N et de P stimulait la formation de la MA dans les racines de *M. truncatula* (Bonneau *et al.* 2013), ce qui est visible par l'expression des gènes *MtPT4* et *MtBCP1*, gènes marqueurs de la mycorhize, qui étaient significativement augmentée lorsque les plants

étaient soumis à une fertilisation faible à la fois en N et en P (Bonneau *et al.* 2013). Ceci indique alors que des déficiences en N et P ont des effets cumulatifs sur la mise en place de la MA. Nous avons démontré que la pénétration du champignon (F%) dans les racines de *M. truncatula* était meilleure lorsque les rhizobactéries sont présentes dans des conditions de culture mixte. Cependant, nous avons également montré que les racines de *M. truncatula* étaient moins riches en arbuscules en culture mixte lorsque les rhizobactéries sont présentes dans le système, ce qui peut s'expliquer comme mentionné précédemment par le fait que le CMA favorise l'association avec *S. bicolor* dont il est le seul partenaire (pas de compétition pour les ressources carbonées issues de la plante).

- Expression des AMT et SUT endogènes

Toutes les amorces étaient spécifiques de leur séquence, cependant certaines (*MtAMT1.a.mf*, *MtAMT1.b.mf*, *MtAMT1.d.mf* et *MtAMT2.2.mf*) se complexaient en dimères pouvant jouer sur le niveau d'expression des gènes étudiés, masquant une éventuelle variation dans l'expression de ces gènes.

Pour l'expression des gènes codant pour des AMT et SUT, nous avons démontré des disparités d'expression selon le mode de culture. En effet, les AMT de *M. truncatula* (*MtAMT2.1.mf*, *MtAMT2.3*, *MtAMT3.mf* et *MtAMT4.3.mf*) sont régulés à la hausse lorsque les plants de *M. truncatula* partagent le même RMC avec *S. bicolor*. Seul un gène codant pour un AMT de *M. truncatula* (*MtAMT2.1*) a montré une expression régulée à la baisse dans les cultures mixtes. Ceci peut avoir une explication : chez les plants de *M. truncatula* étudiés, des fleurs puis des graines, ont commencé à se développer au bout de 10 semaines de développement, ceci a pu influencer l'acquisition mais également l'allocation des ressources. En effet, les nutriments vont plutôt être redirigés vers les organes en développement (*e.g.* fleurs) pouvant alors engendrer des différences dans les mesures de flux de nutriments. Afin de limiter cet effet, les fleurs ont été coupées au fur et à mesure de leur apparition.

Pour *S. bicolor*, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences significatives concernant les AMT. Il a été montré précédemment que lors d'une culture simple *S. bicolor* présente une régulation à la hausse des gènes *SbAMT3.1* et *SbAMT4* en présence du CMA (Koegel *et al.* article en soumission), alors qu'en culture mixte (*S. bicolor* avec *Linum usitatissimum*) la teneur en N diminuait (Walder *et al.* 2012) signifiant ainsi que *S. bicolor* reçoit moins de bénéfices de la symbiose. Les résultats des analyses de dosage de nutriments par spectrométrie de masse, en cours sur les tissus végétaux obtenus lors de ce stage, montreront peut être une allocation en N différente selon les conditions et ce bien que l'expression des AMTs ne soient pas modifiées. En effet d'autres modes de régulations du transport d'azote sont possibles (traductionnel, post-traductionnel).

L'expression de deux gènes codant pour des SUT chez *M. truncatula* (*MtSUT1.1* et *MtSUT4.1*) sont régulés à la baisse en culture mixte. Ceci peut être interprété de la manière suivante : les plants de *M. truncatula* partageant le même RMC investissent peu dans la symbiose (SUT exprimés à la baisse) mais peuvent recevoir beaucoup de nutriments provenant du RMC (AMT exprimés à la hausse). En effet, lors d'un essai préalable de culture mixte entre le lin (*Linum usitatissimum*) et le *S. bicolor* (Walder *et al.* 2012), *S. bicolor* a été identifié comme une plante investissant énormément dans la symbiose mais recevant peu de nutriments en retour.

Le bon investissement du *S. bicolor* dans le RMC observé par Walder et collaborateurs (2012) est ici confirmé par le résultat obtenu pour *SbSUT6* dont l'expression était régulée à la hausse. Nous confirmons donc que dans un réseau multitrophique, l'investissement des plants en connexion par le même RMC peut être différent comme l'avait démontré Walder *et al.* (2012) : *S. bicolor* investit plus dans le RMC et reçoit peu en retour, par contre *M. truncatula* tire les bénéfices de la symbiose sans pour autant investir autant que le *S. bicolor* dans le RMC. Cette hypothèse sera confortée ou réfutée par la mesure des flux de nutriments *via* des analyses de spectrométrie de masse ($\delta^{15}\text{N}$ et ^{13}C).

Outre des différences dans les modes de cultures, nous avons également démontré des différences significatives selon les conditions appliquées au sein d'un même mode de culture. En effet, les gènes *MtAMT1.2* et *MtSUT2* montrent des différences d'expression au sein du groupe ayant subi une monoculture : *MtAMT1.2* est régulé à la baisse lorsque seul le CMA est présent et *MtSUT2* est également régulé à la baisse lorsque le CMA seul est présent mais est, également, régulé à la baisse lorsque les deux symbiontes microbiens sont présents. D'autres gènes, comme *MtAMT4.4.mf* et *MtSUT1.3* montrent une expression différentielle au sein du groupe ayant subi une culture mixte : *MtAMT4.4.mf* est exprimé à la baisse lorsque les deux symbiontes microbiens sont présents alors que *MtSUT1.3* est régulé à la hausse uniquement en présence du CMA seul. Ceci confirme des régulations fines des échanges de nutriments entre plantes au cœur d'un RMC en fonction de la présence des

symbiotes microbiens. Walder *et al.* (2012) ont même montré que si la souche de CMA était modifiée, les échanges de nutriments au sein du RMC étaient modifiés

En culture mixte, le gène *MtSUT1.3* permettant le chargement primaire du phloème (Doidy *et al.* 2012) est régulé à la hausse dans les racines de *M. truncatula* alors que le gène *MtSUT2* permettant le chargement/déchargement secondaire du phloème (Doidy *et al.* 2012) est régulé à la baisse en monoculture. Ainsi nous pouvons émettre l'hypothèse que selon la nature de la plante connectée à la première par le RMC, le chargement/déchargement du phloème est différent : en culture mixte, *M. truncatula* prends une majorité des bénéfiques de la symbiose et un chargement du phloème actif est nécessaire pour « récompenser » les partenaires. Pour les gènes codant pour des AMT, nous avons émis une autre hypothèse. En effet, en culture mixte, le gène *MtAMT4.4.mf* est régulé à la baisse dans les racines de *M. truncatula*, ce qui est le cas du gène *MtAMT1.2* en monoculture, lorsque les deux symbiotes sont présents. Ceci peut être dû à l'entrée d'une nouvelle source d'azote, amenée par les rhizobactéries. Cette régulation des transporteurs d'ammonium peut s'expliquer par l'utilisation de transporteurs différents (affinité, efficacité) selon le(s) partenaire(s) microbien avec le(s)quel(s) la plante interagit pour l'N.

En conclusion, l'étude 1 a permis de montrer une régulation fine des échanges de C et d'N dans le cadre d'interactions multitrophiques. Cette régulation étant dépendante de la nature des symbiotes microbiens telluriques, mais aussi de la nature des plantes connectées et donc en « concurrence » pour les échanges avec le même CMA. Cette régulation des échanges pourra être confirmée par les dosages en cours (spectrométrie de masse) pour l'N et le C.

2. Etude 2 : Régulation spatiale des transporteurs de sucres par le biais de l'endocytose

A. Effet de l'endocytose sur l'absorption de saccharose à l'échelle cellulaire

Dans cette étude, nous avons analysé l'effet potentiel de la perturbation de l'endocytose à clathrine sur les transporteurs de sucres de cellules de tabac pouvant jouer sur leur régulation spatiale. De plus, l'objectif était d'identifier si l'endocytose jouait un rôle dans la mise en place de la MA, et notamment via une régulation spatiale des transporteurs de sucres.

Pour l'absorption de saccharose dans les cellules Xanthi, nous observons un point de « cassure » sur la courbe. Nous émettons l'hypothèse suivante : à partir d'une concentration externe en sucres critique (point de « cassure »), la nature des transporteurs de sucres n'est pas la même. En effet, avant la « cassure », nous considérons que la concentration externe en sucres est suffisante, donc ce sont plutôt des transporteurs de type « LC-HF » ayant une capacité faible mais une haute affinité (Sauer, 2007) qui sont exprimés par les cellules de tabac. Cependant à partir de la concentration critique en sucres (point de « cassure »), nous considérons que la concentration externe en sucres est tellement faible que cela engendre la perception d'un stress abiotique qui résulte en des modifications dans le type de transporteurs de sucres exprimés : ici nous aurons probablement l'expression de transporteurs de type « LA-HC » ayant une faible affinité mais une haute capacité (Sauer, 2007). Ces derniers permettent l'entrée d'une quantité suffisante de sucres nécessaire à la survie cellulaire lorsque les cellules sont dans des conditions de stress. Pour l'absorption de saccharose dans les cellules ayant une endocytose perturbée, nous n'avons pas observé de point de « cassure » comme pour les cellules Xanthi. Cependant, nous avons vu que l'absorption de saccharose était ralentie par rapport à celle des cellules Xanthi. En effet, pour les cellules mutantes de type Hub 1.5, l'absorption de saccharose est fortement ralentie comparée aux cellules Xanthi. Nous pouvons émettre l'hypothèse que si l'absorption de saccharose est fortement ralentie, cela signifie que l'on atteint la concentration externe critique en sucres beaucoup plus tardivement et donc la « cassure » ne serait pas atteinte, si elle a lieu, pour notre cinétique (90 min). Il faudrait alors faire des cinétiques beaucoup plus longues afin de valider cette hypothèse. Nous avons également vu que le mutant Hub 14.11 (expression plus forte de la séquence codant le Hub) avait une absorption de saccharose ralentie par rapport aux cellules Xanthi. Cependant, cette absorption était beaucoup moins lente que pour les cellules du simple mutant Hub 1.5. Or nous nous attendions à ce que l'effet de la perturbation de l'endocytose *via* les Hub 14.11 (double insertion) soit beaucoup plus marqué que pour les cellules Hub 1.5 (simple insertion). Face à ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que la double insertion résulte en une perturbation plus forte de l'endocytose à clathrine qui pourrait résulter en une réduction du nombre de transporteurs présents à la membrane et donc la perception d'un stress « sucre » par la cellule très précocement dû à une réduction de l'entrée

de sucres malgré une concentration extérieure élevée. Ainsi, nous pourrions avoir une majorité transporteurs de sucres de type « LA-HC » afin de faire rentrer le maximum de sucres pour assurer la survie cellulaire.

En conclusion, les flux de saccharose beaucoup moins importants dans les cellules ayant une endocytose perturbée confortent l'hypothèse que dans ces cellules mutantes le transport de saccharose est modifié. Cet effet visible à l'échelle cellulaire pourrait avoir des conséquences sur la mise en place de la symbiose de type MA par les plants de tabac issus des cellules mutées.

B. Effet de la perturbation de l'endocytose sur la mise en place de la mycorhize à arbuscules (plantes entières)

Dans cette étude, nous avons étudié l'hypothèse, émise à la suite des essais sur les cellules de tabac, d'un effet possible de la perturbation de l'endocytose à clathrine sur la mise en place de la MA.

La fréquence de mycorhization de 100% pour les plants Xanthi correspond à une bonne pénétration du champignon dans les racines et illustre donc la qualité de l'inoculum utilisé (Trouvelot *et al.* 1986). Après analyse des résultats, nous pouvons voir que les mutants exprimant le gène tronqué de CHC, agissant comme un gène dominant négatif, se comportent comme des mutants MYC- car ils présentent une altération complète de la mise en place de la MA. L'absence totale d'arbuscule dans les racines de ces mutants permet d'émettre l'hypothèse qu'aucun échange de nutriments ne peut avoir lieu entre les deux partenaires (du moins dans les temps observés) et que l'endocytose à clathrine est donc essentielle à la mise en place de la MA, probablement au travers de l'internalisation de signaux d'origine fongique. Cela est en accord avec des travaux montrant que la pré-pénétration des CMA ainsi que la biogenèse de l'interface symbiotique sont associés à une intense extension de la MP où des marqueurs tels que la clathrine sont accumulés (Genre and bonfante, 1999 ; Genre *et al.* 2012). Très récemment, l'expression du domaine Hub a également été étudiée chez le lotier (*Lotus japonicus*) en interaction mutualiste avec des rhizobactéries (Wang *et al.* 2015). Cette étude a montré une inhibition de l'expression des gènes précoces de la nodulation impactant la nodulation racinaire en accord avec nos résultats sur un type de symbiose différent. Néanmoins, il est à noter que la nodulation des légumieuses serait une évolution relativement récente de la MA et que de nombreuses étapes initiales font intervenir des mécanismes et donc des gènes communs au niveau de la plante (gènes SYM, Smith et Read, 2008). Afin de voir si la plante perçoit malgré tout le CMA et tente de mettre en place une symbiose, les échantillons prélevés lors de nos expériences pourront permettre d'analyser l'expression de gènes marqueurs spécifiques de la MA tel celui codant le transporteur de phosphate PT4 (Harrison *et al.* 2002). Outre un effet global de l'endocytose nécessaire pour la mise en place de la MA, il est tentant de relier ce phénomène à nos résultats sur cellules en suspension où l'entrée du saccharose radioactif est perturbée dans les cellules en suspension pour les deux lignées mutantes Hub, qui dérivent des plantes dont la mycorhization n'a pas pu se mettre en place. Ainsi, les flux de saccharose perturbés dans les cellules Hub pourrait refléter une perturbation plus globale des échanges de sucres et notamment de l'export de sucres vers le CMA qui perturberait la mise en place de la MA. Il serait alors intéressant d'analyser les flux de sucres dans les plants entiers de tabac ayant une endocytose perturbée. Ceci pourrait être fait par des mesures de sucres radioactifs directement sur les feuilles ou encore à l'aide de senseurs de sucres fluorescents (Deuschle *et al.* 2005).

En conclusion nos travaux permettent d'émettre l'hypothèse que la régulation spatiale de transporteurs de saccharose est affectée par la perturbation de l'endocytose à clathrine. Nous pouvons proposer, en perspective, d'analyser l'expression des transporteurs de saccharose chez le tabac puis de faire un suivi intracellulaire de certains tel que SUT2 qui est essentiel à la mycorhization (Doidy *et al.* 2012), et qui a été trouvé dans des vésicules intracellulaires (Bitterlich *et al.* 2014).

Références bibliographiques

- Adam T., Bouhidel K., Der C., Robert F., Najid A., Simon-Plas F. and Leborgne-Castel N. 2012. Constitutive expression of clathrin hub hinders elicitor-induced clathrin-mediated endocytosis and defense gene expression in plant cells. *FEBS Lett.* 586:3293–3298
- Akiyama K., Matsuzaki K. and Hayashi H. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature.* 435:824–827
- Bago B., Pfeiffer P.E., Abubaker J., Jun J., Allen J.W., Brouillette J., Douds D.D., Lammers P.J. and Shachar-Hill Y. 2003. Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiol.* 131:1496–1507

- Baier M.C., Keck M., Godde V., Niehaus K., Kuster H. and Hohnjec N. 2010. Knockdown of the Symbiotic Sucrose Synthase MtSucS1 Affects Arbuscule Maturation and Maintenance in Mycorrhizal Roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 152:1000–1014
- Barea J.M. and Jeffries P. 1995. In *Mycorrhiza* (Varma, P.D.A. and Hock, P.D.B., ed). pp. 521–560, Springer Verlag, Berlin
- Bécard G., Douds D.D. and Pfeffer P.E. 1992. Extensive in vitro hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:821–825
- Beilby J.P. 1980. Fatty acid and sterol composition of ungerminated spores of the vesicular- arbuscular mycorrhizal fungus, *Acaulospora laevis*. *Lipids* 15:949–952
- Besserer A., Puech-Pagès V., Kiefer P., Gomez-Roldan V., Jauneau A., Roy S., Portais J.C., Roux C., Bécard G. and Séjalon-Delmas N. 2006. Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol.* 4(7):e226
- Bitterlich M., Krügel U., Boldt-Burisch K., Franken P. and Kühn C. 2014. The sucrose transporter SISUT2 from tomato interacts with brassinosteroid functioning and affects arbuscular mycorrhiza formation. *Plant J.* 78:877–889
- Bonfante P. and Genre A. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat. Commun.* 1:48
- Bonneau L., Huguet S., Wipf D., Pauly N. and Truong H.N. 2013. Combined phosphate and nitrogen limitation generates a nutrient stress transcriptome for arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Medicago truncatula*. *New Phytol.* 199(1):188-202
- Bourque S., Lemoine R., Sequeira-Legrand A., Fayolle L., Delrot S. and Pugin A. 2002. The Elicitor Cryptogein Blocks Glucose Transport in Tobacco Cells. *Plant Physiol.* 130:2177-2187
- Buée M., Rossignol M., Jauneau A., Ranjeva R. and Bécard G. 2000. The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Mol. Plant Microbe In.* 13:693-698
- Burgess B.K., Lowe D.J. 1996. Mechanism of molybdenum nitrogenase. *Chemical Reviews.* 96:2983-3012
- Carpaneto A., Geiger D., Bamberg E., Sauer N., Fromm J., Hedrich R. 2005. Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force. *J. Biol. Chem.* 280(22):21437–21443
- Catford J.G., Staehelin C., Lerat S., Piché Y., Vierheilig H. 2003. Suppression of arbuscular mycorrhizal colonization and nodulation in split-root systems of alfalfa after pre-inoculation and treatment with Nod factors. *J. Exp. Bot.* 54:1481-1487
- Chandler M.T., Tandeau de Marsac N. and De Kouchkovsky Y. 1972. Photosynthetic growth of tobacco cells in liquid suspension. *Can. J. Bot.* 50:2265-2270
- Délando-Frier J.P. and Tejeda-Sartorius M. 2008. Unraveling the network : Novel developments in the understanding of signaling and nutrient exchange mechanisms in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Signal. Behav.* 3:936–944
- Deuschle K., Okumoto S., Fehr M., Looger L.L., Kozhukh L. and Frommer B. 2005. Construction and optimization of a family of genetically encoded metabolite sensors by semirational protein engineering. *Protein Sci.* 14:2304-2314
- Doidy J., van Tuinen D., Lamotte O., Corneillat M., Alcaraz G. and Wipf D. 2012. The *Medicago truncatula* Sucrose Transporter Family: Characterization and Implication of Key Members in Carbon Partitioning towards Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Mol. Plant.* 5:1346–1358
- Fitter A.H., Helgason T. and Hodge A. 2011. Nutritional exchanges in the arbuscular mycorrhizal symbiosis : Implications for sustainable agriculture. *Fungal Biol. Rev.* 25:68–72
- Gadkar V. and Rillig M.C. 2006. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin is a putative homolog of heat shock protein 60. *FEMS Microbiol. Lett.* 263:93–101
- Genre A. and Bonfante, P. 1999. Cytoskeleton-related proteins in tobacco mycorrhizal cells : gamma-tubulin and clathrin localisation. *Eur. J. Histochem.* 43:105-111
- Genre A. 2005. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Elicit a Novel Intracellular Apparatus in *Medicago truncatula* Root Epidermal Cells before Infection. *Plant Cell.* 17:3489–3499
- Genre A., Ort G., Bertoldo C., Martino E. and Bonfante P. 2009. Biotic and Abiotic Stimulation of Root Epidermal Cells Reveals Common and Specific Responses to Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Plant Physiol.* 149:1424–1434
- Genre A., Ivanov S., Fendrych M., Faccio A., Zarsky V. and Bisseling T. 2012. Multiple exocytotic markers accumulate at the sites of perifungal membrane biogenesis in arbuscular 684 mycorrhizas. *Plant Cell Physiol.* 53:244-255
- Gianinazzi S., Gollotte A., Binet M.N., van Tuinen D., Redecker D. and Wipf D. 2010. Agroecology : the key role of arbuscular mycorrhiza in ecosystem services. *Mycorrhiza.* 20:519–530

- Gomez-Roldan V., Fermas S., Brewer P.B., Puech-Pagès V., Dun E.A., Pillot J.P., Letisse F., Matusova R., Danoun S., Portais J.C., Bouwmeester H., Bécard G., Beveridge C.A., Rameau C. and Rochange S.F. 2008. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*. 455:189–194
- Govindarajulu M., Pfeffer P.E., Jin H., Abubaker J., Douds D.D., Allen J.W., Bücking H., Lammers P.J. and Shachar-Hill Y. 2005. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*. 435:819–823
- Graham J.H. 2000. In *Current advances in mycorrhizae research* (Podila, G.K. and Douds, D.D. Jr ed), pp. 127–140, APS Press, St. Paul
- Guo Y., Ni Y. and Huang J. 2010. Effects of rhizobium, arbuscular mycorrhiza and lime on nodulation, growth and nutrient uptake of lucerne in acid purplish soil in China. *Trop. Grassl.* 44:109–114
- Harrison M.J., Dewbre G.R. and Liu J. 2002. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell*. 14:2413–2429
- Heupel S., Roser B., Kuhn H., Lebrun M.H., Villalba F. and Requena N. 2010. Erl1, a novel era- like GTPase from *Magnaporthe oryzae*, is required for full root virulence and is conserved in the mutualistic symbiont *Glomus intraradices*. *Mol. Plant Microbe In.* 23:67–81
- Ho I., Trappe J.M. 1973. Translocation of ¹⁴C from Festuca plants to their endomycorrhizal fungi. *Nature*. 224:30–31
- Hodge A., Campbell C.D. and Fitter A.H. 2001. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature*. 413:297–299
- Joner E.J. and Jakobsen I. 1995. Growth and extracellular phosphatase activity of arbuscular mycorrhizal hyphae as influenced by soil organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 27:1153–1159
- Juge C., Prévost D., Bertrand A., Bipfubusa M., Chalifour F.P. 2012. Growth and biochemical responses of soybean to double and triple microbial associations with *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizae. *Appl. Soil Ecol.* 61:147–157
- Knoblauch M. and Peters W.S. 2010. Münch, morphology, microfluidics - our structural problem with the phloem : Münch, morphology, microfluidics. *Plant Cell Environ.* 33:1439–1452
- Kondorosi E., Mergaert P. and Kereszt A. 2013. A paradigm for endosymbiotic life : Cell differentiation of Rhizobium bacteria provoked by host plant factors. *Annu. Rev. Microbiol.* 67:611–628
- Krugel U., He H.X., Gier K., Reins J., Chincinska I., Grimm B., Schulze W.X. and Kuhn C. 2012. The Potato Sucrose Transporter StSUT1 Interacts with a DRM-Associated Protein Disulfide Isomerase. *Mol. Plant.* 5:43–62
- Leborgne-Castel N. and Bouhidel K. 2014. Plasma membrane protein trafficking in plant-microbe interactions : a plant cell point of view. *Plant Sci.* 5:735–747
- Maillet F., Poinot V., André O., Puech-Pagès V., Haouy A., Gueunier M., Cromer L., Giraudet D., Formey D., Niebel A., Martinez E.A., Driguez H., Bécard G. and Dénarié J. 2011. Fungal lipochitoooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature*. 469:58–63
- Morandi D., le Signor C., Gianinazzi-Pearson V., Duc G. 2009. A *Medicago truncatula* mutant hyper-responsive to mycorrhiza and defective for nodulation. *Mycorrhiza*. 19:435–441
- Nadeem S.M., Ahmad M., Zahir Z.A., Javaid A. and Ashraf M. 2014. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnol. Adv.* 32:429–448
- Patrick J.W. 1997. PHLOEM UNLOADING : Sieve Element Unloading and Post-Sieve Element Transport. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:191–222
- Pumplin N., Mondo S.J., Topp S., Starker C.G., Gantt J.S. and Harrison M.J. 2010. *Medicago truncatula* Vapyrin is a novel protein required for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant J.* 61:482–494.
- Redecker D., Kodner R. and Graham L.E. 2000. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*. 289:1920–1921
- Rennie E.A. and Turgeon R. 2009. A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106:14162–14167
- Sauer N. 2007. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Lett.* 581:2309–2317
- Sbrana C. and Giovannetti M. 2005. Chemotropism in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza*. 15:539–545
- Schaarschmidt S., Kopka J., Ludwig-Müller J. and Hause B. 2007. Regulation of arbuscular mycorrhization by apoplastic invertases : enhanced invertase activity in the leaf apoplast affects the symbiotic interaction : Enhanced invertase activity in the leaf apoplast affects AM. *Plant J.* 51:390–405
- Schüssler A. and Walker C. 2010. *The Glomeromycota. A species list with new families and new genera*. Royal Botanic Garden Edinburgh, Gloucester
- Selosse M.A., Setaro S., Glatard F., Richard F., Urcelay C. and Weiss M. 2007. Sebaciales are common mycorrhizal of Ericaceae. *New Phytol.* 174(4):864–78.
- Selvaraj T. and Subramanian G. 1990. Phenols and lipids in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of *Sesamum indicum*. *Curr. Sci.* 59:471–473
- Smith S.E. and Read D.J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis* (3rd edn). Academic Press, London

- Straub D., Ludewig U. and Neuhäuser B. 2014. A nitrogen-dependant switch in the high affinity ammonium transport in *Medicago truncatula*. *Plant Mol. Biol.* 86:485-494
- Tejeda-Sartorius M., Martínez de la Vega O. and Délano-Frier J.P. 2008. Jasmonic acid influences mycorrhizal colonization in tomato plants by modifying the expression of genes involved in carbohydrate partitioning. *Physiol. Plant.* 133:339–353
- Tian C., Kasiborski B., Koul R., Lammers P.J., Bucking H. and Shachar-Hill Y. 2010. Regulation of the Nitrogen Transfer Pathway in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis : Gene Characterization and the Coordination of Expression with Nitrogen Flux. *Plant Physiol.* 153:1175–1187
- Trouvelot A., Kough J.L. and Gianinazzi-Pearson V. 1986. In *Aspects physiologiques et génétiques des mycorrhizes*. pp. 217-221, INRA, Dijon
- Turgeon R. and Wolf S. 2009. Phloem Transport : Cellular Pathways and Molecular Trafficking. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60:207–221
- Van Bel A.J. 2003. Transport phloem : low profile, high impact. *Plant Physiol.* 131:1509–1510
- Walder F., Niemann H., Natarajan M., Lehmann M.F., Boller T. and Wiemken A. 2012. Mycorrhizal Networks : Common Goods of Plants Shared under Unequal Terms of Trade. *Plant Physiol.* 159:789–797
- Wang C., Zhu M., Duan L., Yu H., Chang X., Li L., Kang H., Feng Y., Zhu H., Hong Z. and Zhang Z. 2015. *Lotus japonicus* clathrin heavy Chain1 is associated with Rho-Like GTPase ROP6 and involved in nodule formation. *Plant Physiol.* 167(4):1497-510
- Wu Q.S., Li G.H., Zou Y.N. and others 2011. Roles of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nutrient acquisition of peach (*Prunus persica* L. batsch) seedlings. *J Anim. Plant Sci.* 21:746–750
- Yang Z.Y., Danyal K. and Seefeldt L.C. 2011. In *Nitrogen Fixation*, pp. 9-29, Springer Verlag, Berlin
- Yaseen T., Burni T. and Hussain F. 2013. Effect of arbuscular mycorrhizal inoculation on nutrient uptake, growth and productivity of cowpea (*Vigna unguiculata*) varieties. *Afr. J. Biotechnol.* 10:8593–8598