



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**Contribution à l'étude des facteurs de régulation
transcriptionnelle impliqués dans la synthèse des
effecteurs symbiotiques chez le champignon
ectomycorhizien *Laccaria bicolor*.**

Laura WEISS

12/05/2015-10/07/2015

Encadrée par: Claire VENEULT-FOURREY, Maître de conférences
Joske RUYTINX, Post-doctorante

Institut National de la recherche agronomique,
UMR 1136 INRA/Université de Lorraine
Unité Mixte de recherche IAM



Centre INRA de Nancy - Lorraine, Route d'Amance 54280 Champenoux

Remerciements

Je tiens à remercier les enseignants-chercheurs de l'Université de Lorraine responsables de la formation Microbiologie Environnementale et Sanitaire : Monsieur Frédéric JORAND, Monsieur Pierre LEBLOND et Monsieur Bertrand AIGLE, pour avoir assuré la partie théorique de cette dernière et pour leur accompagnement dans ma démarche de recherche de stage.

J'adresse ma reconnaissance à Monsieur **Eric GELHAYE** directeur de l'unité de recherche « Interactions Arbres-Micro-organismes (IAM) » ainsi qu' à Monsieur **Pascal FREY** pour m'avoir donnée l'opportunité d'effectuer mon stage au sein de l' INRA de Champenoux. Je tiens également à remercier Monsieur **Sébastien DUPLESSI** responsable de l'équipe « écogénomique des interactions » de l'unité de recherche IAM ainsi que tous les membres de son équipe de recherche et le pôle administratif, pour leur accueil chaleureux, leur aide et leur contribution au bon déroulement de ce stage.

J'adresse tout particulièrement mes remerciements à Monsieur **Francis MARTIN** responsable de la thématique de recherche « mécanismes moléculaires des interaction arbres-champignons-bactéries du sol » et responsable du Labex ARBRE pour m'avoir permis d' effectuer mon sage au sein de son équipe, pour m'avoir accordé sa confiance et m'avoir apporté son aide dans ma démarche de recherche pour mon projet post-Master 2 .

Je remercie également Madame **Claire VENAULT-FOURREY**, Maître de conférence à l'Université de Lorraine et maître de stage pour m'avoir encadré, ainsi que Madame **Joske RUYTINX**, post-doctorante pour avoir partager son expérience scientifique avec moi et pour m'avoir conseillé, guidé et soutenu au quotidien dans ma mission de stage.

Je tiens enfin à remercier tous les post-doctorants, doctorants, techniciens et stagiaires qui m'ont aidé lors de ce stage, pour leur bonne humeur et les bon moments partagés avec eux. Entre autre Yohann, Yannick, Thibaut, Clément, Cora, Mathieu, Océane, Cécile, Leticia, Salvatore, Maïra, Laure, Héma, Clémence, Romain, Emeric, Simon , Flora et Cornélia.

Sommaire

1. Introduction.....	1
1.1 L'INRA Nancy- Lorraine et l'unité de recherche IAM.....	1
1.2 Synthèse bibliographique.....	2
1.2.1 Les symbioses mycorhiziennes.....	2
1.2.2 Les ectomycorhizes.....	4
1.2.3 <i>Laccaria bicolor</i> et le peuplier : un model d'étude.....	5
1.2.4 Les effecteurs symbiotiques chez <i>Laccaria bicolor</i>	6
1.2.4.1 Définition.....	6
1.2.4.2 Un effecteur symbiotique indispensable à la mycorhization: MiSSP7.....	7
1.2.5 Les exsudats racinaires et leur rôle dans la symbiose.....	9
1.2.6 Les facteurs de régulation de la transcription chez <i>Laccaria bicolor</i>	10
2. Matériel et méthodes.....	11
2.1 Matériel biologique.....	11
2.1.1 Matériel fongique et conditions de culture.....	11
2.1.2 Matériel végétal et conditions de culture	12
2.2 Exposition du matériel fongique, aux flavonoïdes.....	13
2.2.1 Exposition du matériel fongique à la rutine et à la quercetine en milieu liquide.....	13
2.2.2 Exposition du matériel fongique à la rutine et à la quercetine sur milieu gélosé.....	13
2.2.3 Exposition du matériel fongique aux exsudats racinaires.....	14
2.3 Microscopie : caractérisation morphologique.....	14
2.4 Extraction d' ARN et synthèse d'ADNc.....	14
2.5 Amplification d'ADN en temps réel : RT-qPCR.....	15
2.6 Analyse statistique.....	17
2.6.1 Analyse statistique des résultats de variation de la biomasse fongique.....	17
2.6.2 Analyse statistique des résultats obtenus en microscopie optique.....	17
2.6.3 Analyse statistique des résultats d'expression des gènes MiSSP7, MiSSP8,5 et MiSSP17	17
3. Résultats.....	18
3.1 Étude des effets des exsudats racinaires, de la rutine et de la quercetine sur la biomasse et la morphologie du mycélium de <i>Laccaria bicolor</i> cultivé en milieu liquide.....	18
3.2 Étude de la variation de la biomasse et de la croissance fongique au cours du temps lors d'une exposition à des solutions de 10nM de quercetine ou rutine.....	21
3.3 Analyse de la régulation de l'expression de MiSSP7, MiSSP8,5, MiSSP17 par PCR quantitative	
3.3.1 Sélection des gènes de référence.....	24
3.3.2 Spécificité et efficacité des amorces.....	26

3.3.3 Étude de l'expression de MiSSP7, MiSSP8,5 et MiSSP17.....	27
4. Discussion.....	31
4.1 Biomasse, croissance et morphologie de <i>L.bicolor</i>	31
4.2 PCR quantitative.....	32
4.2.1 Sélection des gènes références.....	33
4.2.2 Étude de l'expression des gènes d'intérêt par RT-qPCR.....	34
4.3 Discussion générale et perspectives.....	34
Bibliographie.....	36
Annexes.....	39

Annexes

Annexe 1 : Organigramme fonctionnel de l'IAM.....	37
Annexe 2: Représentation schématique des différentes structures mycorhiziennes représenté sur une coupe transversale de racine	38
Annexe 3 : Tableau comparatif des principales caractéristiques des sept types de symbioses mycorhiziennes	39
Annexe 4 : Cycle de reproduction du champignon <i>Laccaria bicolor</i>	40
Annexe 5: Voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	41
Annexe 6: Effet des exsudats racinaires sur certains champignons mycorhiziens.....	42
Annexe7 : Composition du milieu de culture P5 (Milieu de PachlewskiP5).....	43
Annexe8 : Composition du milieu de culture P20 (Milieu de Pachlewski P20).....	43
Annexe 9: Composition du milieu Murashige et Skoog	44
Annexe 10 : Protocole d' extraction d'ARN fongique à l'aide du kit « RNeasy Mini Kit »	45
Annexe 11: Protocole de synthèse d'ADNc selon le kit « High-Capacity cDNA Reverse Transcription » du fabricant Life Biotechnologies.....	46
Annexe 12 : Tableau descriptif des gènes de référence testés.....	47
Annexe 13 : Séquences des couples d'amorces des gènes de références et des gènes d'intérêts.....	48
Annexe 14 : Courbe de fusion des gènes de références.....	50
Annexe 15: Courbes de fusion des gènes d'intérêts : MiSSP7, MiSSP8,5 et MiSSP17.....	51
Annexe 16: Droites de régression linéaire représentant les valeurs Ct en fonction du logarithme des dilutions d'ADNc, pour les couples d'amorces des gènes de références.....	52
Annexe 17 : Droites de régression linéaire représentant les valeurs Ct en fonction du logarithme des dilutions d'ADNc, pour les couples d'amorces des gènes d'intérêts.....	53

Figures

Figure 1: INRA Champenoux, Unité IAM, Bâtiment K	1
Figure 2 : Les trois niveaux de contrôle de l'interaction symbiotique entre les champignons ECM et les cellules végétales	5
Figure 3 : a) Représentation schématique de la sécrétion de la protéine MiSSP7 par <i>Laccaria bicolor</i> , son entrée par endocytose dans la cellule végétale, et son accumulation dans le noyau. b) Séquence de la protéine MiSSP7.....	8
Figure 4: Structure chimique de deux flavonols : a) Structure chimique de la rutine ; b) Structure chimique de la quercétine.....	9
Figure 5: Culture de <i>L.bicolor</i> S238N, sept jours sur milieu gélosé P5 et en milieu liquide P20	12
Figure 6 : Représentation graphique de la biomasse des mycéliums du champignon <i>L.bicolor</i> après 24h d'exposition à une gamme de concentration de rutine a) ou quercétine b).....	19
Figure 7 : Représentation graphique de la biomasse moyenne des mycéliums du champignon.....	20
Figure 8 : Représentation graphique du nombre moyen de ramification par μm d'hyphes de mycélium <i>L.bicolor</i> après 24h d'exposition à différentes concentrations de rutine a) ou de quercétine b).....	21
Figure 9 : Représentation graphique du nombre moyen de ramification par μm d'hyphes de mycélium <i>L.bicolor</i> après 24h d'exposition aux exsudats racinaires.....	21
Figure 10 : Représentation graphique de l'évolution de la biomasse moyenne des mycéliums <i>L.bicolor</i> au cours du temps en milieu liquide P20 (a) ou sur milieu gélosé P20 (b) supplémentés avec des solutions de rutine ou quercétine 10nM.....	22
Figure 11 : Représentation graphique de la biomasse du mycélium <i>L.bicolor</i> après 14j de culture sur milieu gélosé P20 supplémenté en rutine, quercétine 10nM ou eau ultra-pure.....	23
Figure 12 : Représentation graphique de l'évolution de la croissance des mycéliums <i>L.bicolor</i> au cours du temps, sur milieu gélosé P20 supplémenté en rutine ou quercétine 10nM.....	24
Figure 13 : Représentation graphique de la variation par paire de gènes : valeur V (gauche) et de la moyenne des variations par paire de gènes : valeur M (droite) pour les échantillons exposés à la gamme de concentration de rutine.....	24
Figure 14: Représentation graphique de la variation par paire de gènes : valeur V (gauche) et de la moyenne des variations par paire de gènes : valeur M (droite) pour les échantillons exposés à la gamme de concentration de quercétine.....	25
Figure 15: Représentation graphique de la variation par paire de gènes : valeur V (gauche) et de la moyenne des variations par paire de gènes : valeur M (droite) pour les échantillons exposés ou non aux racines de peuplier.....	26

Figure 16 : Représentation de l'expression relative de MiSSP7 par rapport au contrôle (0M rutine) en fonction de la concentration d'exposition en rutine après 24h.....	28
Figure 17 : Représentation de l'expression relative de MiSSP8,5 par rapport au contrôle (0M rutine) en fonction de la concentration d'exposition en rutine après 24h.....	28
Figure 18 : Représentation de l'expression relative de MiSSP17 par rapport au contrôle (0M rutine) en fonction de la concentration d'exposition en rutine après 24h.....	28
Figure 19 : Représentation de l'expression relative de MiSSP7 par rapport au contrôle (0M quercetine) en fonction de la concentration d'exposition en quercetine après 24h.....	29
Figure 20 : Représentation relative de l'expression de MiSSP17 par rapport au contrôle (0M quercetine) en fonction de la concentration d'exposition en quercetine après 24h.....	29
Figure 21: Représentation relative de l'expression de MiSSP7 après 24h d'exposition aux racines de peuplier par rapport au contrôle (absence de racines).....	30
Figure 22: Représentation relative de l'expression de MiSSP8,5 après 24h d'exposition aux racines de peuplier par rapport au contrôle (absence de racines).....	30
Figure 23: Représentation relative de l'expression de MiSSP17 après 24h d'exposition aux racines de peuplier par rapport au contrôle (absence de racines).....	30
.....	31

Tableaux

Tableau 1: Efficacité de la réaction RT-qPCR avec les couples d'amorces des gènes de référence et des gènes d'intérêt.....	27
--	----

Abréviations

aa : acides aminés

AM : mycorhizes arbusculaire

BiFC : bimolecular fluorescence complementation

ECM : ectomycorhize

ECMs : ectomycohyziens

ETI : effector triggered immunity

FLM: free living mycelium

FN : facteur de normalisation

IBA : indole butyric acid

MAMPs : Microbe-associated molecular patterns

MiSSPs : mycorrhiza-induced small secreted proteins

PAMPs :Pathogen- associated molecular patterns

N : azote

P : phosphore

PCWDEs: plant cell wall–degrading enzymes

PAL : phénylalanine amonia lyase

PTI : pattern trigged immunity

SE : Standard error, erreur standard

SSPs : small secreted proteins, petites protéines sécrétées

TF : Transcription factor (Facteur de transcription)

1. Introduction

1.1 L'INRA Nancy- Lorraine et l'unité de recherche IAM

Créée en 1946, c'est en 1960 que l'INRA s'est implantée en Lorraine sur le site de Mirecourt puis sur celui de Champenoux en 1972 (Bernardi, 2013b) Actuellement l' INRA de Nancy est dirigé par Erwin Dreyer, il comprend environ 500 personnes réparties dans 16 unités: des Unités Mixtes de Recherche (UMR), des Unités de Recherche (UR) ou des Unités sous Contrat (Bernardi, 2013a). Le centre Inra de Nancy-Lorraine développe des recherches sur les écosystèmes forestiers (axe forêt-bois-territoire) et sur l'ingénierie et la sécurité sanitaire des aliments en partenariat avec AgroParisTech et l'Université de Lorraine (Bernardi, 2013c). Dans le cadre des investissements d'avenir, il est associé à six projets dont le Labex ARBRE (Laboratoires d' excellence, Advanced Research on the Biology of Tree and Forest Ecosystems), dont l'objectif est de mieux comprendre les mécanismes qui régissent l'évolution des écosystèmes forestiers, pour prévoir leurs réponses à moyen et long terme aux changements globaux et mettre au point des méthodes de gestion adaptées (Bernardi, 2013d, 2014).



Figure 1: INRA Champenoux, Unité IAM, Bâtiment K (Araud, 2013)

L'Unité Mixte de Recherche 1136 INRA /Université de Lorraine «Interactions Arbres/ Micro-organismes», est dirigée par monsieur Eric Gelhaye. L'IAM est structurée en trois équipes: «écogénomique des interactions» et «écologie des champignons pathogènes forestiers» localisées à Champenoux et «réponses au stress et régulations Redox» localisée sur le campus de l'Université de Lorraine. Un organigramme fonctionnel de l'unité est présenté en annexe 1 (INRA, 2013b). L'IAM étudie la biologie et l'écologie des interactions entre micro-organismes (champignons et bactéries rhizosphériques) et arbres forestiers dans le but d'améliorer la connaissance des interactions qui s'établissent entre ces derniers et qui contribuent au fonctionnement et à la durabilité des écosystèmes forestiers. L'unité s'organise autour de cinq thèmes scientifiques: 1) Réponse aux stress et régulation redox dans les arbres; 2) Mécanismes moléculaires des interactions arbres-champignons-bactéries du sol; 3) Écologie et rôle des communautés microbiennes et forestières; 4) Écologie des maladies forestières dans le contexte de changement global; 5) Mécanismes et

évolution des interactions Rouille-Peuplier (Bernardi, 2012; Didier, 2015).

Mon stage s'est déroulé au sein de l'équipe écogénomique des interactions, sous la responsabilité du directeur de recherche Sébastien DUPLESSI. La thématique de recherche 2 à laquelle j'étais rattachée est dirigée par monsieur Francis MARTIN, également directeur du Labex ARBRE. J'ai ainsi contribué à l'étude des facteurs de régulation transcriptionnelle impliqués dans la synthèse des effecteurs symbiotiques chez le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor*.

1.2 Synthèse bibliographique

Les plantes des écosystèmes naturels et agricoles sont des sources de nourriture, médicaments, d'énergie renouvelable et influencent le climat par leur rôle clé dans la séquestration du carbone. La durabilité, la productivité et la santé des végétaux est dépendante des associations symbiotiques à bénéfices réciproques qu'ils établissent avec des micro-organismes. Par exemple les légumineuses s'associent au niveau de la rhizosphère avec des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique du genre *Rhizobium* induisant la formation de nodosités et certaines algues s'associent avec des champignons pour former des lichens (T. Kazmierczak, 2012). D'autre part les symbioses mycorhiziennes (associations entre micro-organismes fongiques et racines de plantes) concernent 95% des végétaux (Marc Buee, Courty, Le Tacon, & Garbaye, 2006). Elles jouent un rôle majeur dans le bon fonctionnement et la viabilité des écosystèmes en permettant à la plante d'exploiter efficacement les ressources minérales du sol qui sont souvent limitantes et en lui fournissant une protection contre les stress biotiques et abiotiques. Les études génomiques et moléculaires des mycorhizes visent à comprendre et maîtriser le développement et le fonctionnement de ces dernières. Les objectifs sont d'améliorer la gestion des écosystèmes forestiers (préserver la biodiversité, augmenter la productivité du bois et des champignons comestibles) (Le Tacon, 1997; Tisserant, 2011) et prévoir à long terme les réponses des communautés mycorhiziennes des écosystèmes terrestres dans un contexte de changement global: climatique, environnemental, anthropique et socio-économique (Mohan et al., 2014; Pickels, Egger, Massicotte, & Green, 2012).

1.2.1 Les symbioses mycorhiziennes

Les mycètes communément appelés « champignons » sont des organismes eucaryotes uni- ou pluricellulaires hétérotrophes vis à vis du carbone. Ils occupent pratiquement tous les types d'écosystèmes terrestres et toutes les niches écologiques, leur abondance et leur diversité sont particulièrement grandes dans les écosystèmes forestiers. La mycorhize (de grec « mukês » pour champignon et « rhiza » pour racine) est définie comme étant une association symbiotique entre les

racines d'une plante et un mycète (Egli & Brunner, 2002). Il résulte du contact entre la plante et le champignon mycorhizien, la formation de racines latérales qui vont être colonisées par ce dernier. Au niveau des mycorhizes à lieu un échange d'éléments nutritifs au cours duquel la plante-hôte approvisionne le champignon en composés carbonés élaborés lors de la photosynthèse (10 à 40% des photosynthétats de la plante) et en échange le mycélium (ensemble d'hyphes, structure végétative du champignon) transfère les éléments minéraux à la plante. Les organismes fongiques mycorhiziens augmentent la surface d'absorption des éléments nutritifs du sol, par rapport à celle occupée par les poils absorbants des racines de plantes non mycorhizées, par la prolifération des hyphes mycéliens. Ils augmentent le pool d'azote et de phosphore assimilable par la plante-hôte en donnant accès aux formes d' N et de P organique à cette dernière, ils fournissent jusqu'à 70% des besoins en ces éléments à la plante et contribuent à l'absorption de l'eau. Par ailleurs ils protègent la plante-hôte contre les pathogènes du sol, les substances toxiques, les polluants et secrètent des phytohormones favorisant la croissance des plantes. (Le Tacon & Selosse, 1997; Mousain, Matomoto-Pintro, & Quiquampoix, 1997)

Sept structures mycorhiziennes ont été décrites selon leurs caractéristiques anatomiques : les endomycorhizes, les ectendomycorhizes, les mycorhizes arbutoïdes, éricoïdes, orchidées, monotropoïde et les ectomycorhizes (Smith & Read, 2008). Cependant quelque soit de la structure symbiotique, le champignon ne franchit jamais la barrière endodermique végétale. Les champignons impliqués dans ces symbioses appartiennent aux divisions des Basidiomycota, Ascomycota et Glomeromycota. Une représentation schématique de ces différentes structures symbiotiques (Selosse & Le Tacon, 1998) ainsi qu'un tableau récapitulatif de leur différentes caractéristiques (Smith & Read, 2010) figurent respectivement en annexe 2 et en annexe 3. Les premières mycorhizes apparues sont des endomycorhizes dites à arbuscules (AM) ou à vésicules (VA), elles sont apparues entre -460 et -355 , elle sont contemporaines de l'apparition des végétaux terrestres et auraient joué un rôle crucial dans la colonisation du milieu terrestre par les plantes. Les endomycorhizes sont actuellement associées à plus de 80% des espèces de plantes terrestres et sont les plus répandues. Elles sont caractérisées par une pénétration du champignon dans les cellules de l'hôte végétal (Le Tacon & Selosse, 1997). Par ailleurs en 2013, la quasi-totalité du génome du gloméromycète *Rhizophagus irregularis* a été décryptée, il s'agit du champignon endomycorhizien le plus célèbre, car son ancêtre est supposé avoir permis aux plantes de coloniser le milieu terrestre (INRA, 2013a). La symbiose ectomycorhizienne est le deuxième groupe le plus répandu, elle sera abordée plus en détail dans la suite du texte car elle est caractéristique du champignon *Laccaria bicolor* , étudié durant mon stage.

1.2.2 Les ectomycorhizes

Les premiers champignons ectomycorhiziens (ECMs) seraient apparus il y a 150 à 220 millions d'années. Actuellement, leur présence est significative dans les écosystèmes forestiers des zones boréales, tempérées et méditerranéennes, où ils (principalement les Ascomycètes et les Basidiomycètes) élaborent des symbioses avec des arbres appartenant aux familles des Pinaceae, Abietaceae, Fagaceae, Tiliaceae, Betulaceae et Myrtaceae (Courty et al., 2010). Les deux premiers champignons ectomycorhiziens à avoir été séquencés sont: *L.bicolor* (2008) et *T. melanosporum* (2010). Selon une étude de génomique comparative, l'évolution phylogénétique des ECM est marquée par la perte massive d'enzymes de dégradation de la paroi végétale (PCWDEs: plant cell wall-degrading enzymes), initialement présentes chez les champignons saprotrophes ancestraux de la pourriture blanche et de la pourriture brune. Elle est également caractérisée par une sur-expression de gènes ECM spécifiques, codant des protéines de communication : les effecteurs symbiotiques. Ces derniers sont capables de moduler les défenses immunitaires de la plante, condition indispensable à la colonisation de la racine (Kohler et al., 2015; Kuo, Martin, Kohler, & Grigoriev, 2014; Young, 2015).

Trois stades de développement peuvent être distingués lors de l'établissement de la symbiose: la phase de pré-contact, la phase de colonisation et la phase de mycorhize fonctionnelle. Durant la phase de pré-contact le champignon et la plante communiquent sans contact physique via des molécules diffusibles tel que des homologues d'hormones végétales (auxine, l'éthylène, acide jasmonique) sécrétés par de nombreux champignons ECMs et d'autres molécules signales présentes dans les exsudats racinaires, qui vont altérer l'homéostasie hormonale de la plante et induire l'émergence de nombreuses racines latérales (fig.2b). La phase de colonisation est caractérisée par l'adhésion des hyphes aux cellules racinaires et par la formation d'un manteau fongique qui va entourer la racine courte de la plante hôte puis par une structure appelée « réseau de Hartig ». Le réseau de Hartig, correspond à un réseau extracellulaire, plus ou moins développé, formé par les hyphes du mycélium entre les cellules du cortex racinaire. La phase de mycorhize fonctionnelle (ou biotrophie) se caractérise par un échange de nutriments entre la plante et le champignon, au sein de ce réseau, régulé par des transporteurs fongiques et végétaux (fig.2a). La durée de la phase du transfert des composés carbonés vers le champignon est espèce-dépendante et elle est suivie d'une phase de sénescence de l'ECM. D'autre part, il a récemment été mis en évidence, une nouvelle voie de contrôle de l'interaction symbiotique impliquant de petites protéines sécrétées et induites au moment de la mycorhization (MiSSP), également appelés effecteurs symbiotiques (fig.2c) auxquels nous nous intéresserons dans la partie 1.2.4 de ce texte. (Daguerre, 2013a; Dexheimer, 1997; Francis Martin & Plett, 2011).

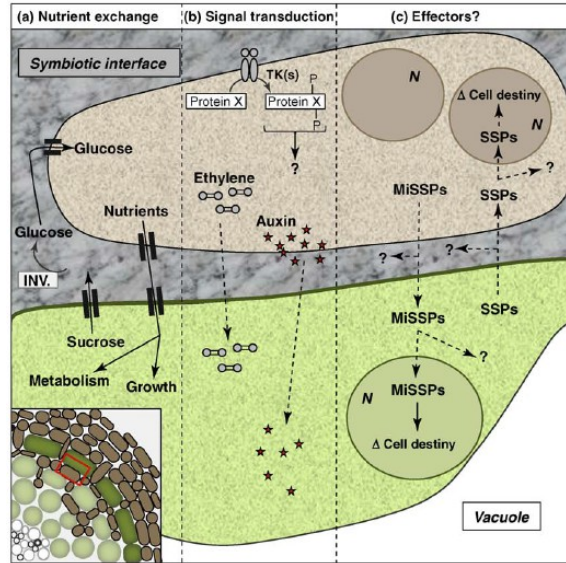


Figure 2 : Les trois niveaux de contrôle de l'interaction symbiotique entre les champignons ECM et les cellules végétales (Francis Martin & Plett, 2011).

1.2.3 *Laccaria bicolor* et le peuplier : un model d'étude

Le peuplier appartient à l'ordre des Salicales et à la famille des Slicaceae. Les espèces *Populus deltoides*, *Populus nigra*, *Populus trichocarpa* et *Populus alba* et leurs hybrides sont les plus cultivées dans le monde. En 2006, le peuplier fut le premier arbre dont le génome a été séquencé (485+/- 10Mb) (Tuskan, 2006). *Laccaria bicolor* (R.Maire) P.D. Orton est un champignon ectomycorhizien appartenant à la division des Basidiomycètes, à l'ordre des Agaricales et à la famille des Hydngangiaceae. Son cycle de développement (annexe 4) comprend 2 phases: la phase haploïde, qui comprend la germination des spores et la formation des monocaryons (hyphes haploïdes) et la phase dicaryotique pendant laquelle deux noyaux différents coexistent dans la même cellule après plasmogamie. Se sont les dicaryons qui forment les ectomycorhizes avec les racines des plantes-hôtes (Labbé, 2009). Le génome de *Laccaria bicolor* (64 Mb) à été séquencé par le JGI et publié en 2008 (Francis Martin & Selosse, 2008). Il s'agit du premier génome de champignon symbiotique à avoir été séquencé. Ce dernier est très utilisé en mycorhization contrôlée pour son effet positif sur la croissance de la plupart des espèces d'intérêt sylvicole et il se prête à la culture sur milieu synthétique en laboratoire. Ces deux organismes constituent donc des modèles d'étude grâce à la connaissance de leur génome, par leur importance économique, leur intérêt environnemental et leur capacité à former des mycorhizes (Pereda Campos, 2008) .

1.2.4 Les effecteurs symbiotiques chez *Laccaria bicolor*.

1.2.4.1 Définition

Afin de lutter contre les attaques des pathogènes, les plantes possèdent un système immunitaire relativement efficace qui peut-être décomposé en deux niveaux d'action : la résistance basale ou PTI (pattern triggered immunity) et la résistance spécifique ou ETI (effector triggered immunity). La résistance basale implique la reconnaissance, par des récepteurs extracellulaires de la plante, de molécules très conservées présentes à la surface des pathogènes (PAMPs¹ ou MAMPs²) appelés également éliciteurs généraux tel que la chitine ou l'ergostérol des champignons ou la flagelline des bactéries. La résistance spécifique, implique quant à elle la reconnaissance et la réponse à des facteurs de virulences, appelés effecteurs, par des récepteurs intracellulaires de la plante. Une réaction d'hypersensibilité (HR) se met alors en place, elle correspond à l'induction par la plante de la mort cellulaire des zones infectées par le pathogène (Pritchard & Birch, 2014).

Chez les micro-organismes pathogènes, les effecteurs sont définis comme étant de petites molécules protéiques, d'une taille inférieure à 300 aa, sécrétées par ces derniers et transloquées à l'intérieur de la cellule végétale, afin d'altérer le métabolisme et/ou l'immunité de la plante. Les effecteurs de pathogènes sont en effet capables d'altérer les voies de signalisation des cellules des plantes, modifier l'architecture racinaire, protéger le champignon contre les enzymes hydrolytiques des plantes (chitinase, protéases, glucanases), reprogrammer les systèmes de défense de la plante afin de coloniser cette dernière et détourner le métabolisme de la plante à leur profit (Martin & Kamoun, 2011). On distingue deux classes d'effecteurs, apoplastiques ou cytoplasmiques en fonction de leur localisation dans les cellules végétales. Ils présentent également une grande variabilité dans leur structure chimique afin d'éviter leur reconnaissance par le système immunitaire de la plante.

D'autre part, il a été mis en évidence que les micro-organismes symbiotiques secrètent également des effecteurs capables de modifier l'équilibre hormonale de la plante afin de supprimer les réactions de défense de cette dernière, de façon similaire aux effecteurs d'agents pathogènes (Francis Martin & SELOSSE, 2008). Il a été identifié chez le champignon arbusculaire *Glomus intradices*, un effecteur nommé SP7 qui pénètre dans les cellules de la plante afin d'interagir avec le facteur de transcription ERF19 au niveau nucléaire, afin de moduler les réactions de défense de la plante impliquant ce TF et ainsi permettre le maintien de son mode de vie biotrophe (Kloppholz, Kuhn, & Requena, n.d.). D'autre part le faible nombre d'effecteurs identifiés dans le génome de *Tuber melanosporum* et le génome riche en effecteurs de *Laccaria bicolor* suggèrent l'existence de

1 PAMPs :Pathogen- associated molecular patterns

2MAMPs : Microbe-associated molecular patterns

deux stratégies de mise en place de la symbiose (Veneault-Fourrey & Martin, 2011). Chez *L.bicolor*, 300 petites protéines sécrétées (SSPs) putatives ont été identifiées dans le sécrétome de ce dernier et une douzaine de ces SSPs seraient sur-exprimées durant la mycorhization. La fonction de la plupart de ces MiSSPs (mycorrhiza-induced small secreted protein) reste cependant encore inconnue (Francis Martin & Selosse, 2008; Vincent, Kohler, Claverol, Solier, & Martin, 2012). En effet la notion d'effecteurs chez les micro-organismes symbiotiques est plus récente et est actuellement moins bien définie que chez les pathogènes. Dans la suite du texte nous allons nous intéresser particulièrement à trois SSPs fortement induites durant la symbiose: MiSSP7, MiSSP8,5 et MiSSP17.

1.2.4.2 Un effecteur symbiotique indispensable à la mycorhization pour *L.bicolor* : MiSSP7 (fig.3a)

Le premier effecteur protéique symbiotique, fut récemment identifié chez le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor*, il est nommé MiSSP7 (mycorrhiza-induced small secreted protein 7), il s'agit d'une petite protéine de 68 aa. Le gène codant cette protéine est sur-exprimé durant la symbiose chez le champignon ECM *Laccaria bicolor*. La présence des transcrits ainsi que de la protéine a été détectée à toutes les étapes de la colonisation des racines. De plus, la protéine MiSSP7 est induite de manière précoce, avant tout contact entre le champignon et la racine, par les exsudats racinaires. Cependant cette protéine n'est pas exprimée dans le mycelium libre (FLM: free living mycelium) (Plett et al., 2011). MiSSP7 pénètre ensuite dans la cellule végétale via un mécanisme d'endocytose et a pour cible le noyau des cellules de la plante où il altère le profil transcriptomique de cette dernière. La pénétration de MiSSP7 dans les cellules racinaires a lieu via sa liaison au phosphatidylinositol 3-phosphate de la membrane phospholipidique de la cellule végétale et nécessite un domaine RALG intact. Ce domaine est similaire à la séquence consensus RXRL présente en aval du peptide signal des effecteurs d'oomycètes, tel que *Plasmopara viticola* ou *Phytophthora*, et qui est nécessaire pour leur internalisation dans la cellule (figure 3b)(Petre & Kamoun, 2014). La protéine MiSSP7 est indispensable à l'établissement et au maintien de l'interaction mutualiste: elle aide à la pénétration des hyphes fongiques dans l'apoplaste des cellules de la racine et à l'établissement du réseau de Hartig. En effet, MiSSP7 affecte la maintenance et la structure de la paroi cellulaire ainsi que celle de l'architecture racinaire en agissant sur les voies de signalisation hormonale de la plante (Plett & Martin, 2012).

1.2.5 Les exsudats racinaires et leur rôle dans la symbiose

Le développement de la symbiose ectomycorhizienne nécessite dans un premier temps la reconnaissance des deux partenaires et serait dépendante d'une stimulation émanant de l'apex racinaire, induite par les exsudats racinaires. Ces derniers sont définis comme étant des composés chimiques sécrétés par les racines dans le sol. Ces exsudats racinaires sont des sucres, des acides aminés, des composés carbonés, des protéines, des composés lipophiles, des flavonoïdes ainsi que d'autres bio-molécules relarguées à des concentrations variables par les plantes. Ces molécules agissent tel des signaux de bio-communication essentiels à l'initiation des interactions physiques et biologiques entre les organismes du sols et les racines mais n'ont cependant pas encore été toutes identifiées (Monther & Kamaruzaman, 2012).

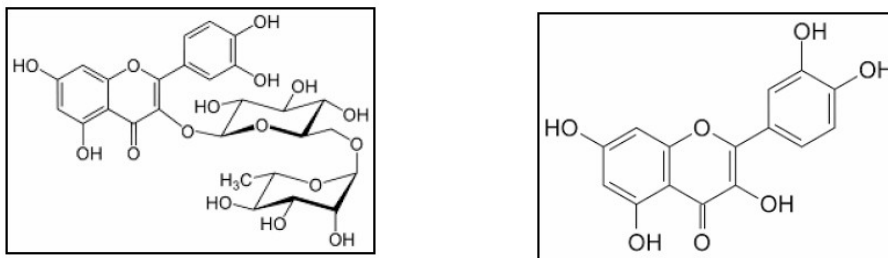


Figure 4: Structure chimique de deux flavonols : a) Structure chimique de la rutine ; b) Structure chimique de la quercetine (Vikas, 2011).

Parmi ces exsudats racinaires, les famille des flavonoïdes comprenant les chalcones, les flavones, les isoflavones, les flavonols, les flavanones et les isoflavonoïds. Se sont des composés polyphenoliques produits via la voie de biosynthèse des phenylpropanoïdes (annexe 5). Ils sont retrouvés en solution dans le sol à des concentrations très faibles, inférieures à $1\mu\text{M}$ et sont associés à de multiples fonctions (Cesco et al., 2012). Ces métabolites secondaires, jouent entre autre, un rôle dans la protection des plantes contre les pathogènes (phytoalexines et phytoanticipines), ils représentent une source potentielle de carbone et peuvent être présent dans les exsudats racinaires à un niveau de concentration toxique pour certain micro-organismes de la rhizosphère. Les flavonoïdes vont donc influencer la composition des communautés microbiennes, qui vont à leur tours influencer, via leur capacités catabolique, la quantité et la qualité des flavonoïdes de la rhizosphère (Shaw, Morris, & Hooker, 2006). De plus ils sont impliqués dans la communication plante-plante (interactions allélopathique) et plante-micro-organisme au sein de la rhizosphère. Ils peuvent par exemple agir comme un signal d'initiation de la symbiose entre les plantes et certains champignons ou certaines bactéries tel que *Agrobacterium* ou encore *Rhizobium* (Poulin, Bel-Rhliid, Piché, & Chenevert, 1993). En effet, les flavonoïdes de la classe des chalcones et la luteoline

induisent la transcription des gènes de virulence (vir) chez *Agrobacterium* et des gènes de nodulation (nod) permettant la mise en place des interactions Rhizobium/légume. Les flavonoïdes jouent également un rôle de chimio-attractant pour les bactéries lors des interactions symbiotiques Rhizobium-légume. D'autre part il a été démontré que la rutine, un flavonoïde de la classe des flavonol et dont la structure est présentée sur la figure 4a, induit la croissance des hyphes des champignons phytopathogène *Alternata*, *Botrytis cinerea* et *Fusarium solani*. De même la quercétine (fig.4b), induit la croissance de certaines souches de champignons endomycorhiziens du genre *Giagaspora* ou *Glomus*, ainsi que la germination des spores et l'augmentation des ramifications des hyphes des souches *Glomus etunicatum*, *G..macrocarpum* ou *G.mossae*. Cependant la formononetine, un isoflavone libéré par les racines de *Medicago sativa* en cas de stress, inhibe la germination des symbiontes *Glomus etunicatum* et *Glomus macrocarpum*. Cela suggère une régulation du développement des symbioses endomycorhiziennes par les flavonoïdes (annexe 6) (Balaji, Poulin, Vierheilig, & Piché, 1995; Poulin et al., 1993; Tsai & Phillips, 1991).

Bien que le dialogue moléculaire permettant la reconnaissance, l'établissement et la régulation de la symbiose ectomycorhizienne entre les deux partenaires reste peu documenté, les flavonoïdes semblent jouer un rôle dans la reconnaissance des hôtes végétaux impliqués dans les symbioses ECM. En effet la rutine, isolée parmi les exsudats racinaires d' *Eucalyptus globulus* et la quercétine, isolée chez les feuilles de ce dernier, stimuleraient la croissance des hyphes de certaines souches du champignon ectomycorhizien *Pisolithus* et pourraient orienter les ramifications des hyphes vers les racines afin de favoriser la mycorhization (Lagrange, Jay-Allgmand, & Lapeyrie, 2000; Francis Martin et al., 2001). D'autre part chez *Laccaria bicolor*, les exsudats racinaires de la plante hôte *Populus* et de la plante non-hôte *Arabidopsis thaliana* induisent l'expression de la protéine MISSP7 (Plett et al., 2011). Cela suggère l'intervention dans la rhizosphère de signaux spécifiques et non-spécifiques responsables de l' induction des effecteurs. L'induction de MiSSP7, en absence de plantes-hôtes, ainsi que l'induction de la croissance de diverses espèces de champignons par la rutine et la quercétine suggère que ces flavonoïdes agissent tels des signaux non-spécifiques dans la rhizosphère³.(Plett & Martin, 2012).

1.2.6 Les facteurs de régulation de la transcription chez *Laccaria bicolor*

Les programmes génétiques permettant la mise en place de la symbiose, sont régulés par l'activité de facteurs de transcription (TF) (Francis Martin & Selosse, 2008). Un facteur de transcription est

³rhizosphère, provenant du grec « rhiza » signifiant racine et « sphere/sphaera » signifiant cercle d'influence. La rhizosphère représente donc le champ d'influence du système racinaire, elle comprend l'ensemble des racines ainsi que la zone de sol proche influencée par ces racines [soit via des exsudats racinaires, soit via des micro-organismes interagissant avec les dernières

une protéine qui régule l'expression des gènes, soit en activant, soit en inhibant la transcription en se fixant directement sur l'ADN au niveau des régions promotrices (ou promoteurs). Les TFs jouent donc un rôle majeur dans la reprogrammation transcriptomique et certains d'entre eux régulent potentiellement l'expression des effecteurs symbiotiques. Mais l'identification des FTs chez les champignons ECM est encore peu documentée et pourrait cependant être un élément clé dans la compréhension de l'établissement des symbioses mycorhiziennes. Par exemple chez *T.melanosporum*, une analyse globale des FTs a montré une sur-expression de certains d'entre eux lors du passage d'un stade de développement à un autre. Chez *L.bicolor*, 301 gènes putatifs codant des facteurs de transcription ont été identifiés. Parmi ces derniers, les FTs exprimés différemment durant les stades de développement de l'ECM avec le peuplier et le pin Douglas ont également été mis en évidence en 2013 par analyse transcriptomique mais les fonctions qui leur sont attribuées restent prédictives (Daguerre et al., 2013). Le laboratoire IAM et l'équipe d'écogénomique étudie actuellement par qPCR, l'expression de cinq FTs candidats (JGI, protéine ID : 453749; 607061; 484334; 331730; 467042) après zéro, deux, trois ou quatre semaines d'interaction entre le peuplier et *L.bicolor*. L'hypothèse posée est que ces FTs candidats pourraient être sur-exprimés en présence du peuplier et pourraient potentiellement être impliqués dans les mécanismes moléculaires conduisant à l'interaction symbiotique, comme par exemple la sur-expression des MiSSPs.

Problématique: Durant ce stage, mon objectif fut de mettre en évidence les effets de deux exsudats racinaires, la rutine et la quercétine sur la biomasse, la croissance et l'expression d'effecteurs symbiotiques et de facteurs de transcription chez le champignon ectomycorhizien L.bicolor.

2. Matériel et méthodes

2.1 Matériel biologique

2.1.1 Matériel fongique et conditions de culture (fig.5)

Les expériences ont été menées avec la souche dicaryotique *Laccaria bicolor* S238N. Il s'agit d'une sous-culture de la souche S238O. Cette dernière fut isolée à partir d'une fructification collectée sous un conifère, *Tsuga mertensiana*, en 1976, dans le Parc national de Crater Lake (Oregon, USA) par J.Trappe et R.Molina puis importée à l'INRA en 1980 et renommée S238N. La souche *L.bicolor* S238N a depuis été introduite comme inoculum dans les pépinières et les plantations françaises car la mycorhization afin d'augmenter la production de bois (Daguerre, 2013b; Doillon, 2010).

Une pré-culture de *L.bicolore* est maintenue sur un milieu P5 (Pachlewski agar medium), riche en sucres, sur des boîtes de pétri pendant 10 jour à 23°C et dans l'obscurité. La composition du

milieu P5 est la suivante: 2,72 mM 2NH₄-tartrate; 2,02 mM MgSO₄7H₂O; 7,35 mM KH₂PO₄; 13,88 mM maltose D+; 111 mM glucose, 0,296 mM thiamine; solution commerciale Kanieltra: 14,25 μM Fe-EDT, 2,814 μM Mo, 121,39 μM B₂O₃, 91,07 μM Mn, 9,84 μM Cu et 34,71 μM Zn; 2% agar; pH ajusté à 5,5 (annexe 7).

De jeunes fragments mycéliens, prélevés en périphérie des mycéliums de la pré-culture de 7 jours, ont été inoculés sur un milieu P20 (2,72mM 2NH₄-tartrate; 4,06 mM MgSO₄ 7H₂O; 7,35 mM KH₂ PO₄; 5,55 mM glucose; 0,296 mM thiamine; solution commerciale Kanieltra: 14,25 μM Fe-EDT, 2,814 μM Mo, 121,39 μM B₂O₃, 91,07 μM Mn, 9,84 μM Cu et 34,71 μM Zn; 2% agar; pH ajusté à 5,5 (annexe 8), pauvre en sucres, recouvert de cellophane stérile. Les membranes de cellophane ont été préalablement bouillies pendant 20 minutes dans une solution d'eau ultra pure et 1g/L EDTA puis rincées 4 fois avec de l'eau ultra pure. Les boîtes de pétri ont ensuite été placées horizontalement, à 23°C, dans l'obscurité, pendant 7 jours. Les mycéliums (7 colonies fongiques par boîtes, 10 boîtes) cultivés 7 jours sur milieu solide P20 (comme décrit ci-dessus) ont été mixés avec 1L de milieu P20 liquide en conditions stériles, puis incubés sous agitation à 23°C durant 7 jours, dans des erlenmeyers de 250 mL, à raison de 100 ml par erlenmeyer. Le milieu de culture liquide P20 a été renouvelé au bout de 4 jours.

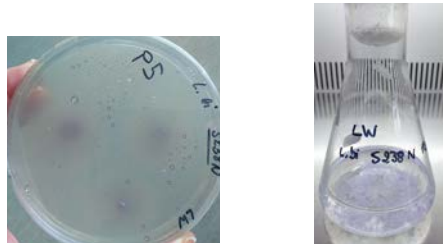


Figure 5: Culture *L.bicolor* S238N de 7 jours sur milieu gélosé P5 et en milieu liquide P20 .

2.1.2 Matériel végétal et conditions de culture

Le peuplier hybride interspécifique (*Populus tremula***Populus alba*), clone femelle n° 717-1B4, a été utilisé lors des expériences. Des plantules ont été cultivées dans des tubes à essai sur du milieu Murashige et Skoog (MS) pendant 6 semaines en chambre de culture à 25°C. La composition du milieu MS est la suivante: macro-éléments (1,03 mM NH₄NO₃; 1,50 mM CaCl₂; 75,06 μM MgSO₄; 939,65 μM KNO₃; 62,46 μM KH₂PO₄); micro-éléments (10,03μM acide borique; 11 nM COCl₂6H₂O; 10 nM CuSO₄SH₂O; 81,14 μM Na₂.EDTA; 9,99 μM FeSO₄7H₂O; 9,99 μM MnSO₄H₂O; 1,39 μM ,Mo₃2H₂O; 0,50 μM KI; 2,99 μM ZnSO₄7H₂O); 5,55 mM glucose; 4,60 mM MES; vitamines (1,37 mM L-glutamine; 2,10 μM Ca-panthotenate; 4,16 μM L-cystéine chlorhydrate; 40,93 nM biotine); vitamines Gamborg (151,51 μM myo-inositol; 8,13 μM acide nicotinique; 5,91 μM piridoxine; 29,67 μM thiamine); 1% d'agar; pH ajusté à 5,8 (annexe 9).

En conditions stériles, des entre nœuds de peupliers d'environ 1 à 2 cm ont été coupés puis repiqués avec un angle de 45° sur milieu MS avec de l'indole butyric acid (IBA) 8,28 mM et cultivés pendant 7 jours en chambre de culture régulée à 25°C et 16h d'exposition journalière à la lumière. Puis les explants ont été transférés sur milieu MS sans IBA (25 entre-nœuds par boîtes de pétri) et placés durant 3 semaines en chambre de culture régulée à 25°C et 16h d'exposition journalière à la lumière (Felten, Legué, & Martin, 2007). L' IBA est une hormone de croissance végétale de synthèse, elle est ici utilisée car elle permet une accélération et une croissance homogène des racines des explants.

2.2 Exposition du matériel fongique, aux flavonoïdes

2.2.1 Exposition du matériel fongique à la rutine et à la quercétine en milieu liquide

Des solutions stock de rutine (Sigma R-5143) et quercétine (Aldrich-chemie D-7924) de 0,2M ont été réalisées avec du DMSO (diméthylsulfoxyde). Les solutions stocks ont été stérilisées par filtration (filtre de 0,22µm). La gamme de concentration suivante: 0M ; 1 pM ; 0,01 nM ; 0.1nM; 1nM; 0,1µM; 1µM; 10µM et 100µM à été réalisée pour la rutine et la quercétine, de manière indépendante, par dilution des solutions stock avec du milieu liquide P20.

Un gramme de mycélium, ayant été cultivé en milieu liquide P20 pendant 7 jours, à été mis en contact avec 30 ml de milieu P20 supplémenté en rutine ou quercétine, en conditions stériles, pendant 24h, sous agitation et à 23°C. Après 24 h d'exposition aux flavonoïdes, 5 répétitions biologiques de 0,100g de mycélium ont été échantillonnées pour chaque concentration des gammes de flavonoïdes testés. Les échantillons de 0,100g ont été placés dans de l'azote liquide, puis conservés à -80°C jusqu'à l'extraction des ARN totaux. De plus, pour chaque condition d'exposition aux flavonoïdes, quelques fragments mycéliens ont été fixés dans du para-formaldéhyde 4% pendant 24H, puis placés dans un tampon phosphate salin (Phosphate Buffered Saline, PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄) et conservés à +4°C pour l'observation en microscopie.

D 'autre part des triplicas mycéliens de 0,5g, (mycéliums cultivés pendant 7 jours en milieu liquide P20) ont été mis en contact avec 30 ml de milieu P20 supplémenté en rutine ou quercétine en conditions stériles, puis placés sous agitation à 23°C. Après 24h d'exposition la biomasse des triplicas mycéliens est à nouveau pesée.

2.2.2 Exposition du matériel fongique à la rutine et à la quercétine sur milieu gélosé

Des solutions stock de rutine (Sigma R-5143) et quercétine (Aldrich-chemie D-7924) de 0,2 nM ont été réalisées avec du DMSO (diméthylsulfoxyde), puis stérilisées par filtration (filtre de 0,22µm). Afin d'obtenir des solutions de rutine et de quercétine de 10nM, les solutions stock ont été

diluées avec de l'eau ultra-pure stérile. Des pré-cultures de sept jours, sur milieu gélosé P20 recouvert de cellophane, contenant un unique inoculum mycélien sont mises en contact de 150µL des solutions de rutine 10nM ou quercétine 10nM ou d'eau (contrôle) préalablement étalées sur milieu gélosé P20. Après 24h, 48h ou 72h d'exposition, la biomasse des 5 répliquas par condition est pesée et la croissance radiale des mycélium est mesurée à l'aide du logiciel « Imagej ». Par ailleurs, des fragments issus d'une pré-culture de *L.bicolore* de 7 jours sur un milieu P5, ont été inoculés sur milieu gélosé P20 préalablement étalé avec 150µL des solutions de rutine ou quercétine 10nM ou d'eau (contrôle) et recouvert de cellophane. Après 7j, 10j et 14j la croissance radiale des mycéliums est mesurée et la biomasse des 10 réplicats par condition est pesée le 14ème jour.

2.2.3 Exposition du matériel fongique aux exsudats racinaires

Premièrement 1g de mycélium, ayant préalablement été cultivé en milieu liquide P20 pendant 7 jours, a été pesé, supplémenté avec 30 ml de milieu P20 et mis en présence des racines de 5 plantules de peuplier (ou non dans le cas de la condition contrôle) pendant 24h sous agitation et à 23°C. Les plantules ont préalablement été cultivées pendant une semaine sur milieu MS+IBA, puis trois semaines sur milieu MS. De plus 5 répétitions biologiques de 0,100g de mycélium ont été échantillonnées. Les échantillons de 0,100g ont été placés dans de l'azote liquide, puis conservés à -80°C jusqu'à l'extraction des ARN totaux. Pour chaque condition quelques fragments mycéliens ont été fixés dans du para-formaldéhyde 4% pendant 24H, puis placés dans un tampon phosphate salin (Phosphate Buffered Saline, PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄) et conservés à +4°C pour l'observation en microscopie.

De la même manière des triplicats mycéliens de 0,5g, ont été supplémentés avec 30 ml de milieu P20 et mis en présence des racines de 5 plantules de peuplier (ou non dans le cas de la condition contrôle) pendant 24h sous agitation et à 23°C. Après 24h d'exposition la biomasse des triplicats mycéliens est à nouveau évaluée.

2.3 Microscopie : caractérisation morphologique

Les échantillons de mycélium *L.bicolor* sous forme d'agrégats tridimensionnels, denses et sphériques (préparés comme décrit dans les paragraphes 2,2,1 et 2,2,2) ont été observés en microscopie optique avec le microscope ZEISS Axio Observer. L'observation a été faite entre lame et lamelle, en grossissement x10 et x40 sur plusieurs plans focaux, grâce au logiciel d'imagerie ZEN. Pour chaque échantillon, 30 hyphes choisis de manière aléatoires en périphérie des pelotes du champignon filamenteux ont été observés afin de mesurer leur longueur et d'évaluer le nombre de ramifications présentes sur ces derniers grâce au logiciel ImageJ.

2.4 Extraction d'ARN et synthèse d'ADNc

L'extraction de l'ARN total des échantillons de *L.bicolor* S238N a été fait avec le kit RNAeasy Mini Kit (Qiagen) suivant le protocole indiqué par le fabricant. Une méthode de lyse cellulaire mécanique par broyage avec mortier et azote liquide a été choisie. Puis un tampon de lyse « RLC-β-mercaptoéthanol » a été utilisé afin de dénaturer les protéines. Une étape optionnelle de dégradation de l'ADN a été incluse, cette étape a nécessité l'utilisation d'un « mix d'incubation Dnase I ». Un volume de 30 µL d'eau sans RNase a été utilisée pour chacune des deux étapes d'éluion de l'ARN. Le protocole d'extraction d'ARN est schématisé en annexe 10.

Trois contrôles qualité de l'ARN isolé, ont été effectués: détermination de la quantité d'ARN, détermination de la pureté de l'ARN et détermination de l'intégrité de l'ARN. La concentration et la pureté de l'éluât obtenu contenant l'ARN fongique, est évalué grâce à un spectrophotomètre de précision (NanoDrop 1000), permettant de réaliser des spectres d'absorbance en utilisant de petits volumes d'échantillons sans cuvettes ni capillaires. Un volume de 2 µL d'échantillon à analyser est suffisant pour mesurer la densité optique de ce dernier. La concentration minimale d'ARN souhaité pour chaque échantillon est d'environ 100 ng/µL. La longueur d'onde d'absorbance des acides nucléiques est de 260 nm et $DO_{260}=1$ correspond à 40ng d'ARN par µL. Le ratio $DO_{260}/280$ permet d'évaluer si il y a une contamination d'origine protéique dans l'échantillon et le ratio $DO_{260}/230$ permet d'évaluer la contamination de l'échantillon par les réactifs et les composés organiques tel que le phénol, utilisés lors de l'extraction d'ARN. Ces deux ratios doivent être égaux ou supérieurs à 1,8 pour que l'échantillon soit considéré comme pur (Ayoubi, 2007). L'intégrité de l'ARN des échantillons a été vérifiée avec le système automatisé d'électrophorèse « Expérior » selon le protocole indiqué par le fabricant Bio-rad. Les échantillons d'ARN sont stocké à -80°C jusqu'à la synthèse d'ADNc. La synthèse d'ADNc à partir de 955 ng d'ARN a été fait avec le kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (life biotechnologies) suivant le protocole indiqué par le fabricant et figurant en annexe 11 . Les 66 échantillons d'ADNc obtenu sont stockés à -20°C.

2.5 Amplification d'ADN en temps réel : RT-qPCR

Les expérimentations de PCR quantitative ont été effectuées grâce à l'appareil STEP One Plus (Applied Biotechnologie). Le volume total de réaction est de 10µL et contient 2µL d'échantillon d'ADNc dilués au 1/5ème ou d'eau (témoin négatif). Le mélange qPCR 1x comprend : du Fast SYBR green Master mix 2x (SYBR® Green I Dye, AmpliTaq® Fast DNA Polymerase, UP (Ultra Pure) ; Uracil-DNA Glycosylase (UDG) ; ROX™ dye Passive Reference ; dNTPs ; Optimized buffer components), 300nM amorce sens, 300nM amorce anti-sens, H₂O . La réaction qPCR se déroule selon les conditions suivantes : dénaturation initiale 20s à 95°C ; 40 cycles :

dénaturation 3s à 95°C, hybridation et élongation 30s à 60°C (PCR à cycles rapides); suivit d'une analyse des courbes de fusion: 15s à 95°C, 60s à 60°C, 15s à 95°C, 15s à 60°C. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN va être mesurée grâce à un agent intercalant (SYBER green) dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits.

Les amorces utilisées ont été dessinées grâce au logiciel « Primer 3 » afin d'amplifier des fragments de plus ou moins 150pb. L'efficacité des amorces a été déterminée grâce à des « standards », qui sont des dilutions d'ADNc mix avec de l'eau Dnase/Rnase free (1; 1/2;1/4;1/6;1/8;1/16;1/32;1/64) et une droite représentant les valeurs de Ct en fonction du logarithme des dilutions. L'efficacité notée E de la RT- qPCR est déterminée par la formule $E = 10^{-1/\text{pente}}$. Le mix ADNc a été obtenu en mélangeant les ADNc de tous les échantillons. Une efficacité acceptable est comprise entre 90 et 110 %. La spécificité des amorces est déterminée par l'analyse des courbes de fusions.

Cinq gènes de références (aussi appelés contrôles endogènes ou gènes de ménage) ont été sélectionnés pour leur stabilité d'expression dans les étapes précoces de la mycorhization, en se basant sur des analyses RNAseq et micro-array. De plus trois gènes de référence supplémentaires ont été sélectionnés (Plett, Gibon, Kohler, et al., 2012b) en raison de leur stabilité d'expression durant la mycorhization. Les numéros d'identification de ces protéines selon le JGI sont : 651262 ; 313997 ; 609242 ; 294334 ;319764 et 245383 ;293350 ;318873 (annexe 12). Parmi ces huit gènes de références, la détermination du nombre de gènes de références optimal qu'il est nécessaire d'utiliser pour le calcul des facteurs de normalisation est déterminé grâce à la variation par paire de gènes entre le FN_n et le FN_{n+1} . Le nombre de gènes optimal correspond à : $Vn/n+1 < 0,15$ avec n= nombre de gènes de référence à utiliser dans le calcul du FN. Mais lorsqu'une grande variation est détectée entre le FN_n et le FN_{n+1} , l'ajout d'un gène au nombre de gènes choisi (n) est nécessaire pour le calcul d'un FN optimal. D'autre part le choix des gènes les plus stables est effectué à l'aide de la valeur M qui est la moyenne de stabilité de l'expression de chaque gène. La valeur M est établie à partir de la moyenne des variations par paire d'un gène particulier avec les autres gènes de référence testés. Les gènes sont considérés comme stables si $M < 1$ et plus la valeur M est petite plus le gène est stable. Les calculs des facteurs de normalisation ($NF = \text{moyenne géométrique des } 2^{-(Ct - Ct_{\min})}$ des gènes de références pour un échantillon donné), des valeurs M et $Vn/n+1$ ont été réalisés grâce au logiciel qBase+ doté de l'application geNorm (Vandesompele et al., 2002).

Les gènes d'intérêts dont l'expression relative par rapport au contrôle (appelé également calibrateur) a été étudiée sont: MissP7, MissP8,5 et MissP17. La valeur Ct (Cycle threshold) correspond aux nombre de cycles à partir duquel le produit PCR est détectable, il s'agit de la valeur

4FN : facteur de normalisation, moyenne géométrique des valeurs $2^{-(Ct - Ct_{\min})}$

à laquelle la courbe PCR croise le seuil durant la phase exponentielle de la qPCR et $\Delta Ct = Ct$ échantillon – Ct minimum. Une normalisation des résultats est effectuée avec le facteur de normalisation $[2^{-(\Delta Ct)}/NF]$; la moyenne des Ct normalisés des triplicats pour la condition contrôle est ensuite calculée; l'expression relative des gènes d'intérêts par rapport à la condition contrôle est effectuée $[2^{-(\Delta Ct)}/NF/moyenne[2^{-(\Delta Ct)}/NF]contrôle]$; enfin la moyennes des valeurs de Ct des triplicats pour chaque condition est effectuée. La valeur attribuée au contrôle est alors de 1 et les autres échantillons ont une valeur par rapport à ce dernier. Si dans une condition donnée, la moyenne des Ct normalisés des triplicats, $[2^{-(\Delta Ct)}/NF/ [moyenne [2^{-(\Delta Ct)}/NF]contrôle]$, est significativement inférieure à 1 on peut conclure à une sous-expression du gène d'intérêt par rapport à la condition contrôle et à une sur-expression si elle est significativement supérieur à 1.

2.6 Analyse statistique

2.6.1 Analyse statistique des résultats de variation de la biomasse fongique

Les données ont été analysées grâce au logiciel Sigma Stat. La variable quantitative étudiée est la biomasse fongique. Pour chaque expérience un test de normalité puis d'homogénéité des variances ont été effectués afin de déterminer si un test statistique paramétrique pouvait-être utilisé pour l'analyse des données. Puis pour chaque expérience des modélisations T-Student (2 groupes de sujets indépendants), ANOVA I (analyse de la variance avec plus de deux groupes de sujets indépendants) à un facteur ou ANOVA II à deux facteurs ont été réalisés afin de vérifier la significativité des différences observées entre les moyennes des biomasses obtenues pour les différentes modalités de traitement.. L'analyse statistique ANOVA a été suivie du test « post hoc » Holm-Sidack afin d'effectuer des comparaisons multiples des moyennes des groupes traités par rapport au groupe contrôle et ainsi déterminer le groupe dont la moyenne est significativement différente de celle du groupe témoin. La différence entre les moyennes des différents groupes est significative lorsque la valeur P est inférieur à 0,05.

2.6.2 Analyse statistique des résultats obtenus en microscopie optique

Les données ont été analysées grâce au logiciel Sigma Plot. La variable quantitative étudiée est le nombre de ramification du mycelium. Pour chaque expérience un test de normalité puis d'homogénéité des variances ont été effectués afin de déterminer si un test statistique paramétrique pouvait-être utilisé pour l'analyse des données. Puis pour chaque expérience une modélisation, ANOVA I à été réalisée.

2.6.3 Analyse statistique des résultats d'expression des gènes MiSSP7, MiSSP8,5 et MiSSP17

Pour chaque gène et pour chaque condition (présence ou absence de plantule de peuplier ; traitements avec la rutine ou la quercétine) des modélisations T-Student, ou ANOVA I à un facteur ont été réalisés afin de vérifier la significativité des différences observées entre les moyennes des Ct normalisés des trois répétitions biologiques et la moyenne des Ct normalisés de la condition contrôle. Lorsque la distribution de la population étudiée ne suivait pas une lois normale avec une égalité des variances, le test non paramétrique de Kruskal Wallis à été utilisé au lieu de l'analyse ANOVAI, suivit du test de Dunn de comparaison multiple des différents groupes contre le contrôle.

3. Résultats

3.1 Étude de l'effet des exsudats racinaires, de la rutine et de la quercétine sur la biomasse et la morphologie du mycélium *Laccaria bicolor* cultivé en milieu liquide.

Afin de mettre en évidence les concentrations effectives de rutine et quercétine, l'influence d'une gamme de concentration pour chacun de ces composés sur la biomasse du champignon ectomycorhizien *L.bicolor*, à été étudié. Pour cela trois répliquas biologiques de 0,5g de mycélium ont été exposés à la rutine ou à la quercétine en milieu P20 liquide pendant 24 heures puis pesés à nouveau. Les graphiques sur la figure 6 présentent les valeurs moyennes des biomasses en fonction de la concentration de rutine (fig.6a) ou de quercétine (fig.6b) . Aucune différence significative n'a été observée entre les biomasses moyennes des mycéliums exposées à la rutine et la biomasse moyenne des témoins (fig6.a). D'autre part il a été mis en évidence une diminution significative de la biomasse moyenne des mycéliums exposés à une concentration de 100µM de quercétine par rapport à la biomasse moyenne des mycéliums témoins. Cependant aucune autre différence significative entre les biomasses moyennes des mycélium exposées à la quercétine par rapport au témoin n'a été mise en évidence (fig 6.b). Bien que la rutine et la quercétine ne semblent pas induire d'effet sur la biomasse du mycélium de *L.bicolor*, quelque soit la concentration à laquelle ce dernier à été exposé, excepté pour la concentration la plus élevée de rutine, une tendance à l'augmentation de la biomasse par rapport au témoin se dégage après une exposition de 24h à 10nM (10^{-8} M) de Rutine et après une exposition de 14 h à 1nM, 10nM et 100nM.

D'autre part, afin d'étudier l'influence des exsudats racinaires sur la biomasse de *L.bicolor*, des tripliquas de 0,5g de mycélium ont été exposés aux racines de 5 plantules de peuplier pendant 24h avant d'être pesés à nouveau. La biomasse moyenne des mycélium témoins ou exposés aux racines est représenté sur la figure 7 et il ne semble pas y avoir de différence significatives entre les deux valeurs moyennes de biomasse.

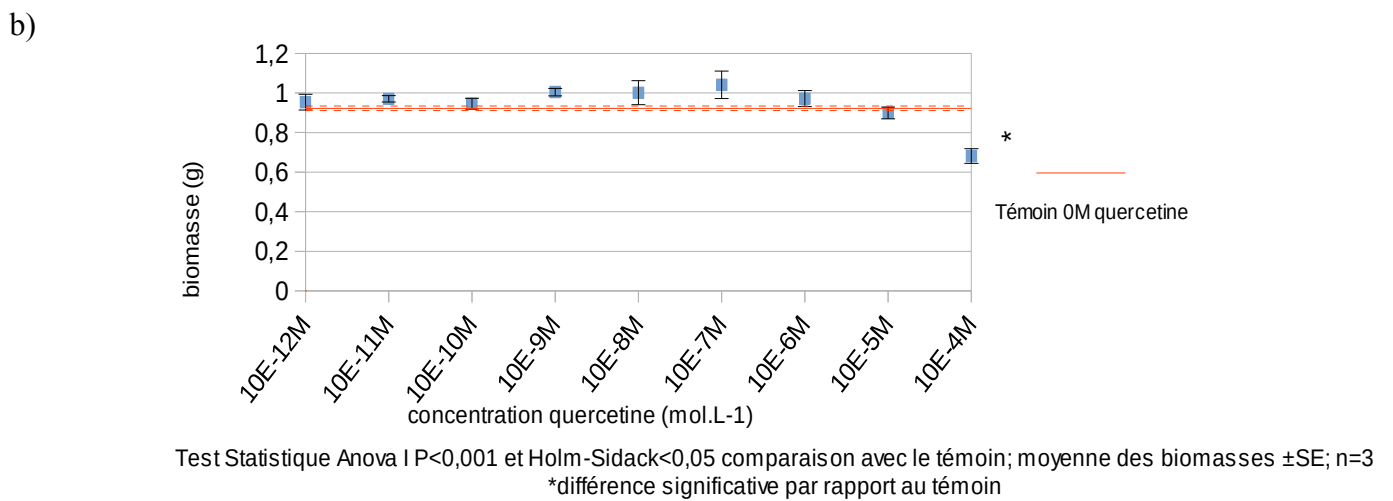
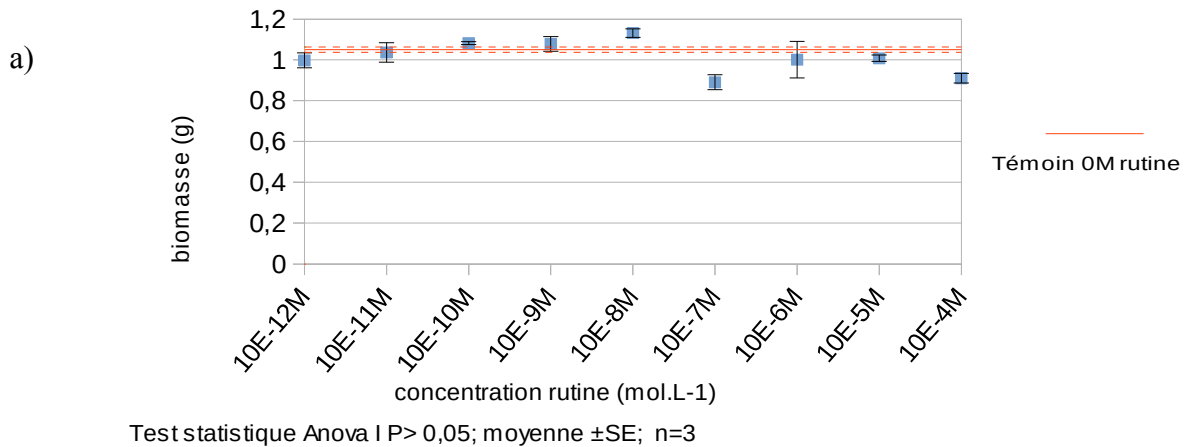


Figure 6) Représentation graphique de la biomasse des mycéliums du champignon *L.bicolor* après 24h d'exposition à une gamme de concentration de rutine a) ou quercétine b)

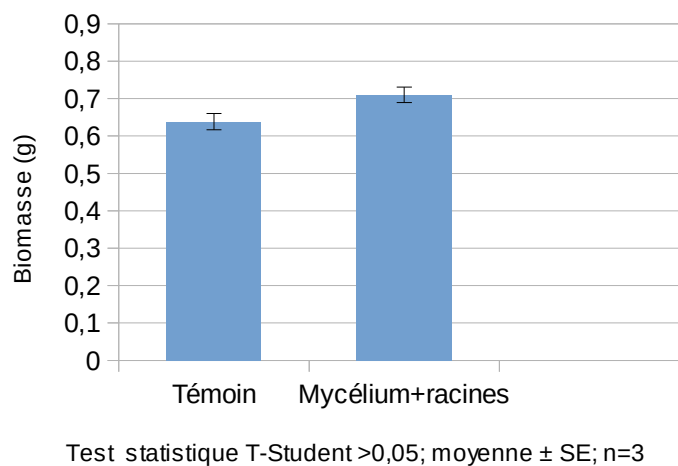
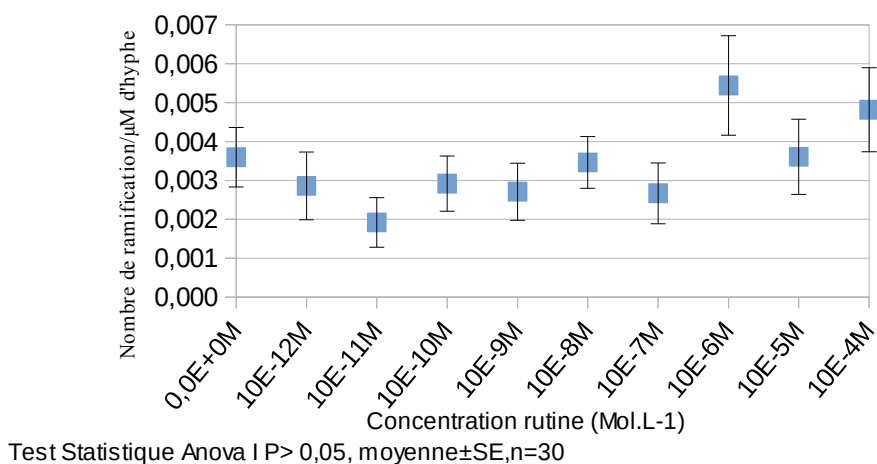


Figure 7) Représentation graphique de la biomasse moyenne des mycéliums du champignon *L.bicolor* après 24h d'exposition aux racines de peuplier

En parallèle, l'influence d'une exposition de 24 h à une gamme de concentration de solutions de rutine et de quercetine et aux des exsudats racinaires de peuplier sur la morphologie de *L.bicolor* à été étudiée. Après une observation microscopique, le nombre de ramifications moyen pour une longueur de 1µm d'hyphe a été calculé pour chaque échantillon. Ainsi les valeurs obtenues pour les 30 échantillons d'une même condition ont été moyennées et les résultats de cette étude sont présentés sur les figure 8 et 9. Aucunes différences significatives par rapport au témoin n'ont été observées entre les nombres moyens de ramifications pour 1µM d'hyphe, quelque soit la concentration de rutine , de quercetine ou en présence d'exsudats racinaire. Il semblerait donc que la rutine, la quercetine et les exsudats racinaires n'induisent pas un changement au niveau du nombre de ramification des hyphes de *L.bicolor* par rapport au témoin après une exposition de 24h.

a)



b)

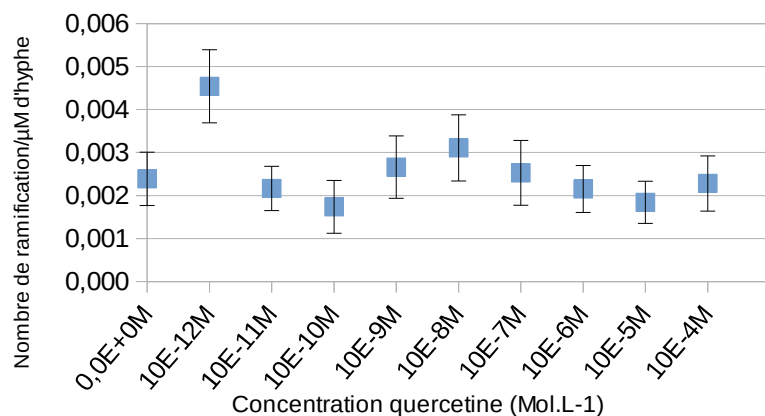


Figure 8) Représentation graphique du nombre moyen de ramification par µm d' hyphe de mycélium *L.bicolor* après 24h d'exposition à différentes concentrations de rutine a) ou de quercetine b).

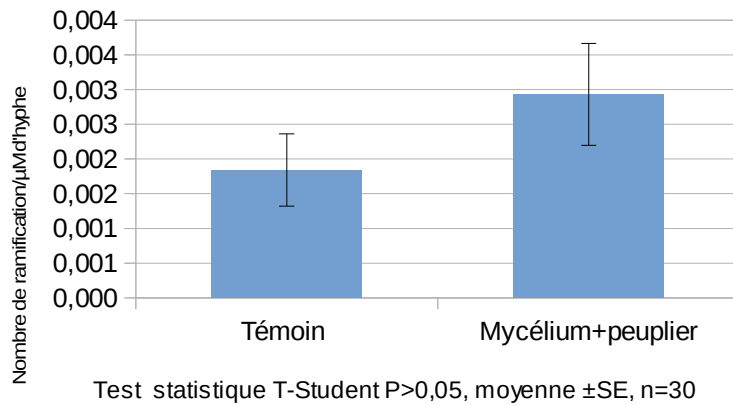
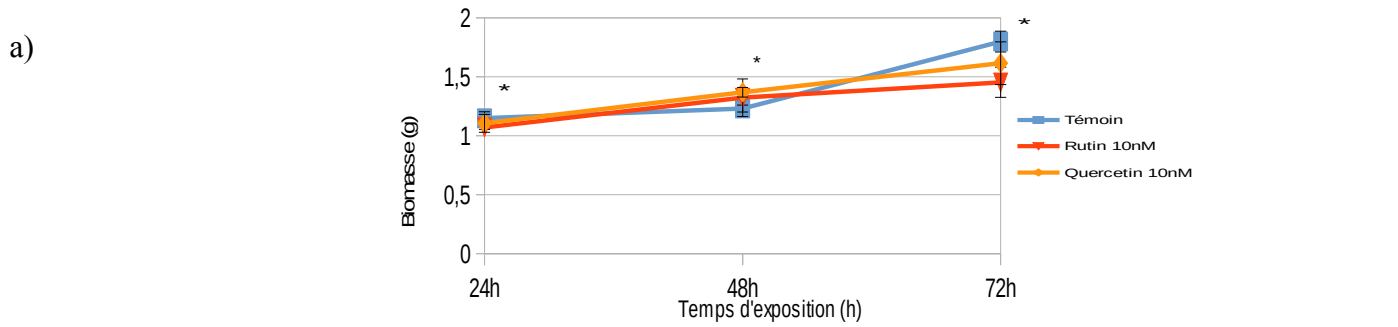


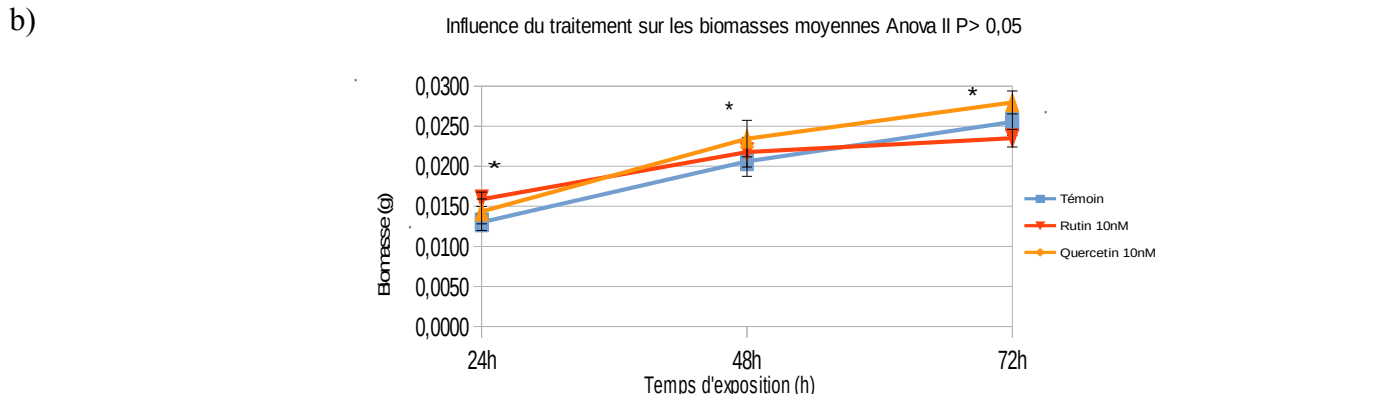
Figure 9) Représentation graphique du nombre moyen de ramification par μm d' hyphe de mycélium *L.bicolor* après 24h d'exposition aux exsudats racinaires.

3.2 Étude de la variation de la biomasse et de la croissance fongique au cours du temps lors d'une exposition à des solutions de 10nM de quercetine ou rutine.

La variation de la biomasse fongique au cours du temps à été étudiée suite à l' exposition de *L.bicolor* pendant 24h, 48h ou 72 h à des solutions de rutine ou quercetine 10nM en milieu P20 liquide ou sur milieu P20 gélosé (fig.10). Aucune des concentrations testées précédemment n'ayant eu d'effet sur la biomasse et la morphologie de *L.bicolor*; une concentration de 10 nM à été choisie, car la concentration de ces composés parmi les exsudats racinaires est de l'ordre du nM (Lagrange et al., 2000) . Une différence statistiquement significative de la biomasse à été mis en évidence en fonction du temps d'exposition pour un même traitement. Ainsi une augmentation de la biomasse des mycéliums au cours du temps à pu être observée indépendamment des traitements appliqués au mycélium. Cependant aucune différence significative entre la biomasse moyenne des mycéliums exposés aux métabolites secondaires de plantes et la biomasse moyenne des mycéliums témoins n'a été mise en évidence au cours du temps fig.10b. Il n'y a donc pas d'interaction entre la variable «temps d'exposition » et la variable « traitement » car l'effet du temps sur la biomasse ne dépend pas du traitement



* différences significatives entre les biomasses moyennes à 24 h, 48h et 72h par rapport au témoin, test statistique: Anova à deux variables $P < 0,001$, moyenne \pm SE; n=5

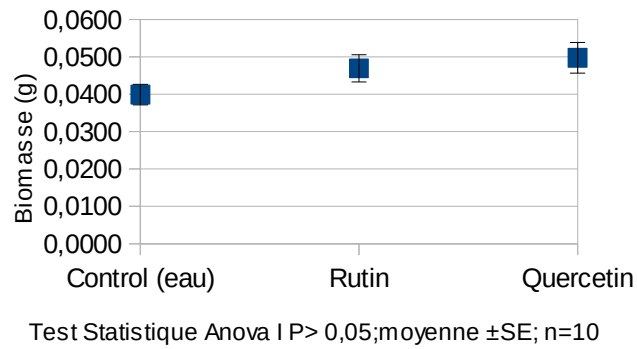


* différences significatives entre les biomasse moyennes à 24h, 48h et 72 h par rapport au témoin, test statistique: Anova à deux variables $P < 0,001$, moyenne SE; n=5

Influence du traitement sur les biomasses moyennes Anova II $P > 0,05$

Figure 10) Représentation graphique de l' évolution de la biomasse moyenne des mycéliums *L.bicolor* au cours du temps en milieu liquide P20 (a) ou sur milieu gélosé P20 (b) supplémentés avec des solutions de rutine ou quercetine 10nM.

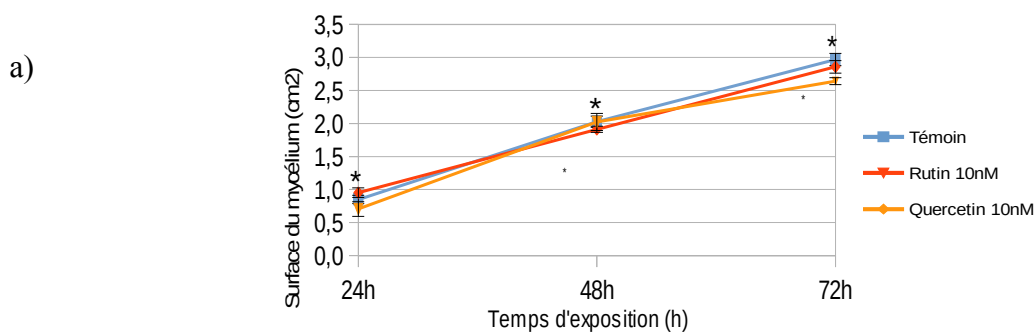
D'autre part après 14 jours de culture sur milieu gélosé P20 supplémenté en rutine ou quercetine 10 nM, la biomasse de 10 répliquas à été pesée (fig.11). On n'observe aucune différence significative entre les biomasses moyennes des mycéliums exposés aux exsudats racinaires et le contrôle. La rutine et la quercetine 10nM n'ont donc pas d'effet sur la biomasse du mycélium après un contact de 14 jours.



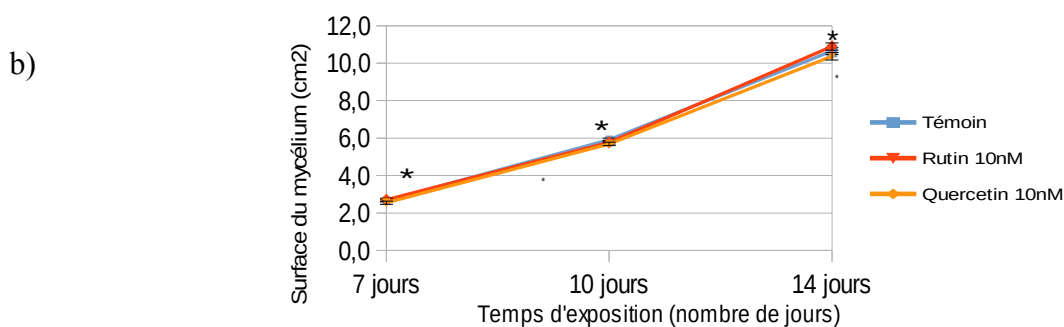
Test Statistique Anova I $P > 0,05$; moyenne \pm SE; n=10

Figure 11) Représentation graphique de la biomasse du mycélium après 14j de culture sur milieu gélosé P20 supplémenté en rutine, quercetine 10nM ou eau ultra-pure.

La croissance des mycéliums de *L.bicolor* a été étudiée sur milieu gélosé P20 après une exposition pendant 24h, 48h ou 72h (fig.12a) à des solutions de rutine ou quercétine 10nM ou à de l'eau ultra-pure (témoin). Cette expérience suggère qu'il n'y a pas de différences significatives entre les surfaces moyennes des mycéliums en fonction du traitement appliqué, par rapport à la condition contrôle, quelque soit la durée d'exposition. Suite à ces premiers résultats, l'effet de ces deux molécules sur la croissance des mycéliums a été suivie sur des périodes d'exposition plus longues de 7, 10 et 14 jours (fig.12b). Cependant, aucune différence statistiquement significative entre la surface moyenne des mycéliums exposés au flavonoïdes et la surface moyenne des mycéliums témoins n'a été mise en évidence quelque soit la durée d'exposition à ces derniers. Par ailleurs, pour ces deux expériences, une augmentation de la croissance du mycélium au cours du temps indépendamment des traitements appliqués a été constaté. Il n'y a donc pas d'interaction entre la variable « temps d'exposition » et la variable « traitement » car l'effet du temps sur la croissance ne dépend pas du traitement.



* différences significatives entre les surfaces moyennes à 24, 48 et 72 h (\pm SE), test statistique Anova II $P < 0,001$, $n = 5$
Influence du traitement sur la croissance, Anova II $P > 0,05$



* différences significatives entre les surfaces moyennes à 7, 10 et 14 jours \pm SE, test statistique Anova II $P < 0,001$, $n = 10$
Influence du traitement sur la croissance, Anova II $P > 0,05$

Figure 12) Représentation graphique de l'évolution de la croissance des mycéliums *L.bicolor* au cours du temps, sur milieu gélosé P20 supplémenté en rutine ou quercétine 10nM.

Pour conclure, il a été mis en évidence d'après nos expériences que la rutine et la quercétine n'induisent aucun effet sur la production de la biomasse, sur la croissance ou sur la ramification du mycélium à court terme (24h) ou après une exposition prolongée allant jusqu'à 14 jours.

3.3 Analyse de la régulation de l'expression de MiSSP7, MiSSP8,5, MiSSP17 par PCR quantitative chez *L.bicolor*

3.3.1 Sélection des gènes de référence

La normalisation des valeurs seuil de PCR quantitative (Ct) obtenues est un prérequis essentiel afin d'éliminer les variations expérimentales inhérentes aux différentes étapes de cette dernière (quantité et qualité de l'ARN, conversion en ADNc, erreur de pipetage...). La sélection des gènes de références les plus stables, c'est à dire qui ne subissent pas de changement d'expression en fonction des conditions analysées, ainsi que la détermination du nombre optimal de gènes à utiliser pour le calcul du facteur de normalisation (NF) ont été réalisées pour chaque conditions expérimentales.

Pour les échantillons d'ADNc de mycélium exposés à la gamme de concentration en rutine il est nécessaire d'utiliser les trois gènes de référence les plus stables suivant : 319764 , 245383 et 313997 qui correspondent respectivement aux cibles 5, 4 et 2 sur la figure 13. Ce sont en effet les gènes ayant obtenu la valeur M la plus faible avec le logiciel geNorm. D'autre part l'utilisation d'un quatrième gène de référence à été exclu. En effet bien que la valeur V la plus faible nous indique une utilisation de 4 gènes de références, la perte de stabilité du quatrième gène le plus stable (cible 3) par rapport au troisième (cible 2) à été considérée comme trop importante.

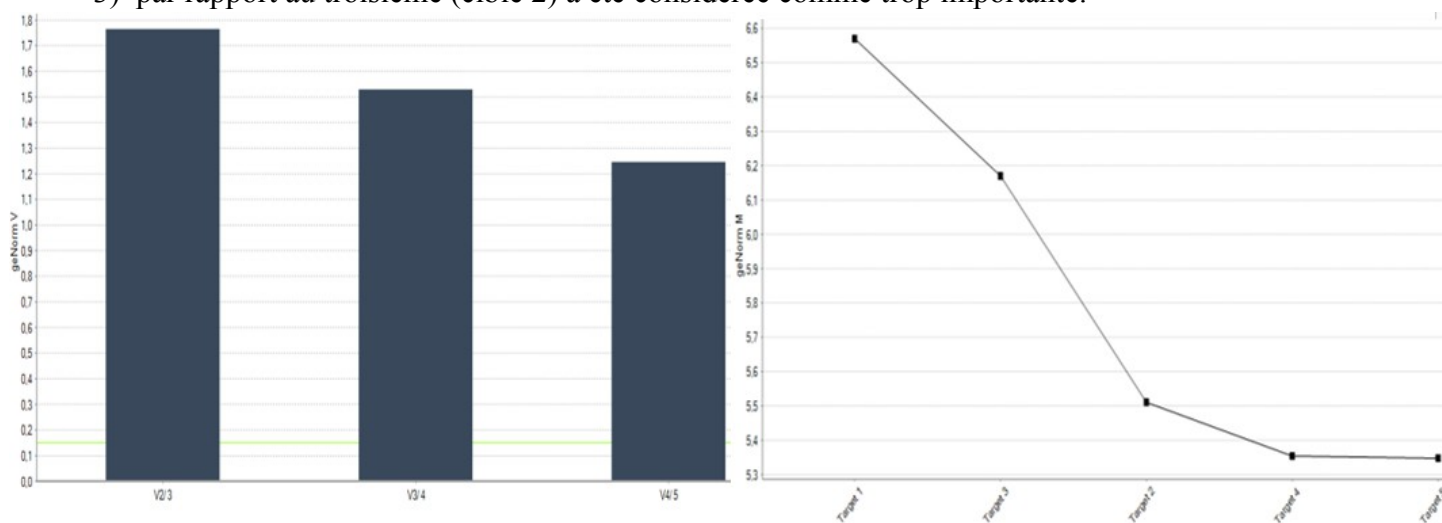


Fig13 : Représentation graphique de la variation par paire de gènes : valeur V (gauche) et de la moyenne des variation par paire de gène : valeur M (droite) pour les échantillons exposées à la gamme de concentration de rutine.

$V = V_n / V_{n+1}$ est la variation par paire de gène entre FN_n et FN_{n+1} , n = nombre de gènes de référence optimal à utiliser. Une faible variation indique que l'ajout d'un gène de référence supplémentaire n'est pas nécessaire au calcul du FN, une forte variation indique que l'ajout d'un gène au nombre de gènes choisi (n) est nécessaire pour le calcul d'un FN optimal. M correspond à la moyenne des variation par paire d'un gène avec les autres gènes de référence testés. Plus la valeur M est faible plus le gène est stable, plus elle est élevée moins le gène est stable.

Pour les échantillons d'ADNc de mycélium exposés à la gamme de concentration en quercétine il est nécessaire d'utiliser les sept gènes de référence les plus stables suivant :609242, 651262, 318873, 313997,293350, 319764, 294334 qui correspondent respectivement aux cibles 3,1,8,2,7,5 et 4 sur la figure 14. Le choix de 7 gènes de référence à était fait sur la base de la valeur V la plus faible car l'ensemble des valeurs V sont supérieur à 0,15 (or si la valeur V la plus faible avait été inférieur à 0,15, 6 gènes de références auraient suffit).

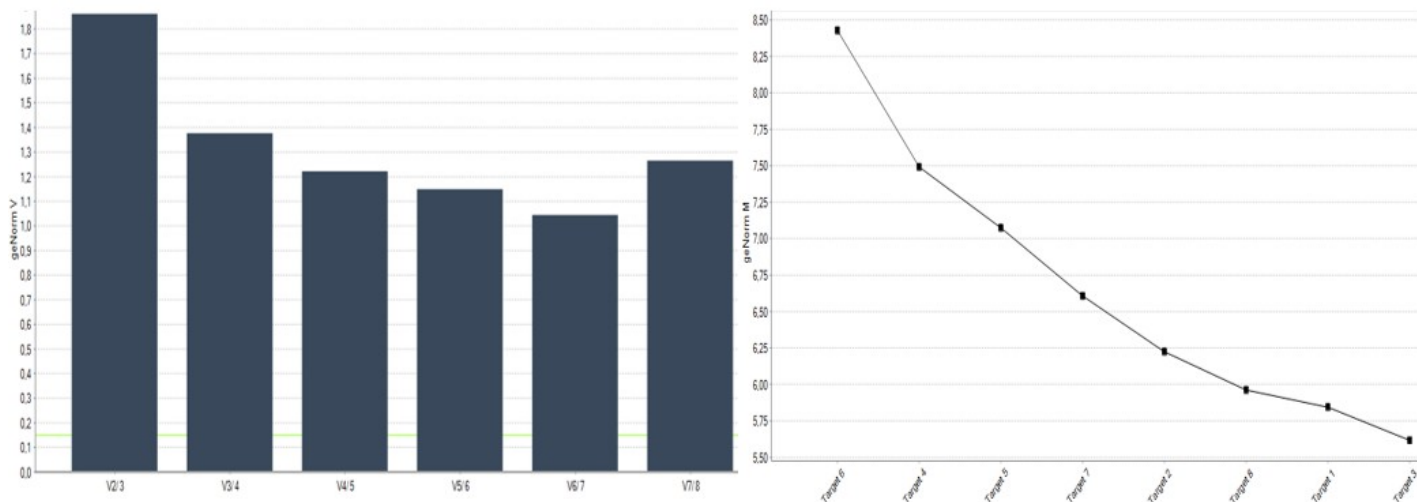


Fig 14: Représentation graphique de la variation par paire de gènes:valeur V (gauche) et de la moyenne des variation par paire de gène : valeur M (droite) pour les échantillons exposés à la gamme de concentration de quercétine.

$V = V_n / V_{n+1}$ est la variation par paire de gène entre FN_n et FN_{n+1} , n = nombre de gènes de référence optimal à utiliser. Une faible variation indique que l'ajout d'un gène de référence supplémentaire n'est pas nécessaire au calcul du FN, une forte variation indique que l'ajout d'un gène au nombre de gènes choisi (n) est nécessaire pour le calcul d'un FN optimal. M correspond à la moyenne des variation par paire d'un gène avec les autres gènes de référence testés. Plus la valeur M est faible plus le gène est stable, plus elle est élevée moins le gène est stable.

Pour les échantillons d'ADNc de mycélium exposés ou non aux racines de jeune plantules de peuplier il est nécessaire d'utiliser les quatre gènes de référence les plus stables suivant : 294334, 313997, 651262, 319764 qui correspondent respectivement aux cibles 4, 2 ,1 et 5 sur la figure 15. Le choix de 4 gènes de référence à était fait sur la base de la valeur V la plus faible avec l'ensemble des valeurs $V > 0,15$.

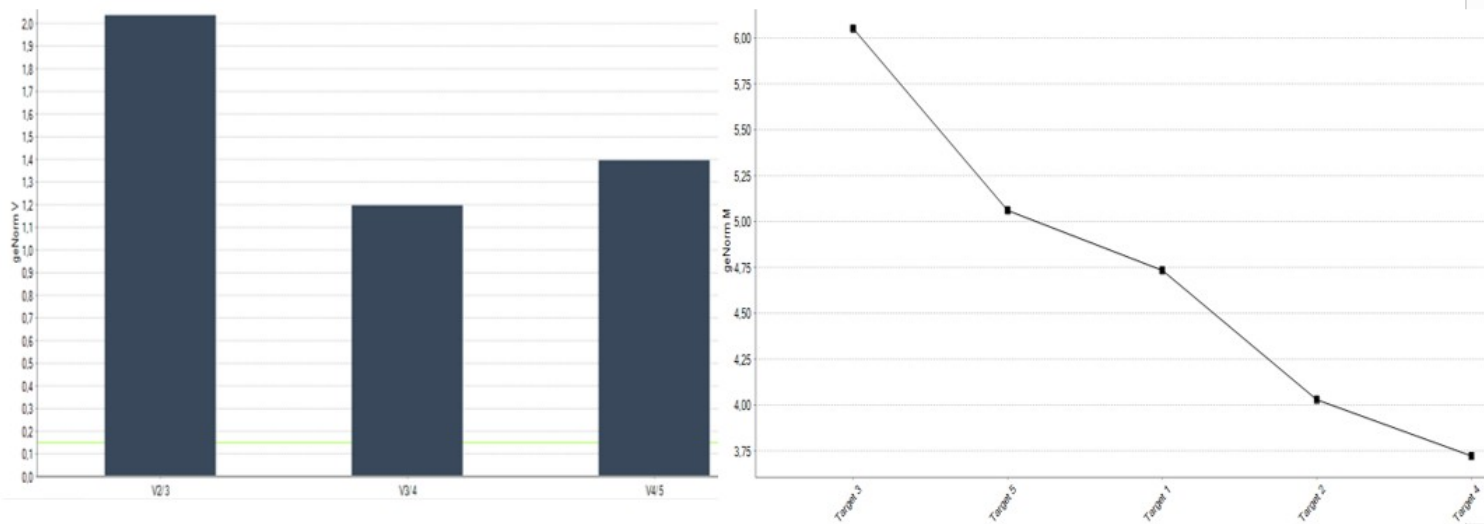


Fig 15: Représentation graphique de la variation par paire de gènes: valeur V (gauche) et de la moyenne des variation par paire de gène : valeur M (droite) pour les échantillons exposés ou non aux racines de peuplier.

$V = V_n / V_{n+1}$ est la variation par paire de gène entre FN_n et FN_{n+1} , n = nombre de gènes de référence optimal à utiliser. Une faible variation indique que l'ajout d'un gène de référence supplémentaire n'est pas nécessaire au calcul du FN, une forte variation indique que l'ajout d'un gène au nombre de gènes choisis (n) est nécessaire pour le calcul d'un FN optimal. M correspond à la moyenne des variation par paire d'un gène avec les autres gènes de référence testés. Plus la valeur M est faible plus le gène est stable, plus elle est élevée moins le gène est stable.

Il est à noter que pour chacune des conditions expérimentales $M > 1$, cela indique que les gènes testés ont une faible stabilité. Deuxièmement pour chaque condition expérimentale $V > 0,15$, ce qui indique qu'un nombre optimal de gènes de référence à utiliser n'a pas pu être déterminé en raison de la grande variabilité entre les facteurs de normalisation (NF). Cependant une recommandation du nombre de gène de ménage à utiliser pour accroître la précision de la normalisation comparée à l'utilisation d'un seul gène de référence a cependant été indiquée par le logiciel geNorm.

3.3.2 Spécificité et efficacité des amorces

La spécificité de chaque couple d'amorce a été déterminée par l'analyse des courbes de fusion qui correspondent à la variation de la fluorescence en fonction de la température. La température de fusion des amplicons appelée T_m , est représentée par un pic unique sur la dérivée primaire de la courbe de fusion. L'amplification spécifique des gènes de référence et des gènes d'intérêts par les couples d'amorces correspond à une courbe avec un pic unique. La présence d'un unique pic sur les courbes de fusion, des couples d'amorces ayant été testés, est confirmée et ces

dernières sont donc spécifiques. Les courbes de fusion des gènes de référence et des gènes d'intérêts sont représentées en annexe 14 et 15.

L'efficacité de la réaction qPCR a également été testée pour chaque couple d'amorce. Lorsque la pente de la courbe de régression linéaire représentant les Ct en fonction des valeurs logarithmique des dilutions d'ADNc est égale à -3,32, alors l'efficacité de la réaction qPCR est de 2 soit 100 %. Dans ce cas, à chaque cycle d'amplification on aura 2ⁿ copies de l'amplicon avec n le nombre de cycles. Pour tous les couples d'amorces testés dans ces études: l'efficacité de la réaction qPCR est d'environ 100 % (elle est comprise entre 90 et 100 %) (tableau 1); l'erreur standard est faible ; R² est le coefficient de détermination, il est proche de 1 et indique ainsi une bonne qualité de la régression, c'est à dire un bon ajustement du modèle aux données. Les droites de régression linéaire des efficacités des amorces sont présentées en annexe 16 et 17.

Tableau 1: Efficacité de la réaction qPCR avec les couples d'amorces des gènes de référence et des gènes d'intérêt.

Protéine	651262	313997	609242	294334	319764	245383	293350	318873	MiSSP7	MiSSP8,5	MiSSP17
Efficacité	1,977001	2,071217	2,056906	1,955379	2,054533	1,938350	1,961141	1,918619	2,022180	2,013842	1,974542
Pourcentage d'efficacité	97,70%	100,00%	100,00%	95,54%	100,00%	93,84%	96,11%	91,86%	100,00%	100,00%	97,00%
Erreur type (Standard error)	0,01648582	0,0063131	0,01260121	0,03834496	0,04162127	0,02338239	0,01742089	0,02338239	0,02636198	0,06251659	0,02270489

La spécificité et l'efficacité des amorces ont donc été validées et ces dernières ont pu être utilisées pour notre étude.

3.3.3 Étude de l'expression de MiSSP7, MiSSP8,5 et MiSSP17

Suite aux résultats obtenus dans la partie 3,2 du rapport qui montre que la rutine, la quercétine ou les exsudats racinaires ne semblent pas induire de changement au niveau macroscopique chez *L.bicolor* S238N, nous avons étudié l'influence de la rutine, de la quercétine et des exsudats racinaire après 24h au niveau moléculaire. Les expressions relatives des gènes MiSSP7, MiSSP8,5 et MiSSP17 par rapport aux contrôles ont été déterminées pour les trois conditions expérimentales suivantes: exposition du mycélium *L.bicolor* à la gamme de concentration de rutine ou de quercétine ou aux racines de peuplier.

On a constaté que les profils d'expressions de MiSSP7(fig.16), MiSSP8,5 (fig.18) et MiSSP17(fig.19) ne varient pas en fonction de la concentration de rutine ayant été mise au contact du mycelium pendant 24h. En effet, aucune différence significative n'a été constatée entre l'expression relative des MiSSPs étudiés dans les conditions contrôles (0M rutine) par rapport aux conditions traitées.

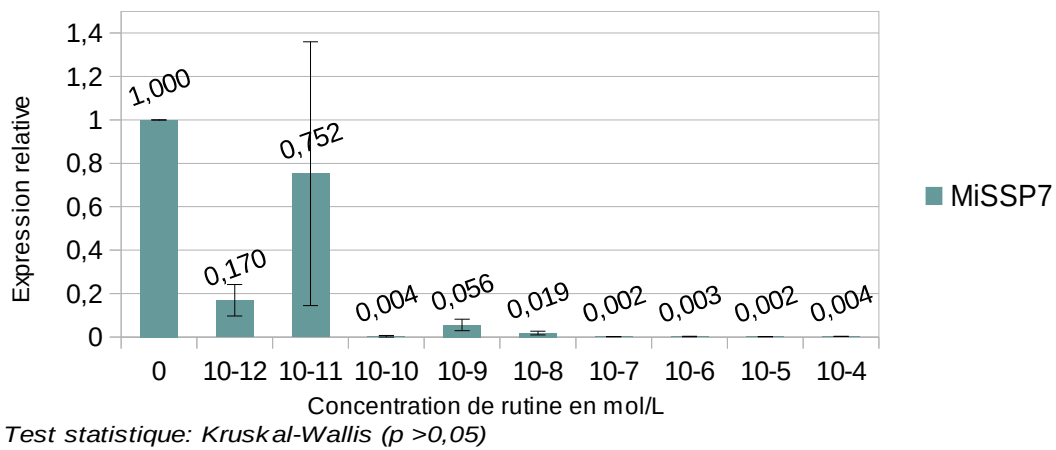


Figure 16 : Représentation de l'expression relative de MiSSP7 par rapport au contrôle (0M rutin) en fonction de la concentration d'exposition en rutin après 24h.

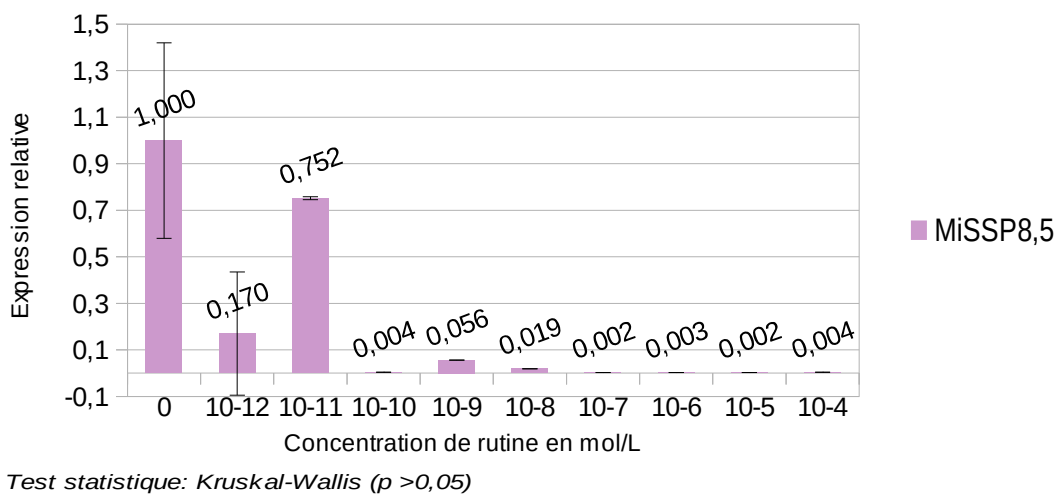


Figure 17 : Représentation de l'expression relative de MiSSP8,5 par rapport au contrôle (0M rutin) en fonction de la concentration d'exposition en rutin après 24h.

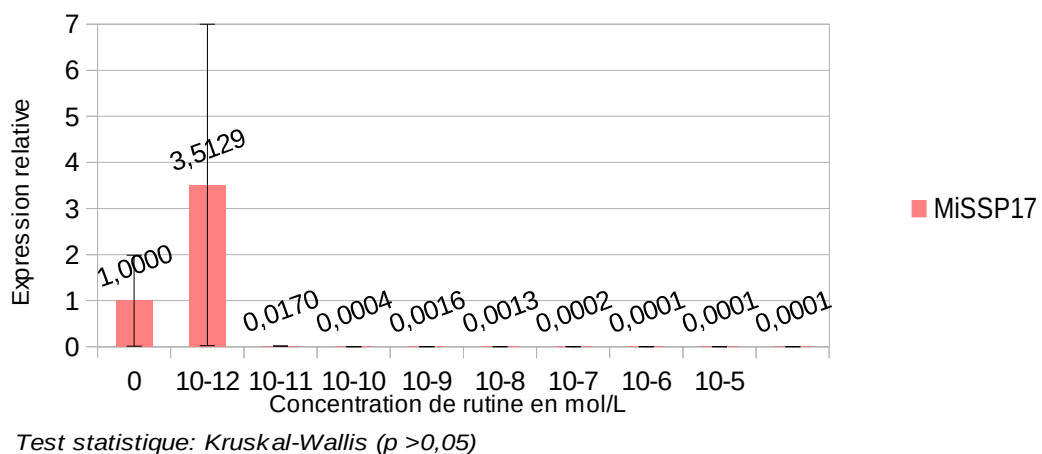
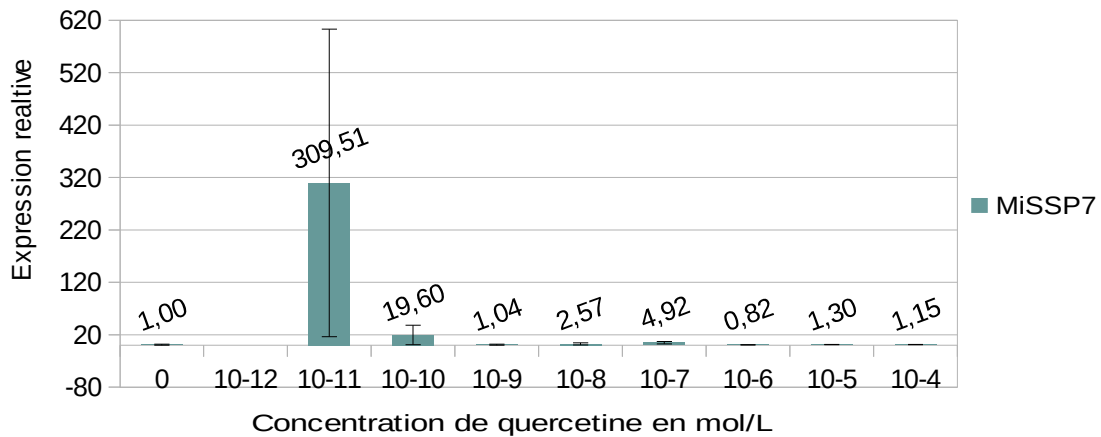


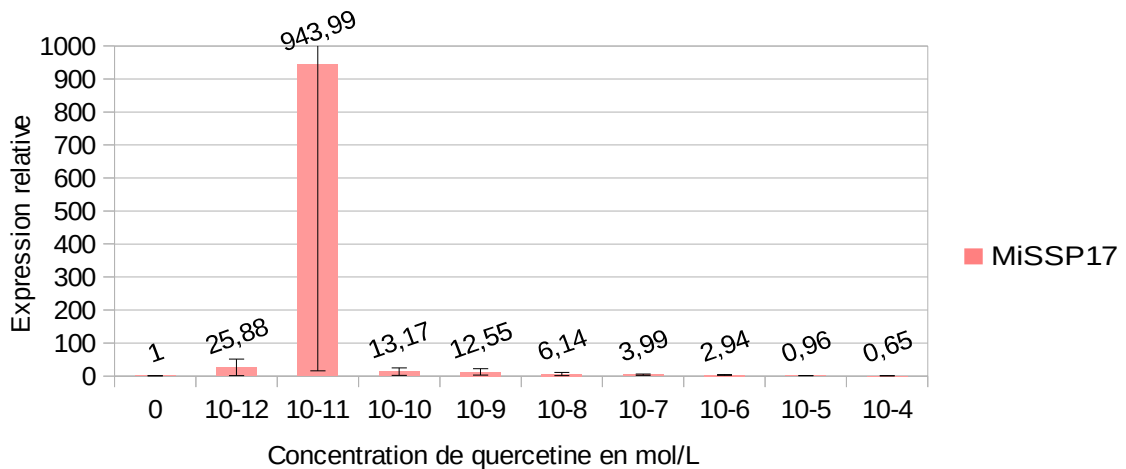
Figure 18 : Représentation de l'expression relative de MiSSP17 par rapport au contrôle (0M rutin) en fonction de la concentration d'exposition en rutin après 24h.

On a également constaté que les profils d'expressions de MiSSP7(fig.19) et MiSSP17(fig.20) ne varient pas en fonction de la concentration de quercetine ayant été mise au contact avec le mycelium pendant 24h. Aucune différences significatives n'ont été constatées entre l'expression relative des MiSSPs étudiés pour les groupes contrôles (0M quercetine) et l'expression relative des MiSSPs des autres groupes exposés aux différentes concentrations de quercetine.



Test statistique: Kruskal-Wallis ($p > 0,05$)

Figure 19 : Représentation de l'expression relative de MiSSP7 par rapport au contrôle (0M quercetine) en fonction de la concentration d'exposition en quercetine après 24h.



Test statistique: Kruskal-Wallis ($p > 0,05$)

Figure 20 : Représentation relative de l'expression de MiSSP17 par rapport au contrôle (0M quercetine) en fonction de la concentration d'exposition en quercetine après 24h.

D'autre part on a constaté une sur-expression de MiSSP7 (fig.21) après une exposition du mycélium aux exsudats racinaires pendant 24h par rapport à la condition contrôle. En effet MiSSP7 semble être 124 fois plus exprimé que dans la condition contrôle.

En revanche l'expression des MiSSP8,5 (fig.22) et MiSSP17(fig.23) n'est pas influencée par la présence des racines de peuplier et donc par les exsudats racinaires après une exposition du

mycélium pendant 24 h à ces derniers. En effet les taux d'expression de ces deux MiSSPs ne sont pas significativement différents par rapports aux groupes contrôles, dans la condition expérimentale décrite précédemment.

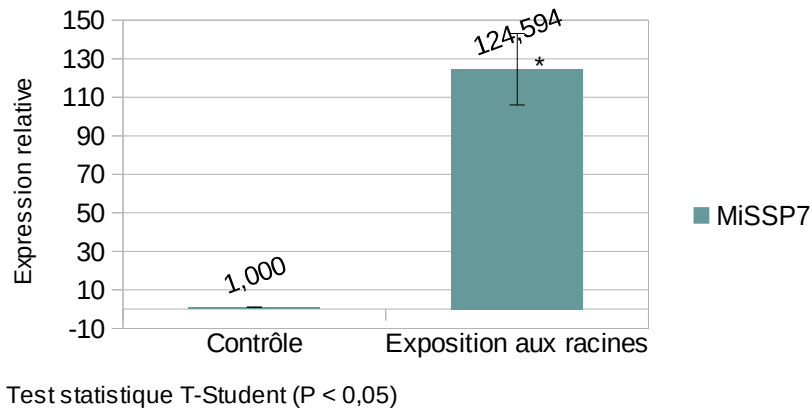


Figure 21: Représentation relative de l'expression de MiSSP7 après 24h d'exposition aux racines de peuplier par rapport au contrôle (absence de racines).

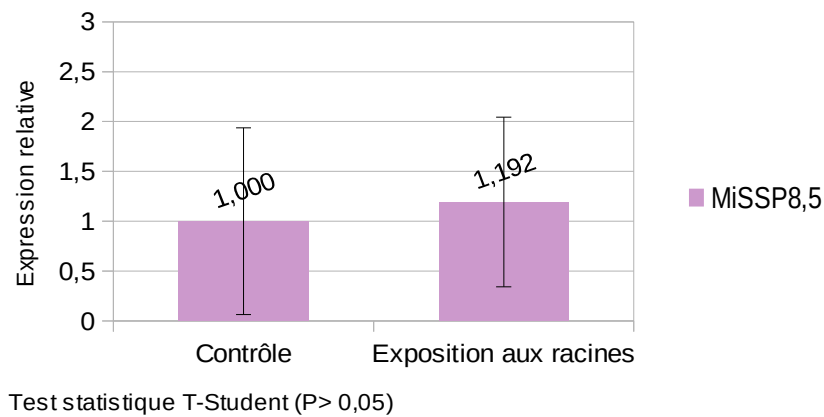


Figure 22: Représentation relative de l'expression de MiSSP8,5 après 24h d'exposition aux racines de peuplier par rapport au contrôle (absence de racines).

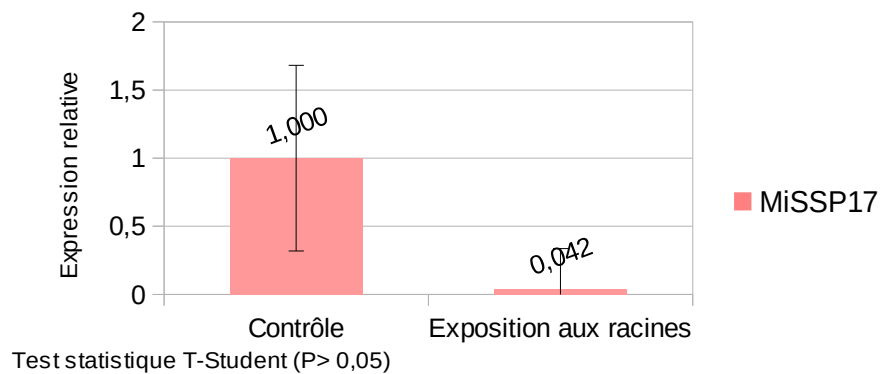


Figure 23: Représentation relative de l'expression de MiSSP17 après 24h d'exposition aux racines de peuplier par rapport au contrôle (absence de racines).

4. Discussion

4.1 Biomasse, croissance et morphologie de *L.bicolor*

Les composés phénoliques sont retrouvés en concentrations très faibles dans le sol, probablement inférieures à 1µM. Cependant les données concernant les concentrations de flavonoïdes présentes dans la rhizosphère et leur turn-over sont encore largement incomplètes (Cesco et al., 2012). Les facteurs influençant la nature et la quantité d'exsudats racinaires sont nombreux: le type de sol, les micro-organismes du sol, la plante-hôte, la disponibilité en nutriments et le pH du sol (Mohamad Tahat & Kamaruzaman, 2012).

Il a été montré ici que la rutine et la quercétine 10 nM n'entraînent pas l'augmentation de la croissance de *Laccaria bicolor* entre 24 et 14 jours. Or la rutine stimule la croissance radiale de *Pisolithus* sp., également un champignon ECM, à une concentration très faible, de l'ordre du picomolaire et jusqu'à 10 µM après 10 jours de d'exposition sur milieu gélosé; la quercétine stimule quant à elle la croissance radiale lorsqu'une concentration de l'ordre du nanomolaire est appliquée sur le milieu de culture pendant 10 jours (Lagrange et al., 2000). Cette différence peut-être expliquée par la différence d'espèce. En effet il y aurait un effet genre ou espèce spécifique des flavonoïdes sur la croissance pré-symbiotiques (germination des spore, longueur des hyphe et ramifications) des champignons AM et l'on peut supposer qu'une telle spécificité existe également chez les champignons ECM. Par ailleurs une étude souligne le fait qu'il est important de tester une gamme de concentration de flavonoïdes, car un effet sur la croissance peut être induit par une concentration et pas par une autre (Servino et al., 2005). Cependant il n'a été testé ici qu'une seule concentration (10nM) et des temps d'exposition de 24heures à 14jours. Or les temps d'exposition aux flavonoïdes induisant un effet sur la croissance varient selon les publications (de 6j à 40j) (Bécard, Doude, & Pfeffer, 1992; Tsai & Phillips, 1991). Par conséquent, l'absence d'effet constatée, dans nos conditions expérimentales, de la rutine et de la quercétine sur la croissance de *L.bicolor* est peu surprenante. En effet les temps d'exposition testés sont très courts et probablement insuffisants par rapport aux temps d'exposition, cités précédemment, qui induisent un effet sur la croissance des champignons mycorhiziens. Il serait donc intéressant de tester l'effet d'autres concentrations en rutine et quercétine sur la croissance de *L.bicolor* ainsi qu'un temps d'exposition plus long pour confirmer l'absence d'effet de ces composés sur la croissance de ce dernier .

Durant ce stage un stress du mycélium a été constaté suite à une exposition de 24h à 100µM de quercétine (en milieu liquide), ce stress s'est traduit par une diminution significative de la biomasse par rapport au contrôle. La méthode qui a été utilisée pour mesurer la biomasse semble reproductible car elle a été mise en œuvre par un autre étudiant durant ce stage et a abouti aux mêmes résultats. Par ailleurs il s'agit de la même concentration d'exposition qui a été utilisée par

Plett & Martin, 2012 induisant l'expression de la protéine MiSSP7 chez *L.bicolor* après 7 jours de culture sur milieu solide. Or en culture liquide, le milieu est soumis à une agitation constante et l'exposition aux exsudats racinaires ainsi qu'aux composés présents dans le milieu est plus homogène que sur milieu solide. Cette différence des conditions de culture pourrait expliquer qu'un stress ait été induit chez *Laccaria bicolor* dans nos conditions expérimentales et pas sur milieu solide. D'autre part il a été mis en évidence (Lagrange et al., 2000) par un dosage de l'ergostérol que la biomasse des colonies de *Pisolithus 441*, cultivées sur P20 gélosé pendant 10j, augmente de 2 à 3 fois par rapport au contrôle (eau ultra pure) lorsque 20µL d'une solution à 1 µM de rutine est ajoutée au milieu de culture. L'ergostérol est le stérol le plus abondant chez les champignons, son dosage est une méthode sensible communément utilisée pour évaluer la biomasse fongique active durant les différentes étapes de développement des mycorhizes (Zeppa et al., 2000). Il serait donc intéressant d'évaluer l'influence de la rutine et de la quercétine et des exsudats racinaires sur la biomasse de *L.bicolor* par un dosage de l'ergostérol par HPLC afin de valider nos résultats. D'autres méthodes tel que le dosage de la chitine et la mesure de la biomasse sèche du mycélium sont également communément utilisés mais elles manquent de sensibilité (Taniwaki, Pitt, Hocking, & Fleet, 2006).

Les résultats obtenus en microscopie, indiquent qu'il n'y a aucune influence des différentes concentrations de rutine de quercétine ou des exsudats racinaires sur la ramification du mycélium de *L.bicolor*. De plus l'observation du mycélium sphérique au microscope optique est difficile et longue car il présente une structure en trois dimensions. En effet cette structure en trois dimensions empêche une distinction correcte des différents hyphes lorsqu'ils sont enchevêtrés car un même hyphe peu être présent sur différents plans focaux du microscope (Barry & Williams, 2011). D'autre par l'observation entre lame et lamelle est susceptible d'entraîner une déstructuration du mycélium sphérique pouvant créer un biais lors de l'observation. De même la sélection du matériel biologique, le comptage manuel du nombre de ramification et le choix des hyphes peuvent être biaisés car ces paramètres vont être influencés par l'expérimentateur. D'autres protocoles de comptage des ramifications des hyphes pourraient cependant être envisagés pour valider les résultats obtenus. En effet l'utilisation d'une µ-plaque du fabricant *Ibidis cells in focus* est actuellement testé au laboratoire. Cette méthode permet l'observation microscopique d'un seul hyphe en présence de son milieu de culture, rendant ainsi possible et plus facile l'observation et la mesure de la croissance de l'hyphe au cours du temps ainsi que le comptage des ramifications. De plus ce dispositif permet de préserver l'architecture du champignon filamenteux (Barry, Chan, & Williams, 2009).

4.2 PCR quantitative

La RT-qPCR est une technique de biologie moléculaire sensible, reproductible et rapide permettant de quantifier l'expression des gènes. Il est cependant important de considérer que lorsque l'on mesure la variation d'expression des gènes d'intérêts par qPCR, les variations sont dues à la « variation d'expression biologique réelle » entre les gènes testés mais également à des variations non spécifiques résultant de la qualité et de la quantité des échantillons, aux réactions enzymatiques (transcription reverse et réaction d'amplification en chaîne par polymérase). Éliminer les variations non spécifiques est donc primordiale et l'utilisation de gènes de références (exprimés de la même façon indépendamment du traitement et des conditions expérimentales) pour la normalisation du niveau d'expression des gènes d'intérêt est essentielle.

4.2.1 Sélection des gènes références

L'utilisation de la stratégie de normalisation décrite et développée par Vandesompele et al. en 2002 a été utilisée lors de ce stage (geNorm). Elle implique la sélection de gènes de référence stables, non cos-régulés, ayant une classe fonctionnelle différente et une abondance différente dans la cellule. Cette étude montre par ailleurs que l'utilisation de plusieurs gènes de références est préférable afin d'éviter les erreurs couramment dues à l'utilisation d'un seul gène de ménage. La condition limitante de cette méthode est cependant la quantité d'ARN à disposition car elle nécessite la mesure de plusieurs gènes de référence au lieu d'un seul pour chaque échantillon c'est pourquoi l'évaluation du nombre de gènes optimal à utiliser est très important.

Cependant d'autres logiciels similaires d'évaluation des gènes de références candidats existent; il est possible de citer Normfinder, BestKeeper et General Pattern Recognition. Ces logiciels utilisent d'autres algorithmes afin de calculer la stabilité des gènes de référence. GeNorm suivi de Norm Finder sont les logiciels les plus cités à ce jour dans la littérature (Vandesompele et al., 2002, Andersen ; Jensen, & Orntoft, 2015). Par ailleurs il n'existe pas de consensus pour le mode de sélection des gènes de référence et la méthode choisie est inhérente au scientifique et à ces conditions expérimentales. Le choix du logiciel geNorm durant ce stage repose sur le fait qu'il peut être utilisé dans toutes les conditions de culture testées au laboratoire. Il serait cependant intéressant d'évaluer la stabilité de nos gènes de référence avec les autres logiciels de normalisation cités afin de renforcer nos résultats. (Remans et al., 2014, Chandna ; Augustine, & Bisht, 2012)

Durant ce stage les 8 gènes de références qui ont été sélectionnés comme candidats, sont cependant peu stables dans nos conditions expérimentales. Il serait donc utile, de tester et sélectionner d'autres gènes de références, afin d'améliorer la précision et la fiabilité des résultats obtenus. Une étude (Llanos, François, & Parrou, 2015) propose un set de 6 gènes de référence pouvant être utilisés pour la normalisation des données RT-qPCR relatives aux expérimentations sur

les champignons filamenteux :ubcB (ubiquitin carrier protein), sac7 (Rho GTPase activator), fis1 (mitochondrial membrane fission protein), sarA (secretion associated GTP binding protein), et deux gènes homologues de *S. cerevisiae* TFC1 and UBC6. Leur stabilité dans nos conditions expérimentale pourrait donc être testée. Certains gènes, communément utilisés pour la normalisation qPCR et cités parmi les meilleurs gènes de ménages : g6pdh, β -tub and act ne sont pas toujours les plus stables, cela montre donc l'importance de tester les gènes de référence candidats pour chacune de nos conditions expérimentales.

4.2.2 Etude de l'expression des gènes d'intérêt par RT-qPCR

Il a été démontré en 2011 (Plett et al., 2011) que les transcrits et la protéine MiSSP7 de *Laccaria bicolor* sont exprimés à tous les stades du processus de colonisation de la racine, entre 0 et 12 semaines, même avant qu'un contact entre le champignon cultivé sur milieu gélose avec cellophane et la racine de la plante ait lieu. Mais quels sont les exsudats racinaires impliqués dans l'expression de MiSSP7 ? D'autre part il a été démontré en 2012 (Plett & Martin, 2012), par immunolocalisation, que la quercétine, la rutine (100 μ M) et les exsudats racinaires de peuplier induisent la production de la protéine MiSSP7 chez *Laccaria bicolor* après 7 jours. Est-ce que les transcrits MiSSP7 sont surexprimés avant 7 jours d'exposition à ces exsudats racinaires ?

Nos résultats ne montrent pas de régulation de l'expression de MiSSP7, ni MiSSP8,5 ou MiSSP17 après un contact de seulement 24h avec 100 μ M (ou des concentrations inférieures) de rutine ou quercétine. Par ailleurs MiSSP 8,5 et MiSSP17 ne sont pas induits après 24 h d'exposition aux racines de peuplier. En revanche une sur-expression du gène MiSSP7 a été observée après 24h d'exposition aux exsudats racinaires. Cela suggère une régulation de MiSSP7 très tôt dans l'établissement de l'ECM et également l'implication d'exsudats différents de la rutine ou de la quercétine pour l'induction de l'expression des MiSSPs. Il est cependant important de rester prudent vis à vis des résultats obtenus, car la stabilité des gènes de référence est faible et le risque de faux négatifs n'est pas à négliger. En effet étant donné que la puissance des tests statistiques effectués est faible, la possibilité qu'une différence significative existe mais qu'elle n'ait pas été mise en évidence n'est pas à rejeter. D'autre part les tests statistiques généralement utilisés à la suite d'une qPCR sont une ANOVA ou un test de Student. Or un test Anova n'a pas pu être utilisé pour l'analyse statistique de nos données RT-qPCR car elles ne suivent pas une loi normale, c'est pourquoi le test de Kruskal-Wallis a été utilisé.

Ces premiers résultats de qPCR seront donc utilisés pour orienter les futures expériences à mener au laboratoire. Il serait entre autre intéressant de renouveler notre étude en augmentant le nombre de répliquas et en prolongeant le temps d'exposition du mycélium à la rutine et à la quercétine et aux exsudats racinaires .

4.3 Discussion générale et perspectives

D' un point de vue global les expériences ont été menées in vitro avec un système simplifié basé sur l'étude de deux flavonoïdes. Or les expérimentations effectuées sur des milieux standardisés impliquent des conditions de cultures qui sont très éloignées des conditions réelles de croissance des champignons ectomycorhiziens dans les écosystèmes forestiers où de nombreux signaux moléculaires sont échangés entre les plantes et les micro-organismes présents au sein de la rhizosphère. Cependant ces systèmes simplifiés de culture sont un bon moyen pour étudier l'effet d'un composé particulier et comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la symbiose ECM. Par ailleurs il a été démontré durant ce stage que la rutine et la quercétine n'ont pas d'effet sur la morphologie et l'expression des MiSSPs étudiés chez *L.bicolor*, dans les conditions expérimentales testées. Or la stimulation, par des molécules n'appartenant pas à la classe des flavonoïdes, de la ramification et de la croissance de champignons AM a été suggéré dans plusieurs études (Raudaskoski & Kothe, 2014). En effet, Kohki, Ken-ichi, & Hideo, 2005 ont montré que le 5-deoxy-strigo, un strigolactone appartenant au groupe des sesquiterpene lactones isolé chez *Lotus japonicus* induit une augmentation des ramifications des hyphes chez le champignon arbusculaire *Gigaspora margarita* après 24h d'exposition. Par conséquent, il pourrait être intéressant de tester l'effet d'autres molécules signales de la plante, appartenant ou non à la classe des flavonoïdes sur la morphologie du mycélium et l'expression des MiSSPs chez le champignon ECM *L.bicolor*. D'autre part des hydrophobines de classe I (SSP) de *L.bicolor* semblent impliquées dans l'établissement de l'interface symbiotique ECM, bien que leur fonction ne soit pas clairement définie (Plett, Gibon, Duffy, et al., 2012). IL serait donc intéressant d'étudier l'induction de l'expression des hydrophobines de *L.bicolor* en présence d'exsudats racinaires.

Par ailleurs il est envisagé dans la suite de ce stage de tester l'expression de MiSSP7; MiSSP8,5 et MiSSP17 après 48 et 72h d'exposition à la rutine, la quercétine ou aux exsudats racinaires de peuplier et de tester en parallèle l'expression des FTs candidats surexprimés dans les étapes précoces de la mycorhization avant la formation du manteau et réseau de Harting (voir 1.2.6) , dans ces mêmes conditions expérimentales .

Bibliographie

- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Orntoft, T. F. (2015). Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets, (64), pp.5245–5250.
- Araud, R. (2013). Laboratoires de recherche de l'INRA à Champenoux par Tectoniques. <http://www.actuarchi.com/2013/04/laboratoires-inra-champenoux-tectoniques/>
- Ayoubi, T. (2007). RNA quality control. http://www.biomedicalgenomics.org/RNA_quality_control.html
- Balaji, B., Poulin, M. J., Vierheilig, H., & Piché, Y. (1995). Reponse of an Arbuscular Mycorrhizal Fungus, *Gigaspora margarita*, to Exudates and Volatiles from the Ri T-DNA-Transformed Roots of Nonmycorrhizal and Mycorrhizal Mutans of *Pisum sativum* L Sparkle, (19), 275–283.
- Barry, D., Chan, C., & Williams, G. . (2009). Morphological quantification of filamentous fungal development using membrane immobilization and automatic image analysis, 36(6), pp.787–800.
- Barry, D., & Williams, G. (2011). Microscopic characterisation of filamentous microbes: towards fully automated morphological quantification through image analysis. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2011.03506.x>
- Bécard, G., Douds, D., & Pfeffer, P. (1992). Extensive In Vitro Hyphal Growth of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Presence of CO₂ and Flavonols, 58(3), pp. 821–825.
- Bernardi, Y. (2012). INRA science et impact, Les centres INRA Nancy-Lorraine, Le centre/les recherches, Les unités de l'INRA en Lorraine, Interactions arbres-microorganismes. Retrieved from <http://www.nancy.inra.fr/Le-centre-Les-recherches/Les-unites/IAM/%28key%29/7>
- Bernardi, Y. (2013a). INRA science et impact, les centres INRA Nancy-Lorraine, Le centre/les recherches, Introduction. Retrieved from <http://www.nancy.inra.fr/Le-centre-Les-recherches/Le-centre-Inra-de-Nancy-Lorraine>
- Bernardi, Y. (2013b). INRA science et impact, Les centres INRA, Le centre INRA de Nancy-Lorraine, L'histoire du centre. Retrieved from <http://www.nancy.inra.fr/Le-centre-Les-recherches/Le-centre-Inra-de-Nancy-Lorraine/L-histoire-du-centre/%28key%29/1>
- Bernardi, Y. (2013c). INRA science et impact, Les centres INRA Nancy-Lorraine Le centre/les recherches, Le centre INRA de Nancy-Lorraine, Stratégie scientifique. Retrieved from <http://www.nancy.inra.fr/Le-centre-Les-recherches/Le-centre-Inra-de-Nancy-Lorraine/Strategie-scientifique/%28key%29/0>
- Bernardi, Y. (2013d). INRA science et impact, Les centres INRA Nancy-Lorraine Le centre/les recherches, Le centre INRA de Nancy-Lorraine, Investissement d'avenir: des projets structurants. Retrieved from <http://www.nancy.inra.fr/Le-centre-Les-recherches/Le-centre-Inra-de-Nancy-Lorraine/Investissements-d-avenir/%28key%29/2>
- Bernardi, Y. (2014). INRA science et impact, Les centres INRA Nancy-Lorraine, Le centre/les recherches, LabEX ARBRE. Retrieved from <http://www.nancy.inra.fr/Le-centre-Les-recherches/labex-Arbre/LabEx-ARBRE/%28key%29/0>
- Cesco, S., Mimmo, T., Tonon, G., Tomasi, N., Pinton, R., & Terzano, R. (2012). Plant-borne flavonoids released into the rhizosphere: impact on soil bio-activities related to plant nutrition. A review, 2(48), 123–149. <http://doi.org/10.1007/s00374-011-0653-2>
- Chandna, R., Augustine, R., & Bisht, N. (2012). Evaluation of Candidate Reference Genes for Gene Expression Normalization in Brassica juncea Using Real Time Quantitative RT-PCR, 7(5). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0036918>
- Courty, P.-E., Buee, M., Dledhiou, A. G., Frey-Klett, P., Le Tacon, F., Turpault, M.-P., Garbaye, J. (2010). The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts, 42, 2348.
- Daguerre, yohann. (2013a). Analyse fonctionnelle d'effecteurs fongiques impliqués dans le développement de la symbiose ectomycorhizienne *Laccaria bicolor*-*Populus trichocarpa*. Université de Lorraine, I. Retrieved from Chapitre 1 Synthèse bibliographique. (ECM: développement de l'organe symbiotique p21-40)
- Daguerre, yohann. (2013b). Analyse fonctionnelle d'effecteurs fongiques impliqués dans le développement de la symbiose ectomycorhizienne *Laccaria bicolor*-*Populus trichocarpa*. Université de Lorraine, INRA Nancy. Retrieved from Chapitre 1 Synthèse bibliographique. (*Laccaria bicolor*, un modèle d'étude)
- Daguerre, yohann, Levati, E., Tisserant, E., Morin, E., Plett, J. M., Kohler, A., ... Brun, A. (2013). Genome-wide transcriptome profiling and functional analysis of the transcription factors from *Laccaria bicolor*.
- Dexheimer, J. (1997). Etude structurale et fonctionnelle des interfaces entre le champignon et la plante hôte. *Revue Forestière Française*, 49(spécial), p.43–56.
- Didier, A. (2015). Présentation de l'Unité IAM. UMR interaction arbres/microorganismes. Retrieved from http://mycor.nancy.inra.fr/IAM/?page_id=2000
- Doillon, D. (2010). Déterminants moléculaires de la tolérance au zinc des microorganismes eucaryotes. Université Henri Poincaré, Nancy. Retrieved from Chapitre 1 Synthèse bibliographique. (Origine de la souche utilisée)
- Egli, S., & Brunner, I. (2002). Les mycorhizes Une fascinante biocénose en forêt. *Institut Fédéral de Recherches WSL*, (35), 8.

- Felten, J., Legué, V., & Martin, F. (2007). In vitro « sandwich » culture system on petri dishes for poplar plants. INRA.
- INRA. (2013a, November 26). Le champignon mycorhizien le plus célèbre, car son ancêtre est supposé avoir permis aux plantes de coloniser le milieu terrestre il y a 400 millions d'années. Retrieved from <http://presse.inra.fr/Ressources/Communiqués-de-presse/Le-plus-celebre-champignon-symbiotique-livre-ses-secrets>
- INRA. (2014). INRA - Symbiose sous influence. <http://presse.inra.fr/Ressources/Communiqués-de-presse/Symbiose-sous-influence>
- INRA, I. (2013b). AAA1-Livret d'accueil IAM version.
- Kazmierczak, T. (2012). Rôles d'effecteurs symbiotiques de *Laccaria bicolor* (Mémoire de stage). INRA Champenoux. Retrieved from Introduction. (p 1)
- Kazmierczak, T. (2011). Rôles d'effecteurs symbiotiques de *Laccaria bicolor* (p 20–24). MASTER FAGE Biologie et Ecologie pour la Forêt, l'Agronomie et l'Environnement Spécialité BIPE. http://docnum.univ-lorraine.fr/public/BUS_M_2012_KAZMIERCZAK_THEOPHILE.pdf
- Kloppholz, S., Kuhn, H., & Requena, N. (n.d.). A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. - PubMed - NCBI, 21(14), 1204–1209. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2011.06.044> showArticle Info
- Kohki, A., Ken-ichi, M., & Hideo, H. (2015). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi, 435(9), 824–827. <http://doi.org/10.1038/nature03608>
- Kohler, A., Kuo, A., Nagy, L. G., Morin, E., Barry, K. W., Buscot, F., ... Martin, F. (2015). Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nat Genet*, advance online publication. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/ng.3223>
- Kuo, A., Martin, F., Kohler, A., & Grigoriev, I. V. (2014). Expanding genomics of mycorrhizal symbiosis | Microbial Symbioses. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00582>
- Labbé, J. (2009). Contribution à l'étude de la structure et du polymorphisme du génome du basidiomycète ectomycorhizien *Laccaria bicolor* (Maire) Orton et identification de QTLs de mycorhization chez les Peupliers, *Populus trichocarpa* Torr. & A. Gray ex Hook. et *Populus deltoides* (Bartr.) Marsh. Université Henri Poincaré, UMR 1136 INRA/UHP Interactions arbres/Micro-organismes, centre INRA de Nancy. Retrieved from Chapitre1: Introduction. (p 14)
- Lagrange, H., Jay-Allmand, C., & Lapeyrie, F. (2000). Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations, (149), 349–355.
- Le Tacon, F. (1997). Avant-propos_ Numéro spécial. *ENGREF, (Spécial)*, 255. <http://doi.org/10.4267/2042/5660>
- Le Tacon, F., & Selosse, M.-A. (1997). Le rôle des mycorhizes dans la colonisation des continents et la diversification des écosystèmes terrestre. *ENGREF, (Spécial)*, 255. <http://doi.org/10.4267/2042/5664>
- Llanos, A., François, J. M., & Parrou, J.-L. (2015). Tracking the best reference genes for RT-qPCR data normalization in filamentous fungi. <http://doi.org/10.1186/s12864-015-1224-y>
- Marc Buee, Courty, P.-E., Le Tacon, F., & Garbaye, J. (2006). Dossier écologie microbienne des sols. *Biofutur*, (268), 74.
- Martin, F., Duplessis, S., Ditengou, F., Lagrange, H., Voiblet, C., & Lapeyrie, F. (2001). Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes - Martin - 2001 - *New Phytologist* - Wiley Online Library, 151(151), 145–154.
- Martin, F., & Kamoun, S. (2011). *Effectors in Plant-Microbe Interactions* (John Wiley & Sons, 2011). <http://books.google.fr/books?id=RbCMdSHpkegC>
- Martin, F., & Plett, J. M. (2011). Blurred boundaries: lifestyle lessons from ectomycorrhizal fungal genomes, 27(1). <http://doi.org/10.1016>
- Martin, F., & Selosse, M.-A. (2008). The *Laccaria* genome: a symbiont blueprint decoded. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2008.02613.x/epdf>
- Mohan, J. E., Cowden, C. C., Baas, P., Dawadi, A., Frankson, P. T., Helmick, K., ... Witt, C. A. (2014). Mycorrhizal fungi mediation of terrestrial ecosystem responses to global change: mini-review. *Fungal Ecology*, 10, 100.
- Mohamad Tahat, M., & Kamaruzaman, S. (2012). Arbuscular mycorrhizal fungi and plant root exudates bio-communications in the rhizosphere, 6(46). <http://doi.org/10.5897/AJMR12.2250>
- Monther, M. T., & Kamaruzaman, S. (2012). Arbuscular mycorrhizal fungi and plant root exudates bio-communications in the rhizosphere. *African Journal of Microbiology Research*, 6. <http://doi.org/10.5897/AJMR12.2250>
- Morreel, K., Goeminne, G., Storme, V., Sterck, L., Ralph, J., Coppieters, W., ... Boerjan, W. (2006). Genetical metabolomics of flavonoid biosynthesis in *Populus*: a case study. *PubMed*, (47), 224–237. <http://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02786.x>
- Mousain, D., Matomoto-Pintro, P., & Quiquampoix, H. (1997). Le rôle des mycorhizes dans la nutrition phosphatée des arbres forestiers. *ENGREF, (Spécial)*, 255. <http://doi.org/DOI:10.4267/2042/5676>
- Pereda Campos, M. V. (2008, December 15). Microsoft Word - ThèsePereda.doc - SCD_T_2008_0141_PEREDA-CAMPOS.pdf. Université Henri Poincaré, Nancy. Retrieved from http://docnum.univ-lorraine.fr/public/SCD_T_2008_0141_PEREDA-CAMPOS.pdf
- Petre, K., & Kamoun, S. (2014). How Do Filamentous Pathogens Deliver Effector Proteins into Plant Cells?, 12(2).

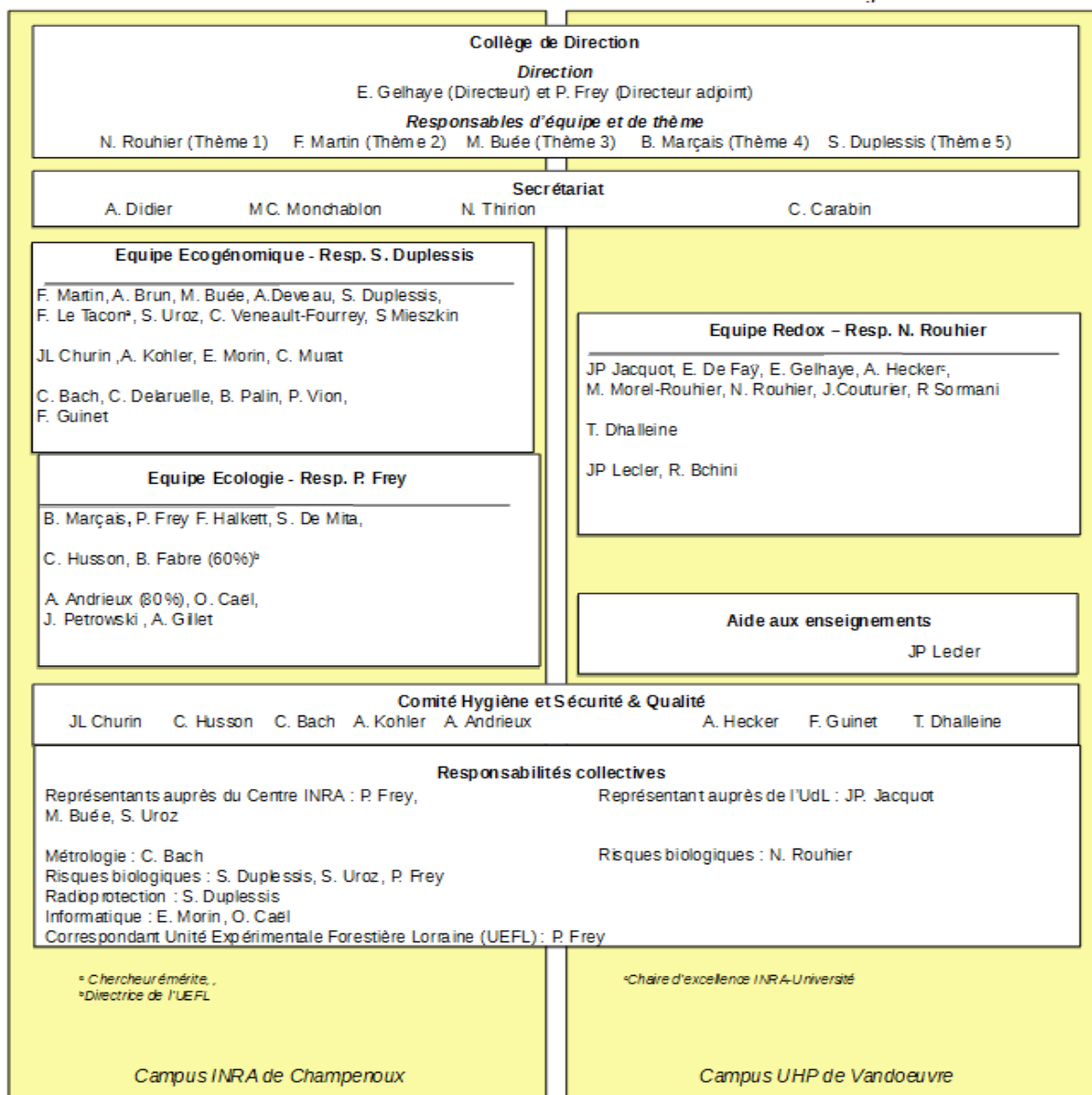
- <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001801>
- Pickels, B. J., Egger, K., Massicotte, H. B., & Green, D. S. (2012). Ectomycorrhizas and climate change. *Fungal Ecology*, 5, 98.
- Plett, J. M., Daguerre, Johann, Wittulsky, S., Vayssières, A., Deveau, A., Veneault-Fourrey, C., & Martin, F. (2014). Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus JAZ6* protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. <http://doi.org/10.1073/pnas.1322671111>
- Plett, J. M., Gibon, J., Duffy, K., Hoegger, P., Velagapudi, R., Han, J., ... Martin, F. (2012). Phylogenetic, genomic organization and expression analysis of hydrophobin genes in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. 49(3), 199–209. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.01.002>
- Plett, J. M., Kempainen, M., Kale, S. D., Kohler, A., Legué, V., Brun, A., ... Martin, F. (2011). A Secreted Effector Protein of *Laccaria bicolor* Is Required for Symbiosis Development. *Current Biology*, 21. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.033>
- Plett, J. M., & Martin, F. (2012). Poplar root exudates contain compounds that induce the expression of MiSSP7 in *Laccaria bicolor*. *Plant Signaling and Behavior*, 7(1), 12–15. <http://doi.org/10.4161/psb.7.1.18357>
- Poulin, M. J., Bel-Rhliid, R., Piché, Y., & Chenevert, R. (1993). Flavonoids released by carrot (*Daucus carota*) seedlings stimulate hyphal development of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of optimal CO₂ enrichment, 19(10). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24248578>
- Pritchard, L., & Birch, P. (2014). The zigzag model of plant-microbe interactions: is it time to move on?, 15, 865–870. <http://doi.org/10.1111/mpp.12210>
- Quiagen. (2010). RNeasy mini Handbook. Quiagen. Retrieved from http://www.genome.duke.edu/cores/microarray/services/rna-qc/documents/RNeasy_Mini_Handbook.pdf
- Raudaskoski, M., & Kothe, E. (2014). Novel findings on the role of signal exchange in arbuscular and ectomycorrhizal symbioses, 25(4), 243–252. <http://doi.org/DOI.10.1007/s00572-014-0607-2>
- Remans, T., Keunen, E., Bex, G. J., Smeets, K., Vangronsveld, J., & Cuypers, A. (2014). Reliable Gene Expression Analysis by Reverse Transcription- Quantitative PCR: Reporting and Minimizing the Uncertainty in Data Accuracy, 5(27), 1–9. <http://doi.org/10.1105/tpc.114.130641>
- Selosse, M.-A., & Le Tacon, F. (1998). The land flora: a phototroph–fungus partnership? *Tree*, 13(1), 20.
- Servino, J., Ponce, M., Erra-Bassells, R., Vierheilig, H., Ocampo, J., & Godeas, A. (2005). Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth of *Gigaspora* and *Glomus*. 7(109), 789–794. <http://doi.org/10.1017/S0953756205002881>
- Shaw, L., Morris, P., & Hooker, J. (2006). Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environmental Microbiology*, 8(11), 1867–1880. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01141.x>
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2010). *Mycorrhizal Symbiosis* (3rd ed.). Elsevier Science. Retrieved from <http://books.google.fr/books?id=qLciOJaG0C4C>
- Smith, S., & Read, D. J. (2008). In *Mycorrhizal Symbiosis*. (3ème ed.). Londres.
- Taniwaki, M., Pitt, J., Hocking, A., & Fleet, G. (2006). Comparison of hyphal length, ergosterol, mycelium dry weight, and colony diameter for quantifying growth of fungi from foods, 571, pp.49–67.
- Tisserant, E. (2011). Analyse bio-informatique du transcriptome des champignons mycorrhiziens *Tuber melanosporum* et *Glomus intraradices*. Université Henri Poincaré, INRA Champenoux. Retrieved from Introduction. (p 1)
- Tsai, S., & Phillips, D. (1991). Flavonoids Released Naturally from Alfalfa Promote Development of Symbiotic *Glomus* Spores In Vitro, 57(5), 1485–1488.
- Tuskan, G. (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). - PubMed - NCBI, 313(5793pp.1596-1604), 1596–604. <http://doi.org/10.1126/science.1128691>
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. Retrieved from <http://genomebiology.com/content/pdf/gb-2002-3-7-research0034.pdf>
- Veneault-Fourrey, C., & Martin, F. (2011). Mutualistic interactions on a knife-edge between saprotrophy and pathogenesis. Elsevier Ltd., 14, pp. 444–450. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.022>
- Vikas. (2011). Liquide Chromatography-tandem Mass Spectrometric method for simultaneous determination of rutin and quercetin from leaves of *Artocarpus Lakoocha* Roxb. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. Retrieved from http://ijpbs.net/volume2/issue1/pharma/_79.pdf
- Vincent, D., Kohler, A., Claverol, S., Solier, E., & Martin, F. (2012). Secretome of the free-living mycelium from the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Journal of Protome Research*. Retrieved from <http://www.pubfacts.com/detail/22074047/Secretome-of-the-free-living-mycelium-from-the-ectomycorrhizal-basidiomycete-Laccaria-bicolor>.
- Young, C. (2015). INRA - Aux racines des symbioses mycorrhiziennes. <http://presse.inra.fr/Ressources/Communique-de-presse/Aux-racines-des-symbioses-mycorhiziennes>
- Zeppa, S., Vallorani, L., Potenza, L., Bernardini, F., Pieretti, B., Guescini, M., Stocchi, V. (2000). Estimation of fungal biomass and transcript levels in *Tilia platyphyllos*-*Tuber borchii* ectomycorrhizae, 119–124

Annexes

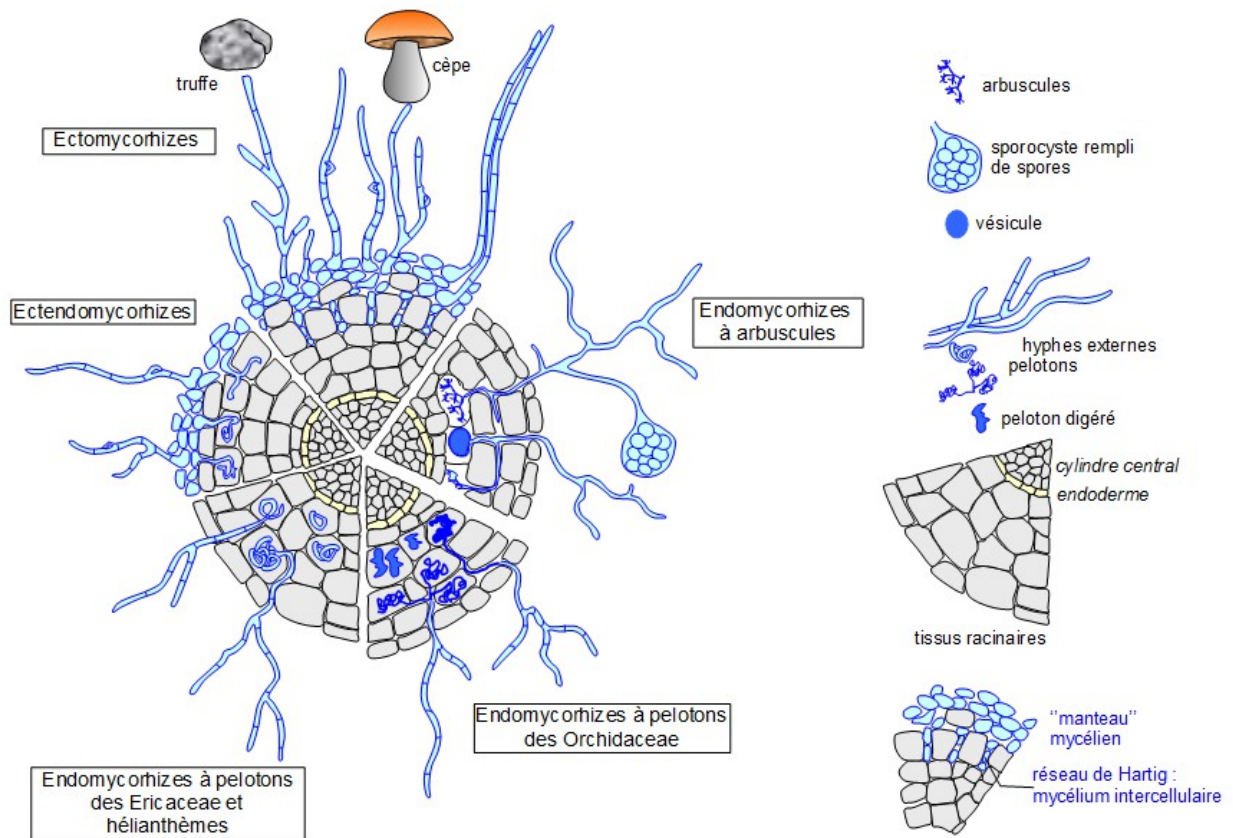
Annexe 1 : Organigramme fonctionnel de l'IAM (INRA, 2013b)

Organigramme fonctionnel de l'unité pour 2013-2017

UMR INRA/Université de Lorraine 1136 « Interactions Arbres/Micro-organismes »



Annexe 2: Représentation schématique des différentes structures mycorhiziennes représenté sur une coupe transversale de racine (Selosse & Le Tacon, 1998).



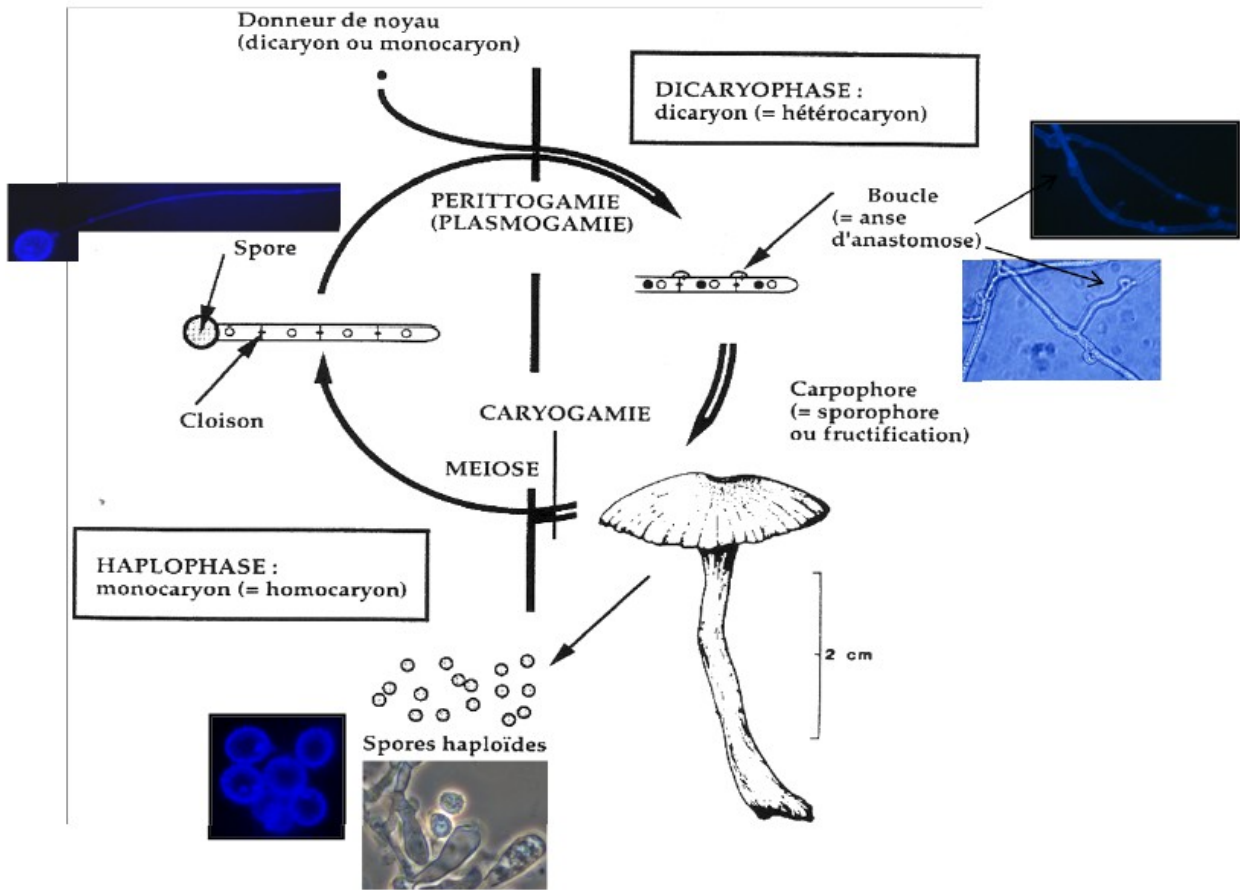
Annexe 3 : Tableau comparatif des principales caractéristiques des sept types de symbioses mycorhiziennes (Smith & Read, 2010).

Table I.1 The characteristics of the important mycorrhizal types. The structural characters given relate to the mature state, not the developing or senescent states. Entries in brackets indicate rare conditions.

Kinds of mycorrhiza	Arbuscular mycorrhiza	Ectomycorrhiza	Ectendomycorrhiza	Arbutoid mycorrhiza	Monotropoid mycorrhiza	Ericoid mycorrhiza	Orchid mycorrhiza
Fungi septate	–	+	+	+	+	+	+
aseptate	+	–	–	–	–	–	–
Intracellular colonization	+	–	+	+	+	+	+
Fungal mantle	–	+	+ or –	+ or –	+	–	–
Hartig net	–	+	+	+	+	–	–
Achlorophyllly	– (+)	–	–	–	+	–	+†
Fungal taxa	Glomero	Basidio/Asco (Glomero)	Basidio/Asco	Basidio	Basidio	Asco	Basidio
Plant taxa	Bryo Pterido Gymno Angio	Gymno Angio	Gymno Angio	Ericales	Monotropeoideae	Ericales Bryo	Orchidales

† All orchids are achlorophyllous in the early seedling stages. Most orchid species are green as adults. The fungal taxa are abbreviated from Glomeromycota, Ascomycota and Basidiomycota; the plant taxa from Bryophyta, Pteridophyta, Gymnospermae and Angiospermae.

Annexe 4 : Cycle de reproduction du champignon *Laccaria bicolor*(Labbé, 2009).



Annexe 5: Voie de biosynthèse des flavonoïdes (Morreel et al., 2006)

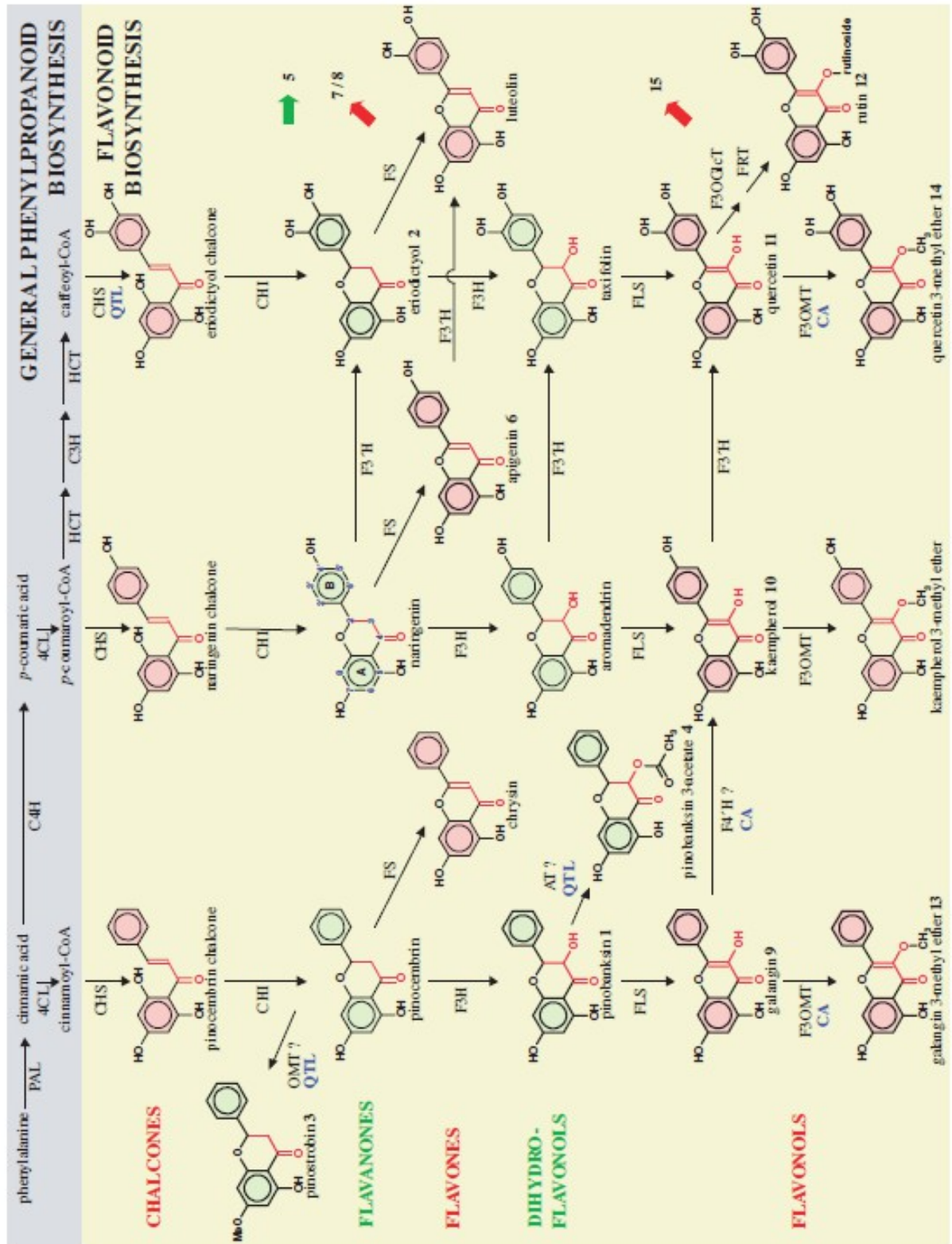


Table 1 Effect of root-borne flavonoids on mycorrhizal fungi

Trivial name	Chemical name	Target organism(s)	Effect
Flavones			
Acacetin	5,7-Dihydroxy-4'-methoxyflavone	<i>Gigaspora</i> sp., <i>Glomus</i> sp.	Inhibition of host penetration
Rahmetin	3,5,3',4'-Tetrahydroxy-7-methoxyflavone	<i>Gigaspora</i> sp., <i>Glomus</i> sp.	Inhibition of host penetration
	5,6,7,8-Tetrahydroxy-4-methoxyflavone	<i>Gigaspora</i> sp.	Stimulation of host penetration
	3,5,6,7,- Tetrahydroxyflavone	<i>Gigaspora</i> sp.	Stimulation of host penetration
Apigenin	5,7,4'-Trihydroxyflavone	<i>Gigaspora</i> sp., <i>Glomus</i> sp.	General stimulation (hyphal length, branching, entry points and mycorrhization)
Apigenin	5,7,4'-Trihydroxyflavone	<i>G. mossae</i>	Stimulation of mycorrhizal colonization
Luteolin	5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavone	<i>Gigaspora</i> sp., <i>Glomus</i> sp.	Stimulation of mycorrhizal colonization (of <i>L. esculentum</i>)
	4',7, Dihydroxyflavone	<i>G. etunicatum</i>	Stimulation of spore germination
Quercetin	3,5,7,3',4'-Pentahydroxyflavonol	<i>Gigaspora</i> sp.	Stimulation of host penetration
Quercetin	3,5,7,3',4'-Pentahydroxyflavonol	<i>G. margarita</i>	Stimulation of hyphal growth (under elevated CO ₂)
Quercetin	3,5,7,3',4'-Pentahydroxyflavonol	<i>G. margarita</i>	Stimulation of hyphal growth (under elevated CO ₂)
Hyperoside	Quercetin-3-O-galactoside	<i>G. etunicatum</i> <i>G. macrocarpum</i>	Stimulation of spore germination
Rutin	Quercetin-3-rutinoside	<i>Pisolithus</i> sp.	Stimulation of hyphal growth
		<i>G. margarita</i>	Stimulation of mycorrhizal colonization (of <i>L. esculentum</i>)
		<i>S. bovinus</i>	Stimulation of spore germination
Myricetin	3,5,7-Trihydroxyflavonol	<i>G. margarita</i>	Stimulation of hyphal growth (under elevated CO ₂)
Kaempferol	3,5,7,4'-Tetrahydroxyflavonol	<i>G. margarita</i>	Stimulation of hyphal growth (under elevated CO ₂)
Galangin	3,5,7-Trihydroxyflavone	<i>G. margarita</i>	Inhibition of hyphal growth (under elevated CO ₂)
Flavanones			
Naringenin	5,7,4'-Trihydroxyflavanone	<i>S. bovinus</i>	Stimulation of spore germination
	4',7 Dihydroxyflavanone	<i>G. etunicatum</i>	Stimulation of spore germination
Hesperetin	3',5,7-Trihydroxy-4'-methoxyflavanone	<i>G. margarita</i>	Inhibition of hyphal growth (under elevated CO ₂)
Hesperidin	Glucoside of 3',5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavanone	<i>S. bovinus</i>	Stimulation of spore germination
Isoflavones			
Daidzein	4',7-Dihydroxy isoflavone	<i>G. mossae</i>	Stimulation of mycorrhizal colonization
		<i>S. bovinus</i>	Stimulation of spore germination
Genistein		<i>G. margarita</i>	Inhibition of hyphal growth (under elevated CO ₂)
Licoisoflavone B		<i>G. margarita</i>	Inhibition of germ tube growth and of hyphal branching

Annexe7 : Composition du milieu de culture P5 (Milieu de PachlewskiP5)

Pour 1L	
di-NH4 tartrate	0,5 g
KH ₂ PO ₄	1g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,5 g
Maltose D+	5 g
Glucose D+ anhydre	20 g
Thiamine solution: 100mg/ml	1ml
Kanieltra (solution commerciale diluée au 1/10 ^{ème})	1ml
PH ajusté à 5,5 avec une solution de KOH 0,25N	
Agar	20g

Annexe8 : Composition du milieu de culture P20 (Milieu de Pachlewski P20)

Pour 1L	
Di-NH ₄ -tartrat	0.5 g
KH ₂ PO ₄ s	1 g
MGSO ₄ *7H ₂ O	0.5 g
Glucose D+	1 g
Kanieltra solution 1000x	1 ml
Thiamine Solution 100mg/l	1 ml
PH ajusté à 5,5 avec une solution de KOH 0,25N	
Agar	20g

Annexe 9: Composition du milieu Murashige et Skoog (FELTEN et al., 2007)

Pour 1L	
Macroelements	50 ml
Microelements	100 ml
Glucose	1g
MES	1g
Ajuster le pH à 5,8 avec une solution de KOH 0,25N	
Agar	10g
Solutions à ajouter après avoir autoclavé le milieu	
Vitamin 100x Stock solution	10ml
Gamborgs Vitamines	1 ml
IBA stock solution (optionnelle)	2 ml

- **500x IBA solution stock (conservation -20°C)**

Dissoudre 50 mg d'IBA dans quelques gouttes EtOH 100 % et compléter avec 50 ml d'eau ultra-pure dans un flacon pour obtenir une solution stock de 1mg/mL. Filter la solution en milieu stérile avec un filtre de 22µm.

- **Solution stock de vitamines 100x (conservation – 20°C) à filtrer avec un filtre de 22µm en conditions stériles**

Vitamine Suppl 100X	pour 100ml (eau ultrapure)
L-Glutamine	2g
Ca-Panthotenate	0,01g
L-Cystéine chlorhydrate	0,01g
Biotine	1ml de sol stock at 0.1 mg/mL

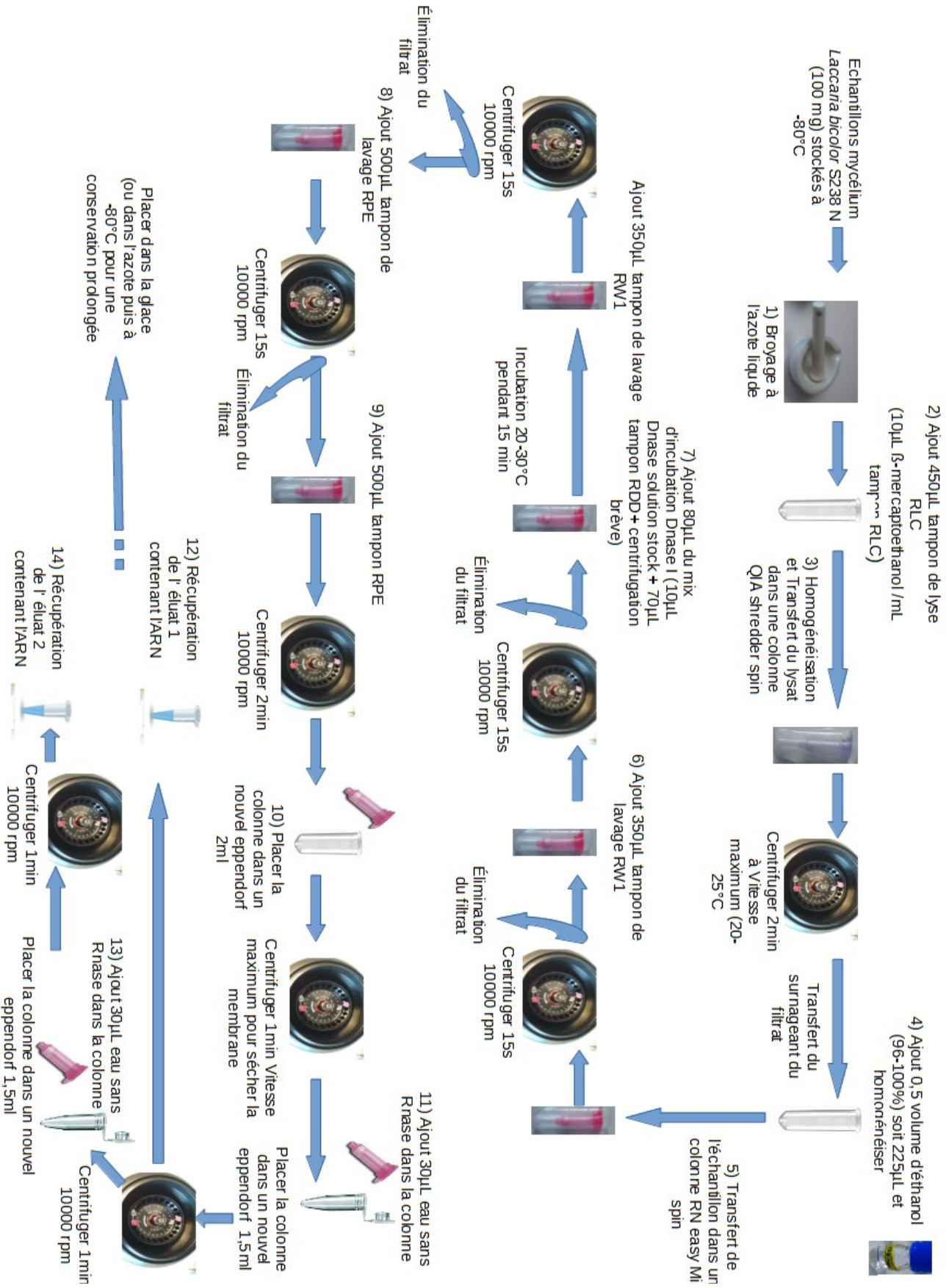
- **Solution stock de vitamines Gamborgs 1000X**

	Gamborgs mg/mL
Myo-inositol	100mg
Nicotinic acid	1mg
Pyridoxine	1mg
Thiamine	10mg

- **Composition des solutions Stock Sigma Micro-éléments 10x et Macro-éléments 20x**

Composés (mg/L)	Macro-éléments Sigma M0654	Micro-éléments Sigma M0529
Ammonium nitrate	1650	-
Boric acid	-	6,2
Calcium chloride anhydrous	332.2	-
Cobalt chloride * 6H2O	-	0.025
Cupric sulphate * 5H2O	-	0.025
Na2-EDTA	-	37.3
Ferrous sulphate * 7 H2O	-	27.8
Magnesium sulphate	180.7	-
Manganese sulphate * H2O	-	16.9
Molybdic acid (sodium salt) * 2H2O	-	0.25
Potassium iodide	-	0.83
Potassium nitrate	1900	-
Potassium phosphate monobasic	170	-
Zinc sulphate * 7 H2O	-	8.6

Annexe 10 : Protocole d' extraction d'ARN fongique à l'aide du kit « RNeasy Mini Kit » (Quiagen, 2010)



Annexe 11: Protocole de synthèse d'ADNc selon le kit « High-Capacity cDNA Reverse Transcription » du fabricant Life Biotechnologies.

Préparation du Reverse transcription Master Mix 2x
10µL par réaction (dans chaque puits)

Composition 2x RT master mix (10µL)	
Réactifs	Volume (µl)
10*RT buffer	2
25* dNTP mix	0.8
10*RT random primers	2
Multiscribe Reverse Transcriptase	1
Rnase inhibitor	0
Nuclease-free H2O	4.2
Volume total de réaction	10

Ajout ARN total 10µL au RT Master Mix 2x pour
obtenir un Mix1X (ans chaque tube)
Quantité d'ARN maximum 2mg

Centrifuger

Reverse transcription dans un
thermo-cycleur
Volume total de la réaction 20µL

Programme thermo-cycleur

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temperature (°C)	25	37	85	4
Time	10 min	120 min	5 sec	∞

Stockage ADNc -20°C

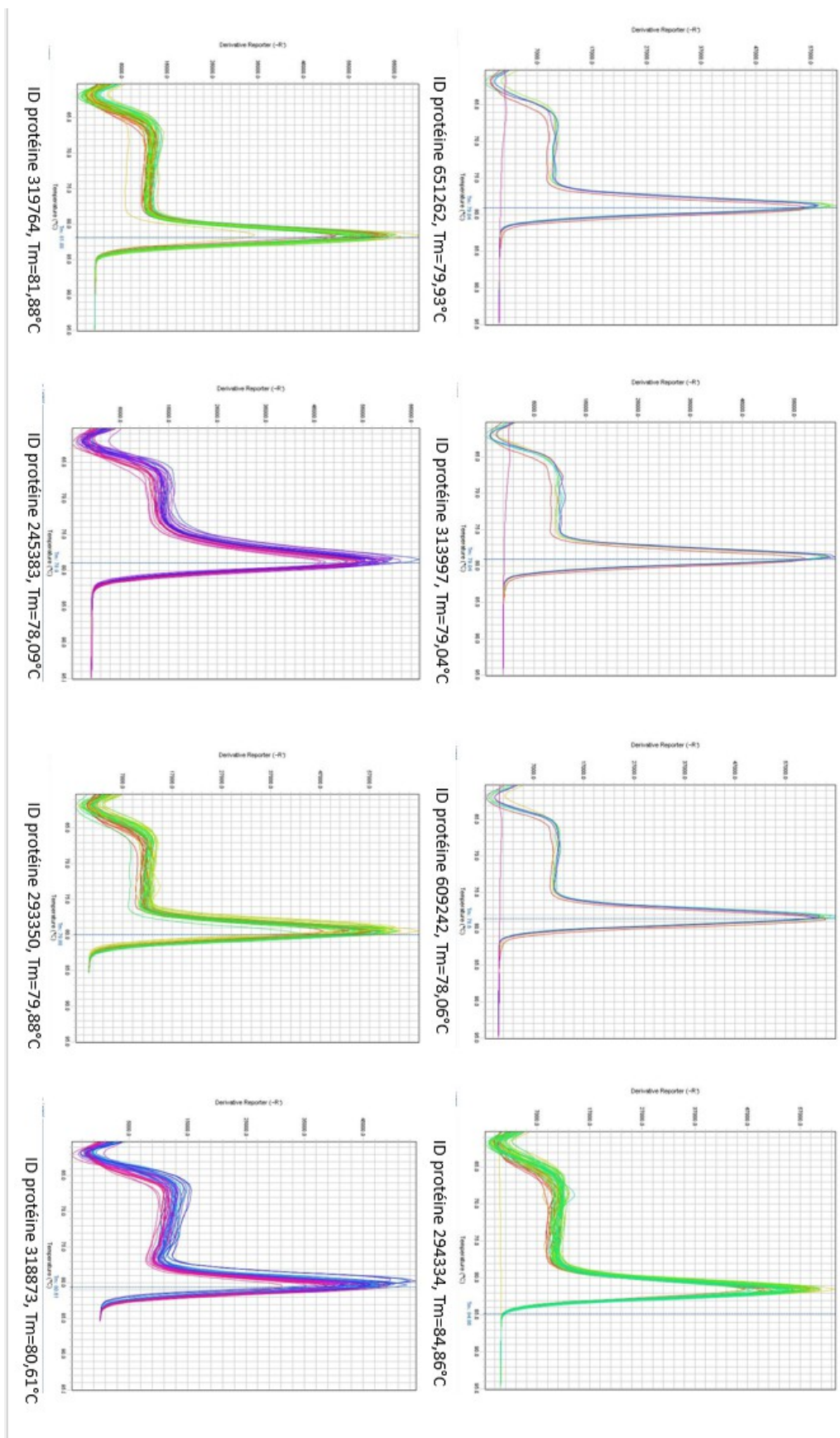
Annexe 12 : Tableau descriptif des gènes de référence testés

Reference genes	proteine ID	KOG ID	KOG class/KOG description
1	651262	KOG2572	Ribosome biogenesis protein
2	313997	KOG0821	RNA processing and modification/Predicted ribosomal RNA adenine dimethylase
3	609242	KOG0101	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones /Moléculer chaperones HSP 70/HSC70 superfamily
4	294334		
5	319764	KOG3467	Chromatin structure and dynamics /Histone 4
6	245383		Metalloprotéase
7	293350		Elongation factor
8	318873		Glyceraldéhyde triphosphate dihydrogenase

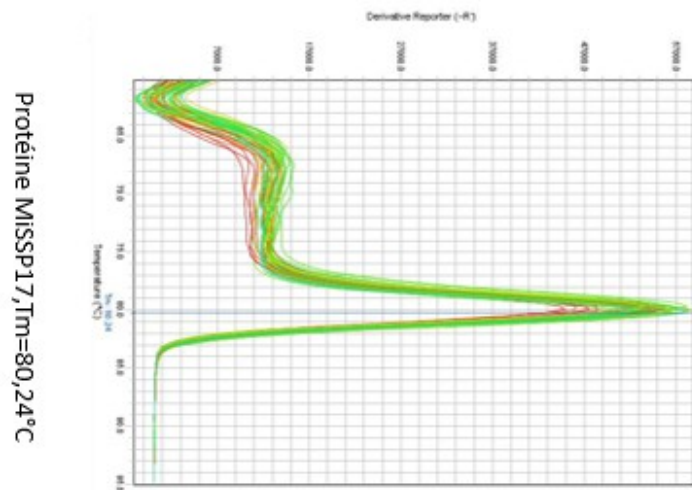
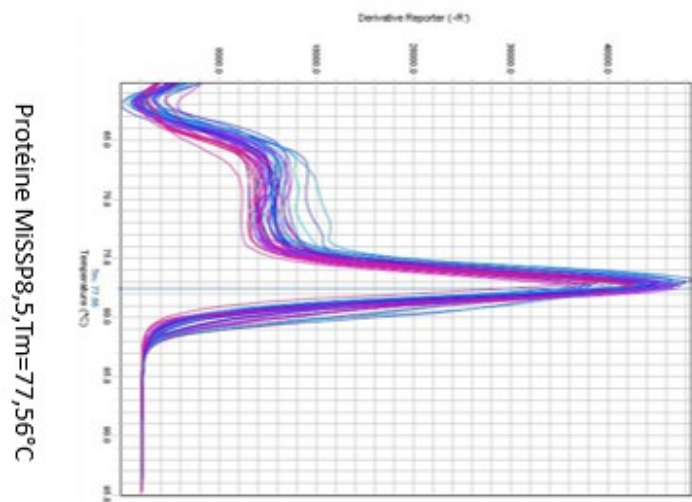
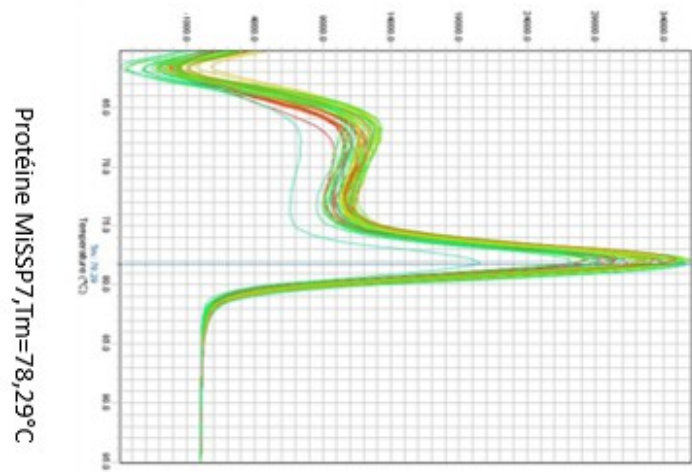
Annexe 13 : Séquences des couples d'amorces des gènes de références et des gènes d'intérêts.

ID de la protéine	Séquence 5'-3'	Nom de la protéine	Gènes	
			de référence	d'intérêt
651262 amorce sens	CTTGACGCTCTGTAGACGG	MISSP7 amorce sens		TCTCGCCTGCACTATCCTCT
651262 amorce anti-sens	ATGCCAGCCATACCACTCTCT	MISSP7 amorce anti-sens		TTGGGCTCCGGTACTCTTCT
313997 amorce sens	GAGCAGAGCGGGTACGAATG	MISSP8,5 amorce sens		CACACTCTTTTCGCCCTGTGC
313997 amorce anti-sens	ACCCGGCCGTACTGGAATAA	MISSP8,5 amorce anti-sens		CCGTTGAGATCAGCTTTGCCG
609242 amorce sens	CGCGGATCAGGGTCTCTTTT	MISSP17 amorce sens		ACCGCAATGGATGTGCATA
609242 amorce anti-sens	TGGGACCCTGTCTGAATGCT	MISSP17 amorce anti-sens		CGGTGCAAGTGTGTCAAG
294334 amorce sens	CACATTATCTACCAGGACAGCA			
294334 amorce anti-sens	TATCATAGTTGTGAGACGCCTTG			
319764 amorce sens	GTTCAAAGCATCCCCAAGC			
319764 amorce anti-sens	CAACCACCCGAAACCGTAGAG			
245383 amorce sens	GCAAACCTTGATGATCCAACGACC			
245383 amorce anti-sens	GCAACATCACGGTATGTTCTCAGC			
293350 amorce sens	CAAGGAGAAGAGTCTGCTTAAGATGC			
293350 amorce anti-sens	CGTTGGGACCGAGAAACGGCAACAC			
318873 amorce sens	TTGTGTGTGGCGTCAATCTT			
318873 amorce anti-sens	TCTTCTGTGTAGCGGTGGTG			

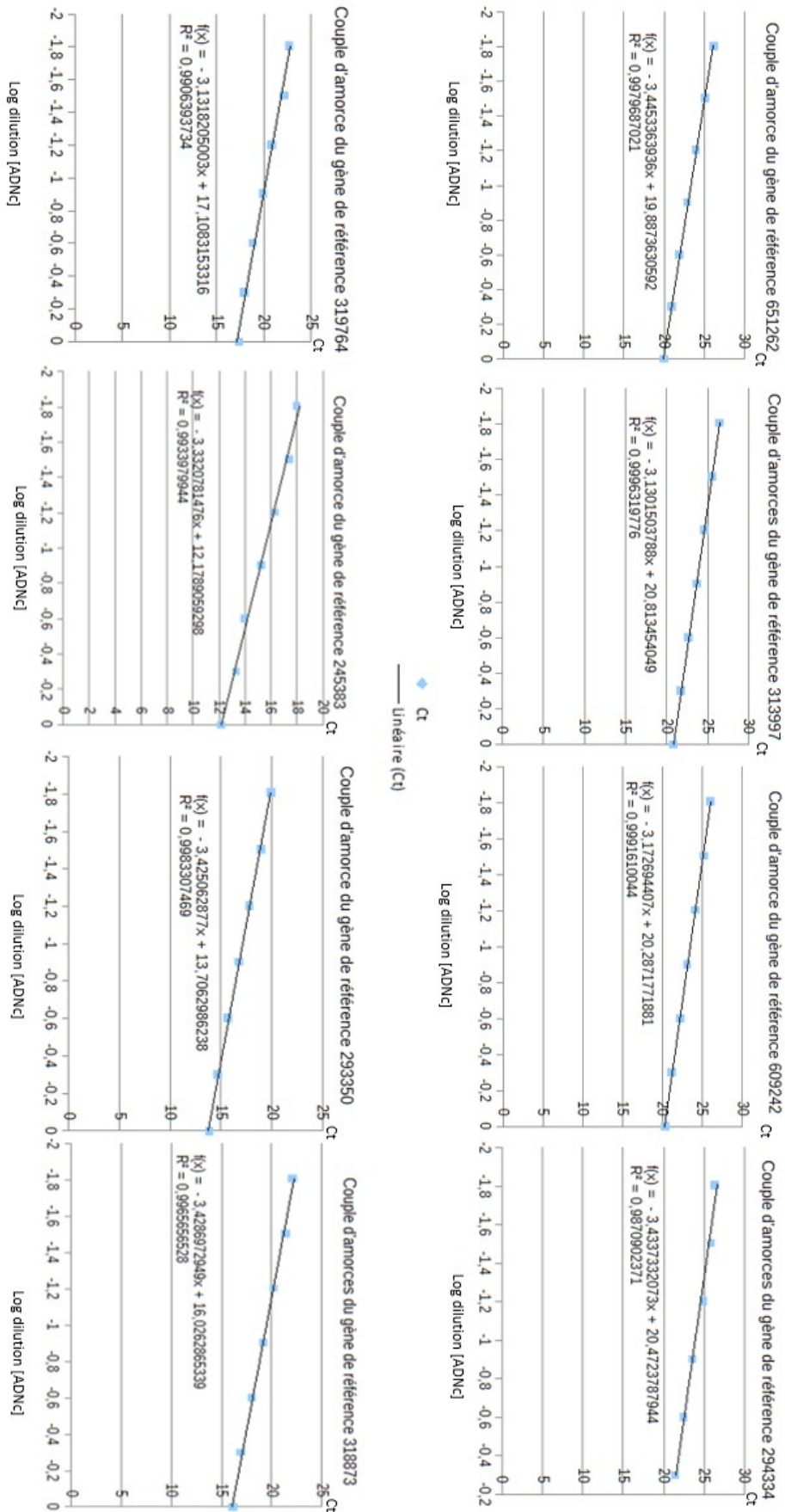
Annexe 14 : Courbe de fusion des gènes de références.



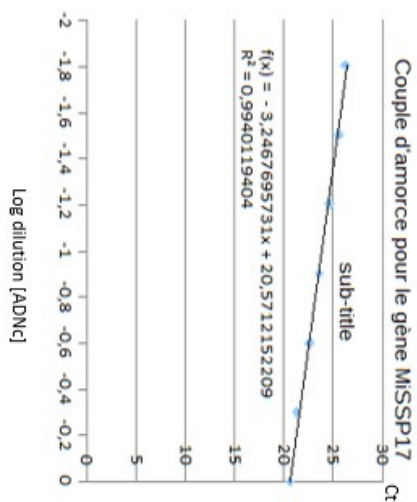
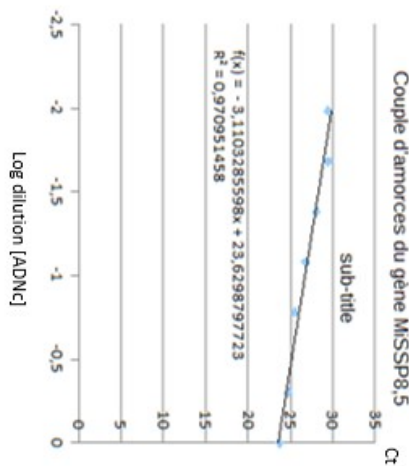
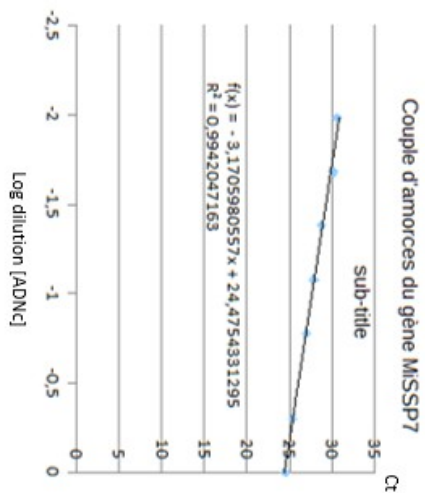
Annexe 15: Courbes de fusion des gènes d'intérêts : MiSSP7, MiSSP8,5 et MiSSP17.



Annexe 16: Droites de régression linéaire représentant les valeurs Ct en fonction du logarithme des dilutions d'ADNc, pour les couples d'amorces des gènes de références . L'efficacité est déterminée selon l'équation suivante : $E=10^{(-1/\text{pente de la droite})}$.



Annexe 17 : Droites de régression linéaire représentant les valeurs Ct en fonction du logarithme des dilutions d'ADNc, pour les couples d'amorces des gènes d'intérêts . L'efficacité est déterminée selon l'équation suivante : $E=10^{(-1/\text{pente de la droite})}$



◆ Ct
 — Unitaire (Ct)

Résumé

Laccaria bicolor est un champignon ectomycorhizien (ECM) capable d'établir une symbiose avec le peuplier. En échange de composés carbonés, les champignons ECM fournissent les composés minéraux et une protection aux stress biotiques et abiotiques. Les champignons ECM jouent donc un rôle majeur dans le fonctionnement des écosystèmes forestiers. Cependant les connaissances actuelles des mécanismes moléculaires impliqués dans l'établissement de la symbiose doivent être approfondies. Les effets des molécules diffusibles des plantes, de la rutine et la quercétine (deux exsudats racinaires) sur la biomasse, la croissance et la morphologie de *Laccaria bicolor* ont été étudiés après une exposition de 24h et jusqu' à 14jours. Aucun effet de la rutine, de la quercétine ou des exsudats racinaires n'ont pu être détectés sur la production de biomasse, la croissance des colonies et la ramification des hyphes du mycélium avec les concentrations et les temps d'exposition testés. De plus les profils d'expression de MiSSP7, MiSSP8,5 et MiSSP17 ont été déterminés après 24h d'exposition à la rutine, à la quercétine ou aux racines de peuplier par RT-qPCR. Une surexpression de MiSSP7 après une exposition de 24h aux racines de peuplier à été constatée. Les données obtenues durant ce stage contribuent à comprendre et modéliser les mécanismes de régulation génétique impliqués dans le développement des ECM .

Mots clés: *L.bicolor*, *biomasse*, *croissance*, *morphologie*, *rutine*, *quercétine*, *exsudats racinaires*, *RT-qPCR*, *MiSSPs*

Abstract

Laccaria bicolor is an ectomycorrhizal fungus (ECM) which is able to make a mutualistic symbiosis with poplar. In exchange for carbohydrates, ECM fungi offer an improved mineral supply and stress protection for trees. So ECM play a major role in forestry ecosystem functioning. However the current knowledge about molecular mechanisms involved in symbiosis establishment has to be improved. We have studied the effect of plant diffusible molecules, rutin and quercetin (two root exudates) on biomass, growth and morphology of *Laccaria bicolor* after 24h until 14 days of exposure. We were not able to detect any effect of rutin nor quercetin nor plant roots exudates on, biomass production, colonial growth and hyphal branching at the concentrations and exposure times tested. Moreover gene expression patterns of MiSSP7, MiSSP8,5 and MiSSP17 were also determined after 24h exposure of *L.bicolor* to rutin or quercetin or poplar roots by RT-qPCR. We observed an upregulation of MiSSP7 after 24h exposure to poplar roots. Finally, data sets obtain during this internship contributes in understanding and modelling genes mechanisms involved in *L. bicolor* ECM development.

Key words : *L.bicolor*, *biomass*, *growth*, *morphology*, *rutin*, *quercetin*, *root exudates*, *RT-qPCR*, *MiSSPs*