

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-theses-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 <u>http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php</u> <u>http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm</u>





Université de Lorraine, Collegium Sciences et Technologies Ecole Doctorale «Ressources, Procédés, Produits, Environnement»

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

en Biologie Végétale et Forestière

Par Clément Pellegrin

ANALYSE D'EFFECTEURS DU CHAMPIGNON ECTOMYCORHIZIEN *LACCARIA BICOLOR* : APPROCHES BIO-INFORMATIQUES ET FONCTIONNELLES

Soutenance publique prévue le 26 avril 2016

Membres du jury :

Eric Gelhaye, Professeur, Université de Lorraine	Examinateur
Christophe Roux, Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse	Rapporteur
Marie-Noëlle Rosso, Chargé de Recherche, INRA Aix-Marseille	Rapporteur
Elodie Gaulin, Maitre de Conférences, Université Paul Sabatier, Toulouse	Examinatrice
Claire Veneault-Fourrey, Maitre de Conférences, Université de Lorraine	Co-Directrice de thèse
Francis Martin, Directeur de Recherche, INRA Nancy-Lorraine	Directeur de thèse
Unité Mixte de Recherche 1136 INRA/Université de Lorraine Interaction Arbres-Microorganismes	

Centre INRA de Nancy 54280 Champenoux

« Fais de cette maxime ta devise : Rien sans peine, rien sans persévérance, rien sans énergie. »

Henri-Frédéric Amiel ; Journal intime, le 18 octobre 1864.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté de lire et juger ce travail.

Je souhaite ensuite remercier mes deux directeurs de thèse, Claire Veneault-Fourrey et Francis Martin, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de leur laboratoire. Merci pour ce sujet passionnant et tous ce que vous m'avez appris.

Merci à Arnaud Hecker pour m'avoir fait découvrir le monde plus ou moins structuré des protéines.

Merci à Alex Kriznik (SCBIM, Nancy) pour m'avoir fait découvrir le dichroïsme circulaire et la microcalorimétrie, et plus généralement les joies de la biophysique.

Merci à Isabelle Fudal et Gilles Gay d'avoir été dans mon comité de thèse. Mention spéciale à Gilles pour m'avoir donné le goût de la recherche en M1 et M2.

Merci à Anne Imberty et Emilie Gillon (CerMaV, Grenoble) pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire pendant une semaine et fait découvrir la glycobiologie.

Merci à François Jobert pour son travail sur le rBiFC et les tests en levure. Je ne pouvais espérer meilleur Master 2 et je suis content de te savoir bien dans ta thèse.

Merci à Emmanuelle "Manue" Morin, patronne de la bio-informatique. Tes scripts python et les bons moments de déconne vont me manquer.

Merci à Frédérique "Fred" Guinet pour l'aide apportée et m'avoir fait passer du microscope optique à miroir au microscope confocal à balayage laser. La science de l'ombre !

Merci à Patrice pour les tabacs, à Christine pour les commandes (et les séances de ménages), à Béa pour son franc parler, à Jean-Louis pour ses bricolages, à Cyril pour son humour et à tout le personnel administratif pour leur efficacité et leur gentillesse!

Merci plus généralement à l'ensemble de l'équipe d'Ecogénomique des interactions que j'ai pu côtoyer au cours de ces 3 années. Ce fût un plaisir de travailler avec vous. Merci aussi au bâtiment du LEGF pour toutes les surprises gratuitement offertes.

Merci tout particulièrement à Laure (la blouse la plus badass du labo), Cora (pense à dormir et manger...), Yannick (un jour je t'aurai à la course...un jour), Océane (a survécu à 1 an et demi dans le même bureau que moi, bravo....), Matthieu, Joske, Yohann (pour tous les weeks end au labo, les courses d'obstacles, les gateaux, la positive attitude inébranlable), Clémence (Machine !), Cécile (Miss Poney), François M (pas touche à mon bureau), Leti (*Clémond Ferrand !!*), Héma, Laura et tous les étudiants sympas que j'ai eu le plaisir de côtoyer durant cette thèse. Les bons moments passés ensemble ont été un soutien pendant toute la durée de ce projet.

Merci enfin à ma famille pour m'avoir soutenu toutes ces années.

Liste des Figures, Encadré

Figure 1 : Différences morphologiques entre ectomycorhizes et endomycorhizes

Figure 2 : Structures d'interactions caractéristiques de l'ectomycorhize

 Tableau 1 : Définitions des termes utilisés dans ce manuscrit en rapport avec la notion d'effecteurs.

Figure 3 : Détection des PAMPs par les récepteurs PRR associés

Figure 4 : Interaction entre les domaines LysM de l'effecteur Ecp6 et un tetramère de chitine

Figure 5 : Inhibition de l'activité protéasique par les effecteurs de pathogènes

Figure 6 : Processus d'invasion de l'hôte chez les champignons pathogènes et mutualistes

Figure 7 : Diversité de cibles chez les effecteurs de microorganismes pathogènes filamenteux

Figure 8 : Régulation des voies hormonales par le protéasome 26S

Figure 9 : Analyses fonctionnelles précédemment menées sur les MiSSPs de L. bicolor

Encadré 1 : Objectif de mon projet de thèse

Figure 10 : Laccaria bicolor et ses hôtes végétaux.

Figure 11 : Localisation de MiSSP8 synthétique couplée au FAM après incubation avec des racines de peuplier *P. tremula x P. alba*

Figure 12 : Composition de la paroi des cellules végétales et fongiques

Figure 13 : Vérification des interactants de MiSSP8 par la technique du rBiFC

Figure 14 : Localisation subcellulaire *in planta* de la protéine MiSSP8

Figure 15 : Recherche d'interactants polysaccharidiques de MiSSP8 par crible d'une puce à glycanes

Figure 16 : Fixation de la protéine MiSSP8 à des polysaccharides fongiques ou végétaux

Figure 17 : Mesure du pouvoir antimicrobien de MiSSP8

Figure 18 : Perspectives dans l'analyse fonctionnelle de MiSSP8

Figure 19 : Bilan des informations obtenues sur les MiSSPs de *L. bicolor* au cours de cette thèse

Figure 20 : Localisations potentielles des MiSSPs de L. bicolor

Figure 21 : Perspectives dans l'analyse des MiSSPs

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique Aqua : Aquaporine **ARN** : Acide Ribonucléiques ARNi : ARN interférent BiFC : complémentation de fluorescence bimoléculaire Cap64 : Capsule associated protein (Protéine associé à la capsule) CAZymes : Carbohydrate Active enZymes **CEBiP** : Chitin Elicitor Binding Protein **CERK : Chitin Elicitor Receptor Kinase** Co-IP : Co-immunoprécipitation in planta CRN : Crinkler DO : Densité Optique DWRR : Aspartate-Tryptophane-Arginine-Arginine ECM : Ectomycorhize ExM : Mycélium extramatriciel (Extraradical mycelium) FB : Fruiting body (carpophore) FLM : Mycélium en culture pure (Free living mycelium) GFP : Protéine de fluorescence verte (Green Fluorescent Protein) H: heure Hpi: heures post infection HR : réponse hypersensible (hypersensitive response) IPTG : isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside kDa : kiloDalton LB : Luria Bertani MAMP : Patron moléculaire associé au microorganisme MiSSP : Mycorrhiza induced Small Secreted Protein (Petites protéines induites par la mycorhize) mL : millilitre NCBI : National Center for Biotechnology Information NLS : Signal de localisation nucléaire **ORNL** : Oak Ridge National Laboratory PRR : Pathogenesis Related Receptor RFP : Protéine de fluorescence rouge (Red Fluorescent Protein) RGD : Arginine-Glycine-Acide aspartique Rpm : rotation par minute RXLR : Arginine-X-Leucine-Arginine (X = n'importe quel acide aminé) SSPs : Small secreted proteins (Petites protéines sécrétées) ug : microgramme uL : microlitre um · micromètre USP : Universal Stress Protein YEB : Yeast Extract Beef extract

Remerciements	5
Liste des Figures, Encadre	7
Liste des abreviations	8
Avant-propos	13
Chapitre I	15
Etude bibliographique	15
La symbiose mycorhizienne	17
1. Présentation générale	17
2. Structures caractéristiques de la symbiose ectomycorhizienne	19
1. Le réseau extramatriciel	19
2. Le manteau fongique	20
3. Le réseau de Hartig	21
3. Références	23
4. Mécanismes de signalisation au cours de la symbiose ectomycorhizienne	27
"Molecular signaling during the ectomycorrhizal symbiosis"	29
Abstract	29
Introduction	
II. The Ectomycorrhizal Symbiosis Setup	
A. The presymbiotic phase	
1. Plant rhizospheric compounds are preparing ECM fungi for infection	
2. ECM fungal-derived signaling molecules alter host root architecture and develo	pment.
33	I
a) Fungal auxin as an early diffusible signaling molecule.	
b) ECM fungi produce volatile organic compounds as signaling molecules to stimulate	ateral
roots development	
B. Control of plant hormone signaling pathways in later stages of ECM develop	nent
35	
1. Auxin	
2. Ethylene	
3. Jasmonic-acid	
III. Secreted fungal effectors, central players in controlling symbiosis developme	nt?.39
A. The effector concept	
B. Mycorrhiza-induced Small Secreted Proteins: the symbiotic effectors?	
IV. Perspectives and future research	
References	43
5 Les effecteurs	57
1 Les effecteurs anonlastiques	57
 Les effecteurs cytonlasmiques 	
3 Ouid des effecteurs chez les symbiotes ?	66
6. Références	
Chapitre II	
•	71
Objectifs de thèse	71 71

	1. Y-a t-il des différences entre le sécrétome des champignons ECM et le sécréto	ome des
	champignons saprotrophes? Que représentent les SSPs dans ces sécrétomes ? Exi	ste t-il des SSPs
	partagées entre champignons saprotrophes et ectomycorhiziens	
	2. Où sont localisés les MiSSPs de <i>L. bicolor</i> dans la cellule végétale ?	
D (3. Quel est l'interactant de MISSP8 ? D'ou provient son motif repete ?	
Pres	entation du modele d'étude	
1.	Populus trichocarpa	
2.	Pseudotsuga menziesii	
3.	Laccaria bicolor	79
4.	Références	80
Chapit	re III	85
Analys	e comparative de sécrétomes de champignons ectomycorhiziens	s et
saprot	rophes	
Publ	ication n°1	
"Con smal	nparative analysis of secretomes from ectomycorrhizal fungal with an Il-secreted proteins"	emphasis on 87
Chapit	re IV	105
Localis	sation subcellulaire <i>in planta</i> d'effecteurs candidats sécrétés par	le
champ	ignon ectomycorhizien <i>Laccaria bicolor</i>	
Publ	ication n°2	
'Can	didate effector proteins from the mutualistic fungus <i>Laccaria bicolor</i> c	an target
disti	nct subcellular plant compartments'	
Chapit	re V	121
Contri	bution à l'analyse fonctionnelle de MiSSP8, un effecteur candidat	t nécessaire
à la sy	mbiose ectomycorhizienne	121
Part	ie I. MiSSP8 est lié à des protéines présentes chez les champignons sap	orotrophes
Publ	ication n°3	
'A sn	nall-secreted protein from <i>Laccaria bicolor</i> is required for ectomycorr	hizal
sym	biosis and contains a motif found in proteins from saprotrophic fungi.	
Intro	oduction	
Meth	10ds	
Resi	llts	
Disc	ussion	
Ackr	nowledgments	141
Refe	rences	142
Part	ie II. A la recherche de l'interactant de MiSSP8	157
1	Introduction	
1.	Dácultata	
Ζ.	Absonce d'interactions entre MiSSDO et les protéines condidates détectées re	
	and the second s	
	2 Localisation subcellulaire de MiSSP8 en feuilles de tabace	
	 Bocansation subcontaine de MISSE o en leunes de tabacs	
	4. MiSSP8 a-t-elle une activité antimicrohienne ?	
3	Conclusion et discussion	167
5.	1 L'utilisation du rBiEC n'a pas parmis de confirmer les interactants protéiques	do MiSSD8167

	2. MiSSP8::GFP est présent dans des amas de la membrane plasmique et co-localise	
	partiellement avec les plasmodesmes.	
	3. MiSSP8 n'interagit pas avec les principaux sucres des parois fongiques et végétales	s 169
	4. MiSSP8 ne possède pas d'activité antimicrobienne	170
	5. Perspectives sur MiSSP8	171
Chapit	re VI	177
Discus	sion générale et perspectives	177
1.	Les effecteurs: une stratégie de communication partagée par tous les champig 180	nons ?
	1. Les effecteurs de symbiose : quelle origine ?	
	2. Les MiSSPs sont-elles toutes des effecteurs de symbiose ?	
	3. Existe-t-il des effecteurs chez d'autres champignons ectomycorhiziens?	
2.	De l'identification de candidats à la fonction biologique	
	1. Contraintes actuelles dans l'étude des MiSSPs chez <i>L. bicolor</i>	
	2. L'effectoromique comme approche moyen débit pour l'analyse des effecteurs ?	
3.	Perspectives dans l'analyse fonctionnelle des MiSSPs de L. bicolor	
	1. Multiples nuances de MiSSPs	
	2. Quelles MiSSPs analyser à court terme ?	
	3. Vers une approche intégrative dans l'analyse des MiSSPs ?	190
Annexe	2	195
Anne	exe 1	198
Anne	exe 2 - Localisation subcellulaire <i>in planta</i> de MiSSP8 sous forme mature (i	.e, sans
signa	al peptide)	202
Anne	exe 3 - Bilan des activités (communications orales, posters, formations)	203
Anne	exe 4 - Validation du système rBiFC	205
Anne	exe 5 – Western Blot du rBiFC	206
Anne	exe 6 – Recherche d'interactants lipidiques par puces à lipides	207
Fiche	e technique 1	208
Fiche	e technique 2	211
Fiche	e technique 3	213
Fiche	e technique 4	214

Avant-propos

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe Ecogénomique des interactions appartenant à l'Unité Mixte de Recherche (UMR) 1136 INRA-Université de Lorraine "Interactions Arbres Microorganismes". Au sein de l'équipe Ecogénomique des interactions, la symbiose ectomycorhizienne est étudiée selon deux axes de recherches principaux. Les approches de génomique comparative et d'analyse phylogénomique cherchent à déchiffrer l'émergence et l'évolution des champignons ectomycorhiziens. Ces approches ont aussi pour objectif d'identifier les boites à outils requise pour l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne. Le second axe de recherche consiste à identifier et caractériser au niveau moléculaire le développement de la symbiose ectomycorhizienne, plus précisément le dialogue moléculaire présent entre le champignon et l'hôte. Cet axe de recherche s'appuie sur le modèle d'étude constitué par le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor* et deux hôtes végétaux, le peuplier *Populus trichocarpa* et le sapin de Douglas *Pseudotsuga menziesii*.

Chapitre I

Etude bibliographique



Figure 1 : **Différence morphologique entre ectomycorhizes et endomycorhizes**. (A) Les champignons endomycorhiziens utilisent un organe spécialisé, l'hyphopodium, pour pénétrer dans les cellules rhizodermiques puis corticales. Dans ces dernières, la membrane plasmique s'invagine autour des hyphes fongiques, formant l'arbuscule. (B) Les champignons ectomycorhiziens se développement uniquement dans l'espace apoplastique autour des cellules du cortex racinaire en formant un réseau dense de mycélium faisant office d'interface symbiotique avec l'hôte. Tiré de Bonfante & Genre, 2010.

La symbiose mycorhizienne

Présentation générale

La symbiose mycorhizienne consiste en une interaction mutualiste entre un champignon du sol et le système racinaire d'une plante. Les premiers fossiles de champignons attestant de l'existence d'une telle symbiose sont âgés de 400 Millions d'années (Rémy, 1994), suggérant un rôle de cette symbiose dans l'apparition des premières plantes terrestres (Simon et al, 1993 ; Wang et al, 2010). Plusieurs types de symbioses mycorhiziennes ont été rapportés, les deux principaux étant la symbiose endomycorhizienne et la symbiose ectomycorhizienne, apparue plus récemment d'après les dernières datations effectuées (vers 120 Millions d'années, Brundrett, 2002). La symbiose mycorhizienne à arbuscules se différencie de la symbiose ectomycorhizienne sur plusieurs aspects.

Les champignons endomycorhiziens à arbuscules constitue un groupe monophylétique, les Gloméromycètes (Schussler et al, 2001) à l'inverse des champignons ectomycorhiziens qui constitue un groupe polyphylétique (Hibbett et al, 2000; Köhler et al, 2015). Les symbiontes mycorhiziens à arbuscules sont des biotrophes obligatoires incapable de croître en absence de l'hôte, contrairement aux symbiontes ectomycorhiziens cultivables en laboratoire bien que toujours dépendant de l'hôte pour réaliser leur cycle sexuel. Les hôtes végétaux ne sont pas non plus les mêmes, la symbiose endomycorhizienne implique les plantes herbacées ainsi que certains arbres (Eucalyptus, Jones et al, 1998; Peuplier, Lingua et al, 2008; Frênes, cyprès, érable, tuyas) et des plantes d'intérêt agronomique (Gosling et al, 2016 ; Sawers et al, 2008). A l'inverse, la symbiose ectomycorhizienne est présente essentiellement dans les écosystèmes forestiers (Wang et al, 2006). Enfin, les champignons ectomycorhiziens ne pénétrent jamais la paroi végétale et se développe autour des cellules présentes dans le cortex racinaire, sans atteindre l'endoderme (Figure 1A). A l'inverse, la symbiose endomycorhizienne à arbuscules se caractérise par la colonisation du cortex racinaire avec une pénétration de la paroi des cellules végétales, la membrane plasmique s'invaginant autour des hyphes des champignons, aboutissant à une structure en arbuscule permettant l'échange avec la plante (Figure 1B). Ces deux symbioses présentent donc des différences en termes d'hôtes, de phylogénie et de processus de colonisation. La symbiose ectomycorhizienne se traduit concrètement par la mise en place de trois structures d'interaction fonctionnant de concert afin de capter puis transmettre les nutriments du sol jusqu'aux racines de la plante.



Figure 2 : Structures d'interactions caractéristiques de l'ectomycorhize. Les différentes phases aboutissant à l'interaction entre le champignon ectomycorhizien et sa plante hôte passent par la différenciation de structures permettant cette interaction. Le réseau extramatriciel (A, détail de l'hyphe en B) se propage dans le sol à la recherche d'un hôte végétal et de nutriments destinés à être transférés à la plante. Le réseau extramatriciel reste connecté au manteau fongique (C, vue longitudinale; D, vue transversale) qui entoure l'intégralité de la racine latérale courte. Le réseau de Hartig (D) se développe entre les cellules du cortex racinaire et constitue la surface d'échange de nutriments. Certains champignons ectomycorhiziens, tel que *Laccaria bicolor*, conservent néanmoins leurs capacités à croitre en absence de l'hôte, les rendant cultivable en laboratoire. Adapté de Bonfante & Genre, 2010; mycor.nancy.inra.fr

Structures caractéristiques de la symbiose ectomycorhizienne

Durant l'interaction avec le réseau racinaire de l'arbre, les champignons ectomycorhiziens vont développer trois structures, permettant l'échange bi-directionnel de nutriments : le réseau extramatriciel, le manteau fongique et le réseau de Hartig. Ces deux dernières structures caractérisent la symbiose ectomycorhizienne et la différencie des autres types de mycorhizes existants.

Le réseau extramatriciel

Le réseau extramatriciel n'est pas propre à la symbiose ectomycorhizienne et se retrouve aussi dans les mycorhizes à arbuscules et les mycorhizes à éricoides (Finlay, 2008). Ce réseau d'hyphes se développe dans la rhizosphère et n'est pas en contact direct avec la plante (Figure 2A) et assure un rôle prépondérant dans l'acquisition de ressource minérale via la production d'acides organiques (Landeweert et al, 2001 ; Schmalenberger et al, 2015 ; van Hees et al, 2006) tel que l'acide oxalique permettant un relargage de phosphore (Bonneville et al, 2011) et d'enzymes de décomposition telles que des laccases ou des aminopeptidases (Finlay et al, 2008; Shah et al, 2013). Chez les champignons ectomycorhiziens, cette capacité de décomposition est reliée à la quantité de réseau extramatriciel présent (Tedersoo et al, 2012). Cette production forte d'enzymes permet de contribuer significativement aux processus de recyclage du carbone (Phillips et al, 2014 ; Hôgberg & Hôgberg, 2002) ainsi qu'au recyclage de l'azote (Bödeker et al, 2014 ; Morel et al, 2005), l'assimilation étant relié à la quantité de carbone fournit par la plante (Rineau et al, 2013). Le réseau extramatriciel joue aussi un rôle dans le stockage des photosynthats provenant de la plante, l'utilisation de photosynthats marqué au carbone 14 (¹⁴C) révélant entre 24% et 60% de carbone marqué incorporé dans le réseau extramatriciel (Wu et al, 2002 ; Rosling et al, 2004). Une expérience similaire indique aussi un transfert de carbone et de phosphore à travers les hyphes du réseau extramatriciel dès le premier jour de présence de ¹⁴C avec une présence maximale après deux à trois jours (Wu et al, 2012). Ceci démontre que les champignons ectomycorhiziens ne sont pas des saprotrophes au sens strict car leurs capacités de dégradation dépendent des photosynthats fournis par la plante. Le réseau extramatriciel n'est pas uniquement un organe de sécrétion d'enzymes lytiques mais aussi un organe de stockage et de transfert (Wu et al, 2012). Il est enfin aussi impliqué dans la prospection du sol afin de trouver de nouveaux hôtes végétaux à coloniser (Genney et al, 2006), plusieurs types d'hyphes extramatriciel pouvant être discernés selon leur fonction dans l'exploration du sol (Agerer, 2001).

Le manteau fongique

Une fois en contact avec la surface racinaire, le réseau mycélien va se développer tout autour de la racine pour former un manteau fongique dense constitué de plusieurs couches de cellules (Pena et al, 2014). La densité du manteau fongique varie d'un champignon ECM à l'autre, mais elle a pu être estimé par FTIR (Fournier Transformed Infrared Spectroscopy) entre 2 et 20 micromètres (Pena et al, 2014). Une autre étude utilisant le marquage isotopique au ¹⁵N et ¹³C indique que le manteau représente entre 30 et 40% de la quantité totale de la racine mycorhizée (Tedersoo et al, 2012). Les racines ainsi colonisées sont en arrêt de croissance, phénotype caractéristique des mycorhizes matures. La localisation subcellulaire d'éléments nutritifs chez Lactarius subdulcis a montré une accumulation préférentielle dans le manteau fongique de Ca, Mg, Mn, K, Si, Al et Fe (Rineau et al, 2010). Ces études démontrent que le manteau fongique est utilisé comme zone de stockage de nutriments avant leur transfert aux cellules de la racine. Une variabilité existe entre les espèces de champignons ectomycorhiziens concernant la proportion des éléments nutritifs stockés dans le manteau fongique, probablement en raison d'une adaptation des champignons ectomycorhiziens à leurs biotopes et leurs plantes hôtes (Seven & Polle, 2014). La microdissection laser des tissus composant le manteau fongique suivie de l'analyse transcriptomique de ces tissus chez la truffe du Périgord Tuber melanosporum met en évidence que parmi les 266 gènes significativement surexprimés (>2.5 fois par rapport au contrôle) dans le manteau se trouvent 11 gènes codant des transporteurs d'urée, d'ammonium et des aquaporines ainsi qu'un transporteur de fer et plusieurs protéines de choc thermique HSP (heat shock proteins) suspectées d'être impliquées dans les processus de détoxification (Hacquard et al, 2010). Certains ions métalliques peuvent aussi être transportés à l'hôte via le réseau de Hartig afin d'être utilisés comme éléments nutritifs (Luo et al, 2014). Jusqu'à présent, peu de transporteurs de métaux lourds ont été analysés chez les champignons ectomycorhiziens (Bellion et al, 2007), bien que deux transporteurs de métaux impliqués dans la tolérance au zinc aient été caractérisés fonctionnellement chez le symbiote éricoïde Oidodendron maïus (Khouja et al, 2013).

On sait peu de choses sur les processus moléculaires qui se produisent lors de l'adhésion de l'hyphe à la racine de la plante, pourtant un processus clé pour l'établissement de l'interaction. Chez les ectomycorhizes d'*Eucalyptus globulus-Pisolithus*,

une classe de polypeptides induits par la symbiose SRAP (symbiosis-regulated acidic polypeptide) a été identifiée par analyse biochimique par éléctrophorèse bi-directionelle 2D-PAGE. Les SRAP sont potentiellement impliquées dans l'adhésion cellule-cellule, probablement via un motif RGD conservé chez les protéines d'eucaryotes et de procaryotes et impliqué dans l'adhérence cellulaire (Laurent et al, 1999; Dyer, 2002). En outre, les hydrophobines semblent impliqués dans l'adhésion des hyphes à la surface de la racine, bien que leur fonction exacte dans la symbiose ectomycorhizienne restent peu claires. Les hydrophobines sont de petites protéines sécrétées (SSPs), riches en cystéine, avec des propriétés amphiphiles présente de manière ubiquiste chez les champignons (Linder et al, 2005; Zhang et al, 2011; Bayry et al, 2012). Leurs implications dans des fonctions associées telle que l'attachement au surface ou la formation de structures aériennes (Wösten et al, 2001) et leur présence à plusieurs étapes du cycle de vie fongique démontrent la polyvalence de cette classe de petits-protéines sécrétées. Dans l'ectomycorhize, des études génomiques et transcriptomiques ont identifiées des génes codants des hydrophobines, aux différents stades de developpements et dans les différentes structures développées par le champignon ectomycorhizien (Plett et al, 2012; Mankel et al, 2002). Cependant, des immunolocalisations de ces protéines dans des ectomycorhizes de P. tinctorius-E. globulus n'a pas trouvé d'accumulation préférentielle d'hydrophobines dans un compartiment particulier pendant la colonisation (Tagu et al, 2001). Ce résultat soutient l'idée que les hydrophobines sont importantes pour la colonisation fongique en raison des propriétés physiques qu'elles fournissent aux hyphes fongiques.

Le réseau de Hartig

Après la colonisation de la surface de la racine à travers le développement du manteau fongique, les champignons ectomycorhiziens développent une interface symbiotique avec leur hôte. Cette interface est nécessaire pour l'échange de nutriments entre les deux partenaires. La formation du réseau de Hartig a d'abord été largement analysée par des approches microscopiques et cytologiques (Scheidegger & Brunner, 1993; Kottke et al, 1987; Kottke & Oberwinkler, 1987; Blasius et al, 1986). Ces études décrivent un réseau dense de mycélium fortement ramifié exclusivement localisé autour des cellules de la racine de la plante (Figure 2C). Cette localisation est une caractéristique du réseau de Hartig, contrastant avec les champignons endomycorhiziens qui créent des arbuscules à l'intérieur des cellules de la racine par invagination de la membrane plasmique (résumé dans Gutjahr & Parniske, 2013). Ce mycélium dit « labyrinthique » permet un transfert efficace entre la plante et le champignon,

probablement grâce à sa forte surface d'échange. Il permet également l'établissement d'un dialogue moléculaire entre la plante et le champignon à travers l'expression de gènes codant des enymes de types glycosyl hydrolases, beta glucosidase et endoglucanase potentiellement essentielles dans le remodelage des parois (Hacquard et al. 2010). Cette structure agit aussi comme puits de carbone et dans la conversion des photosynthétats de la plante en tréhalose chez le symbionte Amanita muscaria (Lopez et al, 2007). Dans cette étude, la concentration en tréhalose était 2.7 fois plus importante dans le réseau de Hartig par rapport au reste de l'ectomycorhizes (Lopez et al, 2007). En outre, la biosynthèse du tréhalose, identifiés par la présence de transcrits de gènes encodant des tréhalose-6-phosphate synthase, tréhalose phosphorylase-6-phosphate et tréhalose-6-phosphate phosphatase, est spécifiquement stimulée dans le réseau de Hartig. De même, chez Tuber melanosporum, trois gènes codant des transporteurs de glucose sont fortement régulés pendant la symbiose avec Corvlus avellana (noisettier commun), ainsi qu'un gène fongique codant une invertase responsable de la conversion du saccharose en glucose et fructose (Hacquard et al, 2010). Le réseau de Hartig est aussi impliqué dans le transport d'azote, comme en atteste la surexpression de deux transporteurs de nitrates chez T.melanosporum (Lucic et al, 2008; Montanini et al. 2006). Ces données révèlent une double implication du réseau de Hartig dans l'ectomycorhize à la fois comme acteur du dialogue moléculaire nécessaire à l'établissement de la symbiose mais aussi au fonctionnement même de la symbiose via notamment le transport d'azote et de phosphore destiné à la plante. Il est toutefois à noter que l'étude comparée du réseau de Hartig et du manteau fongique montre que 93% des gènes sont constitutivement exprimés dans ces deux zones (Hacquard et al, 2010). Il existe donc des spécificités propres au réseau de Hartig et au manteau fongique mais les deux zones possédent le même arrière plan métabolique.

En conclusion, l'ectomycorhize consiste en la différenciation de plusieurs structures spécialisées qui communiquent entre elles. La compréhension des processus de signalisation à l'œuvre lors de la symbiose est nécessaire avant d'aborder le rôle des petites protéines sécrétées de *L. bicolor*.

Références

- Agerer, R. 2001. Exploration types of ectomycorrhizae: A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. Mycorrhiza. 11:107–114
- Bayry, J., Aimanianda, V., Guijarro, J. I., Sunde, M., and Latgé, J. P. 2012. Hydrophobinsunique fungal proteins. PLoS Pathog. 8:6–9
- Bellion, M., Courbot, M., Jacob, C., Guinet, F., Blaudez, D., and Chalot, M. 2007. Metal induction of a Paxillus involutus metallothionein and its heterologous expression in Hebeloma cylindrosporum. New Phytol. 174:151–158
- Blasius, D., Feil, W., Kottke, I., and Oberwinkler, F. 1986. Hartig net structure and formation in fully ensheathed ectomycorrhizas. Nord. J. Bot. 6:837–842
- Bodeker, I. T. M., Clemmensen, K. E., de Boer, W., Martin, F., Olson, Ike, and Lindahl, B. D. 2014. Ectomycorrhizal Cortinarius species participate in enzymatic oxidation of humus in northern forest ecosystems. New Phytol. 203:245–256
- Bonneville, S., Morgan, D. J., Schmalenberger, A., Bray, A., Brown, A., Banwart, S. A., and Benning, L. G. 2011. Tree-mycorrhiza symbiosis accelerate mineral weathering: Evidences from nanometer-scale elemental fluxes at the hypha-mineral interface. Geochim. Cosmochim. Acta. 75:6988–7005
- Brundrett, M. C. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. New Phytol. 154:275–304
- Dyer, P. S. 2002. Hydrophobins in the lichen symbiosis. New Phytol. 154:1-4
- Finlay, R. D. 2008. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: With special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. Pages 1115–1126 in: Journal of Experimental Botany,
- Genney, D. R., Anderson, I. C., and Alexander, I. J. 2006. Fine-scale distribution of pine ectomycorrhizas and their extramatrical mycelium. New Phytol. 170:381–390
- Gosling, P., Jones, J., and Bending, G. D. 2016. Evidence for functional redundancy in arbuscular mycorrhizal fungi and implications for agroecosystem management. Mycorrhiza. 26:77–83
- Gutjahr, C., and Paszkowski, U. 2013. Multiple control levels of root system remodeling in arbuscular mycorrhizal symbiosis. Front. Plant Sci. 4:204
- Hacquard, S., Tisserant, E., Brun, A., Legué, V., Martin, F., and Kohler, A. 2013. Laser microdissection and microarray analysis of Tuber melanosporum ectomycorrhizas reveal functional heterogeneity between mantle and Hartig net compartments. Environ. Microbiol. 15:1853–1869
- Van Hees, P. A. W., Godbold, D. L., Jentschke, G., and Jones, D. L. 2003. Impact of ectomycorrhizas on the concentration and biodegradation of simple organic acids in a forest soil. Eur. J. Soil Sci. 54:697–706
- Hibbett, D. S., Gilbert, L. B., and Donoghue, M. J. 2000. Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. Nature. 407:506–8
- Högberg, M. N., and Högberg, P. 2002. Extramatrical ectomycorrhizal mycelium contributes one-third of microbial biomass and produces, together with associated roots, half the dissolved organic carbon in a forest soil. New Phytol. 154:791–795
- Jones, M. D., Durall, D. M., and Tinker, P. B. 1998. A comparison of arbuscular and ectomycorrhizal Eucalyptus coccifera : Growth response, phosphorus uptake efficiency and external hyphal production. New Phytol. 140:125–134
- Khouja, H. R., Abbà, S., Lacercat-Didier, L., Daghino, S., Doillon, D., Richaud, P., Martino, E., Vallino, M., Perotto, S., Chalot, M., and Blaudez, D. 2013. OmZnT1 and OmFET, two metal transporters from the metal-tolerant strain Zn of the ericoid mycorrhizal

fungus Oidiodendron maius, confer zinc tolerance in yeast. Fungal Genet. Biol. 52:53–64

- Kohler, A., Kuo, A., Nagy, L. G., Morin, E., Barry, K. W., Buscot, F., Canbäck, B., Choi, C., Cichocki, N., Clum, A., Colpaert, J., Copeland, A., Costa, M. D., Doré, J., Floudas, D., Gay, G., Girlanda, M., Henrissat, B., Herrmann, S., Hess, J., Högberg, N., Johansson, T., Khouja, H., Labutti, K., Lahrmann, U., Levasseur, A., Lindquist, E. a, Lipzen, A., Marmeisse, R., Martino, E., Murat, C., Ngan, C. Y., Nehls, U., Plett, J. M., Pringle, A., Ohm, R. a, Perotto, S., Peter, M., Riley, R., Rineau, F., Ruytinx, J., Salamov, A., Shah, F., Sun, H., Tarkka, M., Tritt, A., Veneault-fourrey, C., Zuccaro, A., Genomics, M., Consortium, I., and Tunlid, A. 2015. Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. Nat. Genet. 47:410–415
- Kottke, I., and Oberwinkler, F. 1987. The cellular structure of the Hartig net: coenocytic and transfer cell-like organization. Nord. J. Bot. 7:85–95
- Landeweert, R., Hoffland, E., Finlay, R. D., Kuyper, T. W., and Van Breemen, N. 2001. Linking plants to rocks: Ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. Trends Ecol. Evol. 16:248–254
- Laurent, P., Voiblet, C., Tagu, D., de Carvalho, D., Nehls, U., De Bellis, R., Balestrini, R., Bauw, G., Bonfante, P., and Martin, F. 1999. A novel class of ectomycorrhiza-regulated cell wall polypeptides in Pisolithus tinctorius. Mol. Plant. Microbe. Interact. 12:862–871
- Linder, M. B., Szilvay, G. R., Nakari-Setälä, T., and Penttilä, M. E. 2005. Hydrophobins: The protein-amphiphiles of filamentous fungi. FEMS Microbiol. Rev. 29:877–896
- Lingua, G., Franchin, C., Todeschini, V., Castiglione, S., Biondi, S., Burlando, B., Parravicini, V., Torrigiani, P., and Berta, G. 2008. Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect the response to high zinc concentrations of two registered poplar clones. Environ. Pollut. 153:137–147
- López, M. F., M"anner, P., Willmann, A., Hampp, R., and Nehls, U. 2007. Increased trehalose biosynthesis in Hartig net hyphae of ectomycorrhizas. New Phytol. 174:389–398
- Lucic, E., Fourrey, C., Kohler, A., Martin, F., Chalot, M., and Brun-Jacob, A. 2008. A gene repertoire for nitrogen transporters in Laccaria bicolor. New Phytol. 180:343–364
- Luo, Z. Bin, Wu, C., Zhang, C., Li, H., Lipka, U., and Polle, A. 2013. The role of ectomycorrhizas in heavy metal stress tolerance of host plants. Environ. Exp. Bot. 108:47–62
- Mankel, A., Krause, K., and Kothe, E. 2002. Identification of a hydrophobin gene that is developmentally regulated in the ectomycorrhizal fungus Tricholoma terreum. Appl. Environ. Microbiol. 68:1408–1413
- Montanini, B., Viscomi, A. R., Bolchi, A., Martin, Y., Siverio, J. M., Balestrini, R., Bonfante, P., and Ottonello, S. 2006. Functional properties and differential mode of regulation of the nitrate transporter from a plant symbiotic ascomycete. Biochem. J. 394:125–134
- Morel, M., Jacob, C., Kohler, A., Johansson, T., Martin, F., Chalot, M., and Brun, A. 2005. Identification of genes differentially expressed in extraradical mycelium and ectomycorrhizal roots during Paxillus involutus-Betula pendula ectomycorrhizal symbiosis. Appl. Environ. Microbiol. 71:382–391
- Pena, R., and Polle, A. 2014. Attributing functions to ectomycorrhizal fungal identities in assemblages for nitrogen acquisition under stress. ISME J. 8:321–30
- Phillips, L. A., Ward, V., and Jones, M. D. 2014. Ectomycorrhizal fungi contribute to soil organic matter cycling in sub-boreal forests. ISME J. 8:699–713
- Plett, J. M., Gibon, J., Kohler, A., Duffy, K., Hoegger, P. J., Velagapudi, R., Han, J., Kües, U., Grigoriev, I. V, and Martin, F. 2012. Phylogenetic, genomic organization and

expression analysis of hydrophobin genes in the ectomycorrhizal basidiomycete Laccaria bicolor. Fungal Genet. Biol. 49:199–209

- Remy, W., Taylor, T. N., Hass, H., and Kerp, H. 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91:11841–11843
- Rineau, F., Rose, C., Le Thiec, D., and Garbaye, J. 2010. Liming in a beech forest results in more mineral elements stored in the mantle of Lactarius subdulcis ectomycorrhizas. Fungal Biol. 114:1007–1014
- Rineau, F., Shah, F., Smits, M. M., Persson, P., Johansson, T., Carleer, R., Troein, C., and Tunlid, a. 2013. Carbon availability triggers the decomposition of plant litter and assimilation of nitrogen by an ectomycorrhizal fungus. ISME J. :1–13
- Rosling, A., Lindahl, B. D., and Finlay, R. D. 2004. Carbon allocation to ectomycorrhizal roots and mycelium colonising different mineral substrates. New Phytol. 162:795–802
- Sawers, R. J. H., Gutjahr, C., and Paszkowski, U. 2008. Cereal mycorrhiza: an ancient symbiosis in modern agriculture. Trends Plant Sci. 13:93–97
- Scheidegger, C., and Brunner, I. 1993. Freeze-fracturing for low-temperature scanning electron microscopy of Hartig net in synthesized Picea abies-Hebeloma crustuliniforme and-Tricholoma vaccinum ectomycorrhizas. New Phytol. 123:123–132
- Schmalenberger, A., Duran, a L., Bray, a W., Bridge, J., Bonneville, S., Benning, L. G., Romero-Gonzalez, M. E., Leake, J. R., and Banwart, S. a. 2015. Oxalate secretion by ectomycorrhizal Paxillus involutus is mineral-specific and controls calcium weathering from minerals. Sci. Rep. 5:12187
- Schüβler, A., Schwarzott, D., and Walker, C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. Mycol. Res. 105:1413–1421
- Seven, J., and Polle, A. 2014. Subcellular nutrient element localization and enrichment in ecto- And arbuscular mycorrhizas of field-grown beech and ash trees indicate functional differences. PLoS One. 9
- Shah, F., Rineau, F., Canbäck, B., Johansson, T., and Tunlid, A. 2013. The molecular components of the extracellular protein-degradation pathways of the ectomycorrhizal fungus Paxillus involutus. New Phytol. 200:875–887
- Simon, L., Bousquet, J., Lévesque, R. C., and Lalonde, M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. Nature. 363:67–69
- Tagu, D., De Bellis, R., Balestrini, R., De Vries, O. M. H., Piccoli, G., Stocchi, V., Bonfante, P., and Martin, F. 2001. Immunolocalization of hydrophobin HYDPt-1 from the ectomycorrhizal basidiomycete Pisolithus tinctorius during colonization of Eucalyptus globulus roots. New Phytol. 149:127–135
- Tedersoo, L., Bahram, M., Toots, M., Diédhiou, A. G., Henkel, T. W., Kjoller, R., Morris, M. H., Nara, K., Nouhra, E., Peay, K. G., Polme, S., Ryberg, M., Smith, M. E., and Koljalg, U. 2012. Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. Mol. Ecol. 21:4160–4170
- Wang, B., and Qiu, Y. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. Mycorrhiza. :299–363
- Wang, B., Yeun, L. H., Xue, J. Y., Liu, Y., Ané, J. M., and Qiu, Y. L. 2010. Presence of three mycorrhizal genes in the common ancestor of land plants suggests a key role of mycorrhizas in the colonization of land by plants. New Phytol. 186:514–525
- Wosten, H. a. . 2001. HYDROPHOBINS : Multipurpose Proteins. Annu. Rev. Microbiol. 55:625–46
- Wu, B., Maruyama, H., Teramoto, M., and Hogetsu, T. 2012. Structural and functional interactions between extraradical mycelia of ectomycorrhizal Pisolithus isolates. New Phytol. 194:1070–1078

- Wu, B., Nara, K., and Hogetsu, T. 2002. Spatiotemporal transfer of carbon-14-labelled photosynthate from ectomycorrhizal Pinus densiflora seedlings to extraradical mycelia. Mycorrhiza. 12:83–88
- Zhang, S., Xia, Y. X., Kim, B., and Keyhani, N. O. 2011. Two hydrophobins are involved in fungal spore coat rodlet layer assembly and each play distinct roles in surface interactions, development and pathogenesis in the entomopathogenic fungus, Beauveria bassiana. Mol. Microbiol. 80:811–826

Mécanismes de signalisation au cours de la symbiose ectomycorhizienne

Molecular signaling during the ectomycorrhizal symbiosis

Clément Pellegrin, Francis Martin and Claire-Veneault-Fourrey

Chapitre rédigé pour la 3ème édition de "The Mycota Volume VIII: Biology of the the Fungal cell", edité par Steven D. Harris.

Molecular signaling during the ectomycorrhizal symbiosis

By Clément PELLEGRIN, Francis MARTIN & Claire VENEAULTFOURREY

UMR INRA/Université de Lorraine 1136 'Interactions Arbres/Microorganismes', Laboratoire d'excellence ARBRE, Centre INRA de Nancy-Lorraine, 54280 Champenoux (France)

Corresponding author: claire.fourrey@univ-lorraine.fr

Abstract

Ectomycorrhizal symbioses involve roots of trees and soil-borne fungi, which interact to create mutualistic interactions beneficial for both partners. This chapter gives an overview of the signaling pathways, molecules ans small secreted proteins required for the ontogenesis of such a remarkable symbiosis. Moreover, it explains how rising of next generation sequencing technology was used as an onset for functional studies. Notably, discovery of Mycorrhizal induced Small Secreted Proteins, similar to effectors from plant-pathogenic microbes and key players for symbiosis development, sheds light on a sophisticated molecular dialogue used by ectomycorrhizal fungi to control its plant host and set up this belowground symbiosis.

Introduction

Microbes are the most abundant forms of life on Earth. Microbial world diversity is remarkable, keeping challenging us after more than three hundreds years of research on it (Woyke & Rubin, 2014). This medley of microorganisms set in a wide range of ecosystems and creates complex interactions within its environment. Among them, thousands of microbial species either bacteria or fungi, inhabit the soil, either as organic and inorganic matter decayers, or as partners interacting with plant roots. They are key players for soil fertility, consequently sustaining plant productivity.

Around 50,000 fungal species interact with around 250,000 of plant species and form mycorrhiza (van der Heijden, 2015). Mycorrhiza is a symbiotic organ made of both fungal hyphae and plant root cells. Fully functional mycorrhizal symbioses allow bidirectional nutrient exchanges between the two partners. Consequences for the plant are an increased ability to overcome abiotic and biotic stresses like drought, polluted or poor soils as well as pathogen attacks (Sikes et al., 2009). One can distinguish seven different types of mycorrhizal symbiosis, varying in structure, host range and ecology. The most prevalent mycorrhizal fungi are the arbuscular fungi (AM). They all belong to Glomeromycota, a monophyletic group which appeared with the first land plants, about 400 millions years ago colonized herbaceous plants including several crop species (Parniske et al., 2008). Beside AM fungi stands the ectomycorrhizal symbioses which are the most prevalent mycorrhiza occurring in forest ecosystems. The ericoid mycorrhiza, another group involving health plant, including ornemental plant species (*i.e.* blueberry, cranberry) and fungi such as *Rhizoscyphus ericae* or *Oidiodendron maius*. Among other group of mycorrhizal fungi, one can cite the ectendomycorrhiza, monotropoid, orchid and arbutoid mycorrhiza.

The forest ecosystems are of major environmental, economic and scientific interests and is composed of a wide diversity of trees dominating boreal, temperate, mediterranean, and tropical environment. This diversity directly participates to functionning of forest ecosystems (Isbell et al., 2011), notably by efficient carbon sequestration through photosynthesis (Sedjo & Sohngen, 2012) but also water quality, wood production and protection against soil erosion. Thus, forest ecosystems play a major role in the global climate change context (Hanewinkel et al., 2013), stressing the urgent need to consider land management and tree diversity on a long-

term range (Foley et al., 2005). Mycorrhizal fungi play a critical role in forest ecosystems due to their ability to prospect large area of soils with their mycelia, forming a mycorrhizal network that may interconnect roots of trees together (Simard et al., 2012). Notably, about 6,000 of tree species (belonging to Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, Nothofagaceae, Myrtaceae and Dipterocarpaceae) are able to form a mycorrhizal symbiosis with 50,000 ectomycorrhizal (ECM) fungal species (van der Heijden, 2015). These ECM fungi participate in turnover of soil nutrients (C, N, P, K, Ca, Fe) through their extraradical mycelium (Marschner & Dell, 1994; Ekblad et al., 2013). The ECM symbiosis appeared several times independently in the history (van der Heijden et al., 2015; Ryberg & Matheny, 2012), about 150 millions years ago (Hibbett & Matheny, 2009) and differs significantly from the other mycorrhizal fungi in terms of symbiotic structures, their ecology and their phylogenic position in the fungal tree of life. Most of the ectomycorrhizal fungi belong to Basidiomycota, although some fungal species such as the Black Truffle of Perigord (*Tuber melanosporum*) belongs to Ascomycota (Martin et al., 2010). Realizing this prevalence in such ecosystems, it is then critical to decipher and analyze the molecular processes driving the symbiosis between these soil-borne fungi and their host plants in order to gain an accurate view on the molecular mechanisms occuring in forest ecosystem. For many years, studies on mycorrhizal mutualistic interactions have been limited by the lack of data on mycorrhizal fungal genomes. Availability of first mycorrhizal genomes and rising of Next Generation Sequencing (NGS) technology gave us access to hundreds of fungal genomes amongst them fifty ECM fungal genomes (Martin et al, 2008/2010/2011; Floudas et al, 2012; Kuo et al., 2014; Köhler et al, 2015; Marmeisse et al., 2013). In addition, NGS allow researchers to move on by looking at transcriptome and secretome of those beneficial symbionts. The purpose of this chapter is to give an overview on the ontogenesis of ectomycorrhizal symbiosis and to highlight how comparative genomics and molecular biology lead to reconsider mutualistic interactions, as an evolutionary habit sharing traits with saprotrophic and plant-pathogenic fungal species. We will focus in this review in (i) the understanding of fungal and plant signaling molecules guiding mycorrhizal interactions (ii) the identification of the underlying receptors and signaling pathways, with a particular emphasis on the control of hormone signaling pathways. We will finally adress the role of putative fungal effectors in the establishment and/or functioning of ECM symbiosis.

II. The Ectomycorrhizal Symbiosis Setup

A. The presymbiotic phase

1. Plant rhizospheric compounds are preparing ECM fungi for infection.

Perception and recognition of signal molecules produced by both trees and ECM fungi is a prerequisite for establishment of compatible ECM symbiosis. This presymbiotic phase allows the ECM fungus to sense and recognize a putative host partner. Search for host-derived signal-molecules able to stimulate spore germination, ECM hyphae branching and chemotropism towards host root led to the identification of only a limited number of compounds. Fries (1987) first demonstrates that root exudates and extracts from *Pinus sylvestris* (in particular abietic acid) stimulate germination of *Suillus* spp. basidiospores. During the initial stages of *in vitro* colonization of *Larix decidua* roots by *Suillus tridentinus*, flavonols such as catechin and epicatechin reached more than 50 mM and two minor metabolites, 4-hydroxybenzoate glucoside and quercetin rhamnoside, exhibited a rapid accumulation in the mycorrhiza root tip, suggesting a putative role for pre-infection steps (Weiss et al. 1997).

The presence of rutin in exudates of *Eucalyptus globulus* spp. *bicostata* stimulates radial growth and biomass of different *Pisolithus* sp. strains (Lagrange et al., 2001). However, only *Pisolithus* strains collected under rutin-producing *Eucalyptus* are receptive to rutin, suggesting, first, a putative role of flavonoids in specificity of host-fungal interaction and second, that ECM fungi are able to adapt to the chemical signature of the rhizosphere they are growing in. Using immunolocalization, Plett and Martin (2010) observed that rutin and quercitin at 100uM concentration are able to trigger the accumulation of the effector protein MiSSP7, suggesting that these two flavonols could prepare the ECM fungus for plant colonization. However, the high concentration required to trigger such MiSSP7 accumulation is not in favour with a role of flavonols as signal-molecules, at least in this specific case.

Strigolactones (SLs) are carotenoid-derived compound and a new group of plant hormones that suppress lateral shoot branching and are crucial to root development. In addition, their role as signaling molecules in the rizosphere is well documented. For example, SLs stimulate both spore germination and hyphal growth and branching of *Rhizophagus irregularis*. Analyses of available plant genomes and transcriptomes revealed that all analysed plants

contain genes required for strigolactone production (Delaux et al., 2012; reviewed in Garcia et al., 2015). However, so far, no effect of strigolactone analog GR24, on either fungal growth or hyphal branching was observed in a wide range of soil-borne fungi, including ECM fungi (Steinkellner et al., 2007).

Arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobia* nodulating bacteria produce upon perception of plant flavonoids or strigolactones, respectively Myc and Nod-factors, sulfated or not lipochitooligosaccharides (Maillet et al., 2011; Denarié and Cullimore, 1993). For now, such Myc-factors has not been identified in ECM fungi. We can wonder whether these Myc-factors exist among ECM fungi. Identification of such compounds would be a major achievement in the understanding of host-ECM fungi recognition and host-specificity.

To conclude, whereas plant-derived signaling-molecules, such as flavonoids and strigolactones, are important molecules for Rhizobium-legumes interactions and AMF-plant interactions, the plant-derived signaling molecules required for ECM establishment (precontact phase) are still largely unknown and likely diverse. One can then wonder whether the chemical dialogues involved are host-species specific or not.

2. ECM fungal-derived signaling molecules alter host root architecture and development.

Root development and architecture are profoundly modified in the vicinity of fungal hyphae and before direct contact, to form ECM root tips. Indeed, increased lateral root development, root growth arrest (Dexheimer and Pargney, 1991; Ditengou et al., 2000; Felten at al., 2009; Spivallo et al., 2009; Rincon et al., 2003; Vayssières et al., 2015), are observed, suggesting that root cells responds to fungal signaling molecules.

a) Fungal auxin as an early diffusible signaling molecule. Several authors suggested that fungal auxins has an important role as a signaling-molecule to initiate ECM development (Gay et al., 1994; Rincon et al., 2001; Felten et al., 2010; Spivallo et al., 2009). Auxin and auxin-analogues released from several ECM fungus was found (Niemi et al., 2002; Krause et al., 2015; Vayssières et al., 2015). *Pisolithus* microcarpus is able to produce the indolic-compound called hypaphorine, a tryptophane betaine (Béguiristain and Lapeyrie, 1997). Krause et al., 2015 identified the exporter of IAA from *Tricholoma vaccinum* as the multidrug and toxic extrusion (MATE) transporter Mte1 (Krause et al., 2015), supporting the efflux of IAA from fungal cells. Several studies show an increased level of auxin in mature ECM of Populus trichocarpa-Laccaria bicolor (Vayssières et al., 2015), Hebeloma-Pinus and in Piloderma-Quercus (Hermann et al., 2004), highlighting that ECM root tips are auxin-rich environment. As fungal auxins stimulate fungal cell elongation and hyphal branching from ECM fungi and not from non-mycorrhizal fungi (Debaud and Gay, 1987; Krause et al., 2015), fungal IAA is likely also required for the observed hyphae hyperbranching phenotype at both early and later stages of fungal colonization. At early stage, hyperbranching is likely required to enhance the probability of fungal hyphae to encounter roots and at later stage (Krause et al., 2015). Hypaphorine from *Pisolithus microcarpus* is able to trigger the expression of auxin-signaling genes and regulate auxin level in Eucalyptus globulus Labill. ssp. bicostata roots and could regulate auxin transport (Béguiristain and Lapeyrie, 1997; Ditengou et al. 2000; Nehls et al., 1998). In the Laccaria bicolor-Populus interaction, lateral root stimulation at early stages of ECM establishment is achieved by modulating auxin transporter, in particular by enhancing the basipetal auxin transport (Felten et al., 2009). This is achieved likely after the concentration of auxin in root apices increased (Felten et al., 2009; Vayssières et al., 2015).

To conclude, the current working-model is as follows: fungal auxins are synthesized in hyphae in the vicinity of roots, secreted and transferred to root cells where it trigger host auxin signaling as well as activates auxin production, leading into root growth arrest and increased lateral root development (Vayssières et al., 2015).

 b) ECM fungi produce volatile organic compounds as signaling molecules to stimulate lateral roots development

Interestingly, stimulation of lateral roots (LR) is also observed in the non-host plant *Arabidopisis thaliana* in indirect contact with either *L. bicolor* or *Tuber* melanosporum (Spivallo et al., 2009; Felten et al., 2009; Felten et al., 2010). This suggests fungal production of volatiles or diffusibles compounds used as signal-molecules by the plant. Interestingly, mutant *ein2* of *A. thaliana* is less sensitive to LR stimulation, suggesting that ethylene is likely involved. In addition, some but not all ECM fungi are able to produce ethylene (Graham and Linderman, 1980; Rupp and Mudge,1985; Splivallo et al.,2009), whereas other are likely able to produce jasmonates (Regvar and Gogala, 1997) or cytokinins (Kraigher et al., 1991; Kovac & Zel, 1994). Ethylene and jasmonic acid when applied exogenously induce LR development (Swarup et al., 2007; Ivanchenko et al.,2008; Sun et al.,

2009) whereas this two hormones act as negative regulators of ECM symbiosis establishment (Plett et al, 2014). A recent study demonstrated that ectomycorrhizal symbiont *L. bicolor* diffuse at very low concentration the thujopsene, a volatile organic compound belonging to the sesquiterpene family, prior any physical contact with the plant (either *P. trichocarpa* or the non mycorrhizal plant *A. thaliana*) in order to trigger increased lateral root through a ROS-dependent mechanism (Ditengou et al., 2015). *Laccaria* sesquiterpenes likely do not target auxin signaling as they do not modify the auxin-reporter DR5::GFP signal intensity and spatial distribution (Ditengou et al., 2015). This study highlights that ECM fungi produce volatiles as many other microbes able to interact with plants, suggesting a common strategy despite the different chemical nature of volatiles (Junker & Tholl, 2013; Bailly et al., 2014; Bitas et al., 2013; Schmidt et al., 2015).

In conclusion, several ECM fungi, by releasing volatiles (e.g. sesquiterpenes) and/or hormones (IAA, ethylene, cytokinine), stimulate lateral roots development leading to more root surface area to colonize. Several molecules (e.g. fungal IAA) are acting through the manipulation of auxin gradient and/or transport, whereas other such as sesquiterpenes act independently of auxin. In addition, in some cases IAA also stimulates branching of fungal hyphae to enhance both the contact between roots and hyphae and later the Hartig net development. However, nothing yet proves this strategy is broadly used by ECM fungi in the early steps of interaction. The future identification of more fungal-derived signal molecules would elucidate whether a common molecule is required for ECM symbiosis establishment.

B.Control of plant hormone signaling pathways in later stages of ECM development

After hyphae and roots enter in contact, fungal hyphae completely surround small lateral roots and will grow intensively within the apoplast of cortical cells to form the Hartig net. Plant hormones are likely required at this stage modulate root development, sustain bi-directional nutrient fluxes, defend themselves from the intruders and modify/soften their plant cell walls to allow fungal colonisation. A recent review (Pozo et al., 2015) highlights that nearly all studied phytohormones so far, play a role in AM establishment or functioning. Several studies also showed that ethylene (ET), jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA) are produced and
sometimes accumulated during the interaction between mutualistic fungi and their host plants (Hause et al., 2002; Splivallo et al., 2009; Larhmann et al., 2015; Kathabi et al., 2012).

1. Auxin

The phytohormone auxin (indole-3-acetic acid [IAA]), known for its central and pleitropic roles in plant growth and metabolism (Zhao, 2010; Teale, Paponov & Palme, 2006), is considered to be one of the main triggers regulating all of the different steps of LR formation (Ditengou et al., 2008;Laskowski et al., 2008; Nibau et al., 2008). In the previous section, we tackled the role of fungal IAA at early stages of ECM development. In this paragraph, we will discuss the role of auxin in later steps of ECM development. We stated in a previous section that fungal IAA perception likely regulates auxin transport genes in roots (Béguiristain and Lapeyrie, 1997; Ditengou et al. 2000; Nehls et al., 1998; Felten et al., 2009; Vayssières et al, 2015). In addition to modulation of auxin-transport, ECM development is also altering auxin metabolism (in particular amino-acid conjugation is enhanced, Vayssières et al., 2015), and auxin signaling. For example, in the early stages of interaction between either L. bicolor or H. *cylindrosporum* with pine, auxin-signaling genes were induced (Charvet-Candela et al., 2002; Heller et al., 2012). Similarly, the interaction between Pisolithus tinctorius and oak roots led to an induction of auxin-biosynthesis and auxin-signaling related genes (Sebastiana et al., 2014). Interestingly, in the late stages of the interaction between *Piloderma* and oak, auxin transporters and auxin responsive transcription factors are repressed, suggesting that auxin gradients are only important in the early stages of ECM mycorrhizal root formation (Tarkka et al., 2013). Hebeloma cylindrosporum transgenic fungus over-producing IAA is able to better colonize roots, with the number of colonized roots is increasing by 3-5 times (Gay et al., 1994). Microscopic analysis of ECM formed by the over-producer of IAA of H. cylindropsorum displayed a denser Hartig-net, suggesting a role of fungal IAA at early and late stages of ECM development. Gay et al. (1994) proposed that fungal IAA might play a role in cell wall loosening at this later stage, whereas Krause et al., (2015) proposed that IAA is stimulating hyphae hyperbranching, necessary to form the pseudo-parenchymatic tissues, the Hartig net.

From their studies and other, Vayssières et al., 2015 proposed a working model (i) auxin-rich environment in root apices would be achieved partly through fungal IAA uptake (ii) auxin-signaling pathway would be triggered leading to more lateral roots, (ii) concentration of IAA-conjugate to amino-acids would increase and (ii) part of the auxin responses would be repressed in mature *L. bicolor-Populus* ECM root tips suggesting either a

plant auto-regulation of auxin-signaling or the action of a fungal effector able to interact with auxin-signaling (Vayssières et al., 2015).

2. Ethylene

Using transgenic Populus tremula x tremuloides, Plett et al., 2014 demonstrated that neither ACC over-production (Populus overexpressing ACOI1), nor ET insensitivity (Populus etr1-1 mutants) affect the initial stages of ECM development, namely the mantle formation. However, both *Poplar* plantlets overexpressing ACO1 and treatment with exogenous ACC, the precursor of ET, inhibit fungal colonization of the apoplast of rhizodermal cells i.e. the formation of Hartig net (Plett et al., 2014). Compromised ethylene-signaling pathway in Arabidopsis thaliana also led to a greater fungal colonisation by the root endophyte Piriformospora indica (Camehl et al., 2010). More precisely, Ethylene Response Factor (ERF1), an ethylene-signaling relay protein, is likely the key regulator in both Populus-L. bicolor and A. thaliana-P.indica interactions, as up-regulation of either AtERF1 or PtaERF1 resulted in a decrease fungal colonisation of rhizodermal cells (Camehl et al., 2009; Plett et al., 2014). However, another study showed an opposite result in which A. thaliana impaired in ethylene signaling displayed a reduced P. indica root colonization, whereas Arabidopsis mutants exhibiting constitutive ethylene signaling, -synthesis or ethylene-related defense displayed a better fungal colonization (Kathabi et al., 2012). This suggests that the role of ET may also depend on growth and infection conditions. We can hypothesize from these studies that ET inhibits Hartig net formation late stages of fungal colonization but not primary stages of ECM development mantle formation. Experiments conducted on other host-ECM fungi associations are required to assess whether the role of ET in controlling symbiosis development is conserved.

Application of exogenous ACC or overexpression of PtACO1 resulted in the repression of genes associated with cell-wall biosynthesis (expansin, pectinesterase, cellulose synthase), suggesting a role of ET in controlling plant cell wall composition during fungal colonisation (Plett et al., 2014). Ethylene-responsive genes are induced at very late stages of colonization as showed by several transcriptomic studies (Plett et al., 2014 ; Tarkka et al., 2013), suggesting that ET-signaling is triggered only at late stages of ECM development. However, Spivallo et al. (2009) showed that *A. thaliana ein2* mutant, insensitive to ET, form less lateral roots than the wild-type under indirect contact with *Tuber melanosporum*. As they showed that *Tuber melanosporum* synthesize ethylene from 1-methionine probably through the α -keto-

 γ -(methylthio)butyric acid pathway and concluded that ET signaling trigerred by fungal ethylene is essential to cooperate with auxin at early stages of ECM establishment.

From these studies, it can be suggested that (i) fungal ethylene is required at earliest stages of ECM development and acts cooperatively with plant auxins to stimulate LR formation, (ii) plant ethylene, while not required at the early stages of the symbiosis, is needed to limit fungal growth within root tissues.

3. Jasmonic-acid

Treatment of *Populus trichocarpa* roots by jasmonic acid (JA) induces a drastic decrease of *L. bicolor* hyphae penetration, whereas the formation of the mantle is not influenced (Plett et al., 2014). However, JA is produced when *L. bicolor* starts to penetrate the apoplastic space between rhizodermal cells (Veneault-Fourrey & Schellenberger, unpublished results). However, in mature ECM root tips, JA content is decreased when compared to non-ECM roots of grey poplar (*Populus tremula x Populus alba*) (Luo et al., 2009). On the other hand, colonisation of *A. thaliana* roots by the fungal endophyte *P. indica* also increases JA level in roots. JA treatment of *Populus* roots colonized by *L. bicolor* triggers the expression of stress-related genes (e.g. thaumatin-related genes, receptor-like kinases, chitinases), expansin encoding genes and represses the expression of cell wall active enzymes (e.g. pectin esterases, xyloglucan transferases, pectinases, expansin) (Plett et al., 2014). This suggests an increased resistance to fungal colonization and a decrease of cell elongation (Cho & Cosgrove, 2000; Hall & Cannon, 2002; Humphrey et al., 2007). Transcriptomic data showed an extensive cross-talk between ET and JA transcriptomic changes in ECM root tips of *Populus trichocarpa* (Plett et al., 2014).

Therefore, it appears that JA and ET are required to set boundaries to fungal colonization through a cooperative regulation of cell wall remodelling and triggering of plant defences (Plett et al., 2014). It is thus likely that ECM fungi manipulate the local plant defence responses to create a localized weakening of the plant immune system. Mutualistic fungi use effectors like small-secreted proteins to modulate the impact of these hormones (Plett et al., 2014; Kloppholz et al., 2011).

III. Secreted fungal effectors, central players in controlling symbiosis development?

A.The effector concept

Since the proposal of the gene-for-gene concept by Flor (Flor, 1971), intensive research on plant pathogenic microorganisms have been undertaken to understand the molecular strategies used by plant pathogens to alter and reprogram host metabolism. This research led to discovery of small secreted proteins produced by plant-pathogen microbes and called effectors, later defined as "Microbial and pest secreted molecules that alter host-cell processes or structure generally promoting the microbe lifestyle. Effector functions are as diverse as suppressing immune responses or enhancing access to nutrients" (Win et al, 2012).

Although first effectors were identified as Type 3 Secretion System (T3SS) and Type 4 Secretion System effectors in pathogenic bacteria (Salmond & Reeves, 1993; Christie, 2001; Deslandes & Rivas, 2012), effector proteins have been since identified in a very broad range of microorganisms including fungi (Lo Presti et al., 2015), oomycetes (Bozkurt et al., 2012; Kamoun et al., 2006), nematodes (Mitchum et al., 2013), holoparasitic plants and aphids (Pitino et al., 2013; Rodriguez et al., 2013; Lee et al., 2013). The fact that effector or effector-like proteins are found across several kingdoms suggests that using SSPs as a mean of communication to control and manipulate its host in order to promote the interaction is a common strategy (Win et al., 2012).

In addition with this widespread occurrence among plant-microbe interactions, effectors biology brought to light a large diversity of subcellular localization and biological targets among effectors. Many of the effectors identified so far are internalized by the host cells and localized inside the cytoplasm. Once inside they can target a very wide range of organelles including nucleus, chloroplast, plasma membrane, endoplasmic-reticulum (Hicks & Galan, 2013; Block et al., 2014; Petre et al., 2013; Birch et al., 2006). However, more and more effectors are also identified in the apoplastic space, between plant cell wall and plasma membrane, reveiling another plethora of new targets (Song et al., 2009; Doehlemann & Hemetsberger, 2013). Altogether, these researches highlight the ability of effectors to localize and target the various subcellular compartments and cellular functions of the host cells in order to promote the interaction. Despite this apparent versatility, recent studies highlight that effectors from evolutionary distinct plant pathogenic microorganisms physically interact with

similar *Arabidopsis* proteins involved in plant immune system (Mukthar et al., 2011; Wessling et al., 2014). Components of plant hormone signaling pathways are common targets of effectors of plant pathogenic microorganisms through direct or indirect interaction with either phytohormone receptors, transcriptional activators and repressors (Kazan and Lyons, 2014).

Considering ECM symbiosis as another type of biotrophic plant-fungal interaction it was tempting to hypothesize the presence of effector or effector-like proteins among ECM fungal genomes (Martin et al, 2008). However, it is only very recently that experimental demonstration showed that mutualistic fungi use SSP as a mean of communication with their hosts in order to promote symbiosis.

B. Mycorrhiza-induced Small Secreted Proteins: the symbiotic effectors?

First genome-wide analysis carried out on L.bicolor-Populus trichocarpa ECM root tips revealed a contrasting transcriptomic landscape with the free-living mycelium. Among the 20 most up-regulated genes during the symbiosis, five of them code for small-secreted proteins SSPs (Martin et al., 2008). Due to their strong up-regulation during symbiosis and their size, these so-called Mycorrhiza-induced Small Secreted Proteins (MiSSPs) look similar to pathogenic small secreted proteins, discovered 30 years ago. L.bicolor MiSSP7, whose encoding gene is one of the most up-regulated during symbiosis, is secreted and enter host cells where it localizes into the nucleus (Plett et al., 2011). Inside the nucleus, MiSSP7 interacts with the PtJAZ6 protein (Plett et al., 2014a). JAZ proteins are negative regulator of jasmonic-acid signaling pathway. Once jasmonic acid is produced, JAZ proteins are ubiquitinylated and degraded in a proteasome-dependent manner (Pauwels & Goossens, 2011; Wager & Browse, 2012). MiSSP7 stabilizes PtJAZ6 avoiding its degradation in presence of JA. Transcription of target genes is thus repressed. Preliminary results showed that genes involved in plant cell wall remodelling and plant defense responses might be target genes (Plett et al., 2014). This study highlights that JAZ proteins are cellular hubs targeted by plantinteracting microbes and required for interactions to proceed. Indeed, JAZ proteins are also targets for effectors from plant pathogenic microbes (Jiang et al, 2013; Gimenez-Ibanez et al, 2014). However, whereas bacterial effectors stimulate JA-signaling pathway, mutualistic fungi are decreasing JA-signaling pathway. Availability of *Rhizophagus irregularis* (formerly Glomus intraradices) genome sheds the light on several SSPs whose encoding genes were upregulated during the AM symbiosis with *Medicago truncatula*. Among them, SP7 has been shown to interact with MtERF19, a transcription factor from *Medicago truncatula* involved in plant immune responses (Kloppholtz et al., 2011). By expressing SP7 encoding genes in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, it extends the biotrophic phase of this pathogenic fungus, demonstrating the ability of a mutualistic effector to impact life cycle of fungi from other lifestyles. In conclusion, mutualistic fungi are impacting hormone signaling pathway as effectors from plant-pathogenic microbes do, suggesting similarities between mutualistic and pathogenic fungi during early steps of host's colonization. It is important to note that the expression of MiSSPs has also been found in all mycorrhizal interactions studied so far (Kohler et al, 2015) and also *in situ* in *Piloderma croceum-Pinus taeda* ectomycorrhizal root tips (Lia et al., 2014).

When comparing the expression of MiSSP genes of L. bicolor in mutualistic interaction with P. trichocarpa (Angiosperm) and with Pseudotsuga menziesii (Gymnosperm), a core regulon and a variable regulon of MiSSPs was identified (Plett et al., 2014b). The variable regulon may explain host specificity. In parallel, proteomic analysis of *L.bicolor* free-living mycelium revealed L.bicolor secretes both cell wall degrading enzymes and proteases as well as nine small secreted proteins (Vincent et al, 2012). Computational analysis of Hebeloma cylindrosporum genome combined with proteomic-based study of the free-living mycelium exoproteome lead to the identification of 869 secreted proteins (Doré et al., 2015). A large part (43%) of the proteins of the secretome lacks functional annotation and most of them are SSPs (Doré et al., 2015). Interestingly, even though some SSPs are up-regulated during the symbiosis, twenty-eight percent of SSPs were expressed in the free-living mycelia (Doré et al., 2015). These latter SSPs are mostly well conserved across fungal kingdom (Doré et al., 2015). Such SSPs repressed in ECM and/or expressed in FLM and conserved across fungal kingdom could have a role in fungal biology likely related to the saprotrophic/decomposer stage independent from symbiosis (Doré et al., 2015). Doré et al. also compared the expression of SSPs in ECM root tips formed *in vitro* in synthetic medium with ECM root tips formed in greenhouse on organic matter. Several SSPs expressed in in vitro ECM root tips were poorly expressed in greenhouse ECM root tips and vice-versa. These two experiments indicate that SSP encoding genes may respond not only to host but also to environmental signals. Doré et al. proposed that SSPs are integrator of both biotic and abiotic soil environment. This will be in accordance with the emerging idea that SSP of plant pathogenic fungi may be used also to perform dialogue and competition with other soil microbes (Rovenich et al., 2014). Moreover, *in silico* comparative analysis of fungal secretomes, including 28 saprotrophic and 12 ECM fungal species, showed that saprotrophic fungi possess hundreds of small proteins predicted as secreted, demonstrating the presence of SSPs is not restricted to biotrophic microrganisms (Pellegrin et al., 2015). Clustering analysis also identified clusters of SSPs shared between saprotrophic and ECM fungi, rising the hypothesis of a common repertoire of SSPs between saprotrophic and ECM fungi. However, it is difficult to assess their importance in fungal lifestyle due to the lack of transcriptomic and functional data.

Altogether, these results clearly show that mutualistic fungi secrete and use effector proteins to manipulate their hosts in particular by targeting ET or JA-signaling pathway. Considering the diversity of effector proteins as demonstrated by studies on pathogenic effectors, mycorrhizal fungi might use an equivalent strategy to setup their interaction. However, available litterature on mutualistic effectors is still very poor and functional analyses of new effector proteins are required to clarify and detail how mycorrhizal fungi coordinate their activity with their host plant (Plett & Martin, 2015). In addition, understanding how these effectors have evolved from their saprotrophic ancestors is one of the next challenge.

IV. Perspectives and future research

Availability of -omics data provided an effective stepping-stone for functional analysis.

Combination of transcriptionnal and functional analysis sheds the light on MiSSPs for both arbuscular and ectomycorrhizal fungi. This discovery of mutualistic effectors has large consequences, as pathogenic interactions (and N-fixing rhizobacteria) were the only one known to employ small secreted proteins to manipulate their host and promote the interaction.

It is now a challenge to decipher of the numerous identified "symbiosis effectors" considering their lack of similarities with proteins with known function. However, this step forward is necessary to understand the development and functioning of ectomycorrhizal symbiotic interaction and gain a better view on effectors role in plant-microbe interactions.

Furthermore, the presence of SSPs expressed during free-living stages of the ectomycorrhizal symbionts *H.cylindrosporum* and *L.bicolor* indicate that ECM fungi use SSPs to fullfill both symbiotic and non-symbiotic functions (Doré et al., 2015 ; Plett et al., 2015). Therefore, it will be of great interest to study the role of SSPs in saprotrophic fungal species and in the

free-living mycelium of ECM fungal species to test whether they have similar function or whether neofunctionalization occurred. Although our understanding of ECM symbiosis has greatly increased in the last ten years, there are still a lot of questions to adress to understand the symbiotic signaling pathways:

- To what extend environment and host affect evolution of ECM fungi genomes?
- Are symbiotic effectors a widespread strategy within mutualistic interactions and how do they impact the host development and metabolism?
- At which time these effectors are secreted and where do they localize inside the plant root cortex?
- Most importantly, what are the host proteins and functions targeted by fungal symbiotic effectors (MiSSPs).
- Is there SSPs from the host targeting mycobiont proteins and functions?

All these questions are challenging as each ECM fungus seems to possess its own symbiotic toolbox, but combination of –omics technologies and functional analysis will help dissecting of this belowground symbiotic relationships.

References

- Adriaensen K, Vraalstad T, Noben JP, et al (2005) Copper-adapted Suillus luteus, a symbiotic solution for pines colonizing Cu mine spoils. Applied and Environmental Microbiology 71:7279–7284. doi: 10.1128/AEM.71.11.7279-7284.2005
- Anderson DM, Frank DW (2012) Five Mechanisms of Manipulation by Bacterial Effectors: A Ubiquitous Theme. PLoS Pathogens 8:1–4. doi: 10.1371/journal.ppat.1002823
- Bailly A, Groenhagen U, Schulz S, et al (2014) The inter-kingdom volatile signal indole promotes root development by interfering with auxin signaling. The Plant Journal 80:758–771. doi: 10.1111/tpj.12666
- Bayry J, Aimanianda V, Guijarro JI, et al (2012) Hydrophobins-unique fungal proteins. PLoS Pathogens 8:6–9. doi: 10.1371/journal.ppat.1002700
- Becquer A, Trap J, Irshad U, et al (2014) From soil to plant, the journey of P through trophic relationships and ectomycorrhizal association. Frontiers in Plant Science 5:1–7. doi: 10.3389/fpls.2014.00548
- Béguiristain T, Lapeyrie F (1997) Host plant stimulates hypaphorine accumulation in Pisolithus tinctorius hyphae during ectomycorrhizal infection while excreted fungal hypaphorine controls root hair development. New Phytologist 136:525–532. doi: 10.1046/j.1469-8137.1997.00753.x

- Bellion M, Courbot M, Jacob C, et al (2007) Metal induction of a Paxillus involutus metallothionein and its heterologous expression in Hebeloma cylindrosporum. New Phytologist 174:151–158. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.01973.x
- Benjdia M, Rikirsch E, Müller T, et al (2006) Peptide uptake in the ectomycorrhizal fungus Hebeloma cylindrosporum: Characterization of two di- and tripeptide transporters (HcPTR2A and B). New Phytologist 170:401–410. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01672.x
- Birch PRJ, Rehmany AP, Pritchard L, et al (2006) Trafficking arms: Oomycete effectors enter host plant cells. Trends in Microbiology 14:8–11. doi: 10.1016/j.tim.2005.11.007
- Bitas V, Kim H-S, Bennett JW, Kang S (2013) Sniffing on microbes: diverse roles of microbial volatile organic compounds in plant health. Molecular plant-microbe interactions : MPMI 26:835–43. doi: 10.1094/MPMI-10-12-0249-CR
- Blasius D, Feil W, Kottke I, Oberwinkler F (1986) Hartig net structure and formation in fully ensheathed ectomycorrhizas. Nordic Journal of Botany 6:837–842.
- Block A, Toruño TY, Elowsky CG, et al (2014) The Pseudomonas syringae type III effector HopD1 suppresses effector-triggered immunity, localizes to the endoplasmic reticulum, and targets the Arabidopsis transcription factor NTL9. New Phytologist 201:1358–1370. doi: 10.1111/nph.12626
- Bonfante P, Genre A (2015) Arbuscular mycorrhizal dialogues : do you speak " plantish " or " fungish "? Trends in Plant Science 20:150–154. doi: 10.1016/j.tplants.2014.12.002
- Bozkurt TO, Schornack S, Banfield MJ, Kamoun S (2012) Oomycetes, effectors, and all that jazz. Current opinion in plant biology 15:483–92. doi: 10.1016/j.pbi.2012.03.008
- Brundrett MC (2009) Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: Understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. Plant and Soil 320:37–77. doi: 10.1007/s11104-008-9877-9
- Ceccaroli P, Saltarelli R, Polidori E, et al (2015) Sugar transporters in the black truffle Tuber melanosporum: From gene prediction to functional characterization. Fungal Genetics and Biology 81:52–61. doi: 10.1016/j.fgb.2015.05.006
- Charvet-Candela V, Hitchin S, Ernst D, et al (2002) Characterization of an Aux/IAA cDNA upregulated in Pinus pinaster roots in response to colonization by the ectomycorrhizal fungus Hebeloma cylindrosporum. New Phytologist 154:769–777. doi: 10.1046/j.1469-8137.2002.00423.x
- Claire Veneault-Fourrey, Commun C, Kohler A, et al (2014) Genomic and transcriptomic analysis of Laccaria bicolor {CAZome} reveals insights into polysaccharides remodelling during symbiosis establishment. Fungal genetics and biology : {FG} & B 72:168–181. doi: 10.1016/j.fgb.2014.08.007
- Courty P-E, Buée M, Diedhiou AG, et al (2010) The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts. Soil Biology and Biochemistry 42:679–698. doi: 10.1016/j.soilbio.2009.12.006

- Delaux PM, Xie X, Timme RE, et al (2012) Origin of strigolactones in the green lineage. New Phytologist 195:857–871. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04209.x
- Denarie J, Cullimore J (1993) Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a minireview new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. Cell 74:951–954.
- Deslandes L, Rivas S (2015) Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. Trends in Plant Science 17:644–655. doi: 10.1016/j.tplants.2012.06.011
- Dexheimer J, Pargney JC (1991) Comparative anatomy of the host-fungus interface in mycorrhizas. Experientia 47:312–321. doi: 10.1007/BF01972072
- Dietz S, von Bülow J, Beitz E, Nehls U (2011) The aquaporin gene family of the ectomycorrhizal fungus Laccaria bicolor: Lessons for symbiotic functions. New Phytologist 190:927–940. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03651.x
- Dimitrios Floudas, Manfred Binder, Robert Riley, Kerrie Barry, Robert A. Blanchette, Bernard Henrissat, Angel T. Martínez, Robert Otillar, Joseph W. Spatafora, Jagjit S. Yadav, 7 Andrea Aerts, Isabelle Benoit, Alex Boyd, Alexis Carlson, Alex Co DSH (2012) The Paleozoic Origin of Enzymatic from 31 Fungal Genomes. Science 336:1715– 1719.
- Ditengou F a, Béguiristain T, Lapeyrie F (2000) Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorrhizal fungus Pisolithus tinctorius, and restored by indole-3-acetic acid. Planta 211:722–728. doi: 10.1007/s004250000342
- Ditengou F a., Müller A, Rosenkranz M, et al (2015) Volatile signaling by sesquiterpenes from ectomycorrhizal fungi reprogrammes root architecture. Nature Communications 6:6279. doi: 10.1038/ncomms7279
- Ditengou FA, Teale WD, Kochersperger P, et al (2008) Mechanical induction of lateral root initiation in Arabidopsis thaliana. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105:18818–18823. doi: 10.1073/pnas.0807814105
- Doehlemann G, Hemetsberger C (2013) Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. New Phytologist 198:1001–1016.
- Doré J, Perraud M, Dieryckx C, et al (2015) Comparative genomics, proteomics and transcriptomics give new insight into the exoproteome of the basidiomycete Hebeloma cylindrosporum and its involvement in ectomycorrhizal symbiosis.
- Ekblad a., Wallander H, Godbold DL, et al (2013) The production and turnover of extramatrical mycelium of ectomycorrhizal fungi in forest soils: Role in carbon cycling. Plant and Soil 366:1–27. doi: 10.1007/s11104-013-1630-3
- Epple PM, Mcdonald N, Bader KC, et al (2014) Convergent targeting of a common host protein-network by pathogen effectors from three kingdoms of life. 16:364–375. doi: 10.1016/j.chom.2014.08.004
- Felten J, Ditengou FA, Legué V (2010) Lateral root stimulation in the early interaction between Arabidopsis thaliana and the ectomycorrhizal fungus Laccaria bicolor: is fungal auxin the trigger? Plant signaling & behavior 5:864–7. doi: 10.1104/pp.109.147231

- Felten J, Kohler A, Morin E (2009) The ectomycorrhizal fungus Laccaria bicolor stimulates lateral root formation in poplar and Arabidopsis through auxin transport and signaling. Plant physiology 151:1991–2005. doi: 10.1104/pp.109.147231
- Flor H (1971) Current status of the gene-for-gene concept. Annual review of phytopathology 9:275–296.
- Foley J a, Defries R, Asner GP, et al (2005) Global consequences of land use. Science (New York, NY) 309:570–574. doi: 10.1126/science.1111772
- Fries N, Serck-Hanssen K, Dimberg LH, Theander O (1987) Abietic acid, and activator of basidiospore germination in ectomycorrhizal species of the genus Suillus (Boletaceae). Experimental Mycology 11:360–363. doi: 10.1016/0147-5975(87)90024-7
- Garcia K, Delaux P, Cope KR, An J (2015) Molecular signals required for the establishment and maintenance of ectomycorrhizal symbioses. New Phytologist 208:79–87.
- Garcia K, Zimmermann SD (2014) The role of mycorrhizal associations in plant potassium nutrition. Frontiers in plant science. doi: 10.3389/fpls.2014.00337
- Gay G, Normand L, Marmeisse R, et al (1994) Auxin overproducer mutants of Hebeloma cylindrosporum Romagnesi have increased mycorrhizal activity. New Phytologist 128:645–657. doi: 10.1111/j.1469-8137.1994.tb04029.x
- Glass NL, Schmoll M, Cate JHD, Coradetti S (2013) Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. Annual review of microbiology 67:477–98. doi: 10.1146/annurev-micro-092611-150044
- Gomes D, Agasse a., Thiébaud P, et al (2009) Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes 1788:1213–1228. doi: 10.1016/j.bbamem.2009.03.009
- Graham JH, Linderman RG (1980) Ethylene production by ectomycorrhizal fungi, Fusarium oxysporum f. sp. pini, and by aseptically synthesized ectomycorrhizae and Fusarium-infected Douglas-fir roots. Canadian journal of microbiology 26:1340–1347.
- Grigoriev IV, Cullen, Sb G, et al (2011) Fueling the future with fungal genomics. Mycology: 2:192–209. doi: 10.1080/21501203.2011.584577
- Hacquard S, Tisserant E, Brun A, et al (2013) Laser microdissection and microarray analysis of Tuber melanosporum ectomycorrhizas reveal functional heterogeneity between mantle and Hartig net compartments. Environmental microbiology 15:1853–1869. doi: 10.1111/1462-2920.12080
- Heijden MG a VD, Martin FM, Selosse M-A, Sanders IR (2015) Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. New Phytologist 205:1406–1423. doi: 10.1111/nph.13288
- Heinonsalo J, Juurola E, Linden A, Pumpanen J (2015) Ectomycorrhizal fungi affect Scots pine photosynthesis through nitrogen and water economy, not only through increased carbon demand. Environmental and Experimental Botany 109:103–112. doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.08.008

- Heller G, Lundén K, Finlay RD, et al (2012) Expression analysis of Clavata1-like and Nodulin21-like genes from Pinus sylvestris during ectomycorrhiza formation. Mycorrhiza 22:271–277. doi: 10.1007/s00572-011-0402-2
- Hibbett DS, Gilbert LB, Donoghue MJ (2000) Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. Nature 407:506–8. doi: 10.1038/35035065
- Hibbett DS, Matheny PB (2009) The relative ages of ectomycorrhizal mushrooms and their plant hosts estimated using Bayesian relaxed molecular clock analyses. {BMC} biology 7:13. doi: 10.1186/1741-7007-7-13
- Hicks SW, Galán JE (2013) Exploitation of Eukaryotic Subcellular Targeting Mechanisms by Bacterial Effectors. Nature Reviews Microbiology 11:316–326. doi: 10.1038/nrmicro3009.Exploitation
- Isbell F, Calcagno V, Hector A, et al (2011) High plant diversity is needed to maintain ecosystem services. Nature 477:199–202. doi: 10.1038/nature10282
- Ivanchenko MG, Muday GK, Dubrovsky JG (2008) Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in Arabidopsis thaliana. Plant Journal 55:335–347. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03528.x
- Junker RR, Tholl D (2013) Volatile Organic Compound Mediated Interactions at the Plant-Microbe Interface. Journal of Chemical Ecology 39:810–825. doi: 10.1007/s10886-013-0325-9
- Kamoun S (2006) A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. Annual review of phytopathology 44:41–60. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143436
- Kazan K, Lyons R (2014) Intervention of Phytohormone Pathways by Pathogen Effectors. The Plant cell 26:1–26. doi: 10.1105/tpc.114.125419
- Kloppholz S, Kuhn H, Requena N (2011) A Secreted Fungal Effector of Glomus intraradices Promotes Symbiotic Biotrophy - Supp. nformations. Current Biology 21:1204–1209. doi: 10.1016/j.cub.2011.06.044
- Kohler A, Kuo A, Nagy LG, et al (2015) Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. Nature genetics 47:410–415. doi: 10.1038/ng.3223
- Kottke I (1997) Fungal adhesion pad formation and penetration of root cuticle in early stage mycorrhizas ofPicea abies andLaccaria amethystea. Protoplasma 196:55–64. doi: 10.1007/BF01281058
- Kottke I, Oberwinkler F (1987) The cellular structure of the Hartig net: coenocytic and transfer cell-like organization. Nordic Journal of Botany 7:85–95. doi: 10.1111/j.1756-1051.1987.tb00919.x
- Kraigher H, Grayling a., Wang TL, Hanke DE (1991) Cytokinin production by two ectomycorrhizal fungi in liquid culture. Phytochemistry 30:2249–2254. doi: 10.1016/0031-9422(91)83623-S

- Krause K, Henke C, Asiimwe T, et al (2015) Indole-3-acetic acid biosynthesis, secretion, and its morphological effects on Tricholoma vaccinum-spruce ectomycorrhiza. Applied and Environmental Microbiology. doi: 10.1128/AEM.01991-15
- Kuo A, Kohler A, Martin FM, Grigoriev IV (2014) Expanding genomics of mycorrhizal symbiosis. Frontiers in microbiology. doi: 10.3389/fmicb.2014.00582
- Lagrange H, Jay-Allgmand C, Lapeyrie F (2001) Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus root exudates, stimulates Pisolithus hyphal growth at picomolar concentrations. New Phytologist 149:349–355. doi: 10.1046/j.1469-8137.2001.00027.x
- Laskowski M, Grieneisen V a., Hofhuis H, et al (2008) Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. PLoS Biology 6:2721–2735. doi: 10.1371/journal.pbio.0060307
- Laurent P, Voiblet C, Tagu D, et al (1999) A novel class of ectomycorrhiza-regulated cell wall polypeptides in Pisolithus tinctorius. Molecular plant-microbe interactions : MPMI 12:862–871. doi: 10.1094/MPMI.1999.12.10.862
- Lee AH-Y, Petre B, Joly DL (2013) Effector wisdom. New Phytologist 197:375–377. doi: 10.1038/laban.334
- Lehto T, Zwiazek JJ (2011) Ectomycorrhizas and water relations of trees: A review. Mycorrhiza 21:71–90. doi: 10.1007/s00572-010-0348-9
- Liao H-L, Chen Y, Bruns TD, et al (2014) Metatranscriptomic analysis of ectomycorrhizal roots reveals genes associated with Piloderma-Pinus symbiosis: improved methodologies for assessing gene expression in situ. Environmental Microbiology 16:3730–3742. doi: 10.1111/1462-2920.12619
- Lindahl BD, Tunlid A (2015) Ectomycorrhizal fungi potential organic matter decomposers, yet not saprotrophs. New Phytol 205:1443–1447. doi: 10.1111/nph.13201
- Linder MB, Szilvay GR, Nakari-Setälä T, Penttilä ME (2005) Hydrophobins: The proteinamphiphiles of filamentous fungi. FEMS Microbiology Reviews 29:877–896. doi: 10.1016/j.femsre.2005.01.004
- López MF, Dietz S, Grunze N, et al (2008) The sugar porter gene family of Laccaria bicolor: function in ectomycorrhizal symbiosis and soil-growing hyphae. The New phytologist 180:365–378. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02539.x
- López MF, M"anner P, Willmann A, et al (2007) Increased trehalose biosynthesis in Hartig net hyphae of ectomycorrhizas. The New phytologist 174:389–398. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.01983.x
- Lucic E, Fourrey C, Kohler A, et al (2008) A gene repertoire for nitrogen transporters in Laccaria bicolor. The New phytologist 180:343–364. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02580.x
- Luo Z-B, Wu C, Zhang C, et al (2013) The role of ectomycorrhizas in heavy metal stress tolerance of host plants. Environmental and Experimental Botany 47–62. doi: 10.1016/j.envexpbot.2013.10.018

- Maillet F, Poinsot V, André O, et al (2011) Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. Nature 469:58–63. doi: 10.1038/nature09622
- Mankel A, Krause K, Kothe E (2002) Identification of a hydrophobin gene that is developmentally regulated in the ectomycorrhizal fungus Tricholoma terreum. Applied and Environmental Microbiology 68:1408–1413. doi: 10.1128/AEM.68.3.1408-1413.2002
- Mardis ER (2013) Next-generation sequencing platforms. Annual review of analytical chemistry 6:287–303. doi: 10.1146/annurev-anchem-062012-092628
- Marmeisse R, Nehls U, Opik M, et al (2013) Bridging mycorrhizal genomics, metagenomics and forest ecology. The New phytologist 198:343–346. doi: 10.1111/nph.12205
- Martin F, Aerts A, Ahrén D, et al (2008) The genome of Laccaria bicolor provides insights into mycorrhizal symbiosis. Nature 452:88–92. doi: 10.1038/nature06556
- Martin F, Cullen D, Hibbett D, et al (2011) Sequencing the fungal tree of life. New Phytologist 190:818–821. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03688.x
- Martin F, Kohler A, Murat C, et al (2010) Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. Nature 464:1033–1038. doi: 10.1038/nature08867
- Mitchell DT, Gibson BR (2006) Ericoid mycorrhizal association: ability to adapt to a broad range of habitats. Mycologist 20:2–9. doi: 10.1016/j.mycol.2005.11.015
- Mitchum M, Hussey R, Baum T (2013) Nematode effector proteins: an emerging paradigm of parasitism. New Phytologist 199:879–894. doi: 10.1111/nph.12323
- Mukhtar MS, Carvunis A, Dreze M, et al (2011) Plant Immune System Network. Science 333:596–601. doi: 10.1126/science.1203659.Independently
- Müller T, Avolio M, Olivi M, et al (2007) Nitrogen transport in the ectomycorrhiza association: The Hebeloma cylindrosporum-Pinus pinaster model. Phytochemistry 68:41–51. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.09.021
- Nehls U, Dietz S (2014) Fungal aquaporins: cellular functions and ecophysiological perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology 98:8835–8851. doi: 10.1007/s00253-014-6049-0
- Nehls U, Göhringer F, Wittulsky S, Dietz S (2010) Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: A review. Plant Biology 12:292–301. doi: 10.1111/j.1438-8677.2009.00312.x
- Nehls U, Grunze N, Willmann M, et al (2007) Sugar for my honey: carbohydrate partitioning in ectomycorrhizal symbiosis. Phytochemistry 68:82–91. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.09.024
- Nehls U, Wiese J, Guttenberger M, Hampp R (1998) Carbon allocation in ectomycorrhizas: identification and expression analysis of an Amanita muscaria monosaccharide transporter. Molecular plant-microbe interactions: MPMI 11:167–176. doi: 10.1094/MPMI.1998.11.3.167

- Nibau C, Gibbs DJ, Coates JC (2008) Branching out in new directions: the control of root architecture by lateral root formation. The New phytologist 179:595–614. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02472.x
- Niemi K, Vuorinen T, Ernstsen a, Häggman H (2002) Ectomycorrhizal fungi and exogenous auxins influence root and mycorrhiza formation of Scots pine hypocotyl cuttings in vitro. Tree physiology 22:1231–1239.
- Osmundson TW, Halling RE, Bakker HC Den (2007) Morphological and molecular evidence supporting an arbutoid mycorrhizal relationship in the Costa Rican p??ramo. Mycorrhiza 17:217–222. doi: 10.1007/s00572-006-0098-x
- Parniske M (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. Nature Reviews Microbiology 6:763–775. doi: 10.1038/nrmicro1987
- Parrent JL, James TY, Vasaitis R, Taylor AF (2009) Friend or foe? Evolutionary history of glycoside hydrolase family 32 genes encoding for sucrolytic activity in fungi and its implications for plant-fungal symbioses. BMC evolutionary biology 9:148. doi: 10.1186/1471-2148-9-148
- Pauwels L, Goossens A (2011) The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. The Plant cell 23:3089–100. doi: 10.1105/tpc.111.089300
- Peay KG, Russo SE, McGuire KL, et al (2015) Lack of host specificity leads to independent assortment of dipterocarps and ectomycorrhizal fungi across a soil fertility gradient. Ecology Letters 18:807–816. doi: 10.1111/ele.12459
- Petre B, Saunders DGO, Sklenar J (2015) Candidate Effector Proteins of the Rust Pathogen Melampsora larici-populina Target Diverse Plant Cell Compartments. Molecular Plant-Microbe Interactions 28:689–700.
- Pitino M, Hogenhout SA (2012) Aphid protein effectors promote aphid colonization in a plant species-specific manner. Molecular Plant-Microbe Interactions 26:121004074516001. doi: 10.1094/MPMI-07-12-0172-FI
- Plett JM, Daguerre Y, Wittulsky S, et al (2014a) Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus Laccaria bicolor stabilizes the Populus JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111:8299–304. doi: 10.1073/pnas.1322671111
- Plett JM, Gibon J, Kohler A, et al (2012) Phylogenetic, genomic organization and expression analysis of hydrophobin genes in the ectomycorrhizal basidiomycete Laccaria bicolor. Fungal genetics and biology : FG & B 49:199–209. doi: 10.1016/j.fgb.2012.01.002
- Plett JM, Kemppainen M, Kale SD, et al (2011) A secreted effector protein of Laccaria bicolor is required for symbiosis development. Current biology: {CB} 21:1197–1203. doi: 10.1016/j.cub.2011.05.033
- Plett JM, Martin F (2015) Reconsidering mutualistic plant-fungal interactions through the lens of effector biology. Current Opinion in Plant Biology 26:45–50. doi: 10.1016/j.pbi.2015.06.001
- Plett JM, Tisserant E, Brun A, et al (2014b) The mutualist Laccaria bicolor expresses a core gene regulon during the colonization of diverse host plants and a variable regulon to

counteract host-specific defenses. Molecular plant-microbe interactions: {MPMI} 28:261-273. doi: 10.1094/MPMI-05-14-0129-FI

- Presti L Lo, Lanver D, Schweizer G, et al (2015) Fungal Effectors and Plant Susceptibility. Annual Review of Plant Biology 66:513–545. doi: 10.1146/annurev-arplant-043014-114623
- Pumpanen JS, Heinonsalo J, Rasilo T, et al (2009) Carbon balance and allocation of assimilated CO2 in Scots pine, Norway spruce, and Silver birch seedlings determined with gas exchange measurements and 14C pulse labelling. Trees - Structure and Function 23:611–621. doi: 10.1007/s00468-008-0306-8
- Recorbet G, Abdallah C, Renaut J (2013) Protein actors sustaining arbuscular mycorrhizal symbiosis: underground artists break the silence. New Phytologist 199:26–40. doi: 10.1111/nph.12287
- Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H (1994) Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91:11841–11843. doi: 10.1073/pnas.91.25.11841
- Rinaldi a C, Comandini O, Kuyper TW (2007) Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the claff. Fungal Diversity 33:1–45.
- Rincón A, Gérard J, Dexheimer J, Tacon FL (2001) Effect of an auxin transport inhibitor on aggregation and attachment processes during ectomycorrhiza formation between Laccaria bicolor S238N and Picea abies.
- Rincón A, Priha O, Sotta B, et al (2003) Comparative effects of auxin transport inhibitors on rhizogenesis and mycorrhizal establishment of spruce seedlings inoculated with Laccaria bicolor. Tree physiology 23:785–791.
- Rineau F, Rose C, Le Thiec D, Garbaye J (2010) Liming in a beech forest results in more mineral elements stored in the mantle of Lactarius subdulcis ectomycorrhizas. Fungal Biology 114:1007–1014. doi: 10.1016/j.funbio.2010.09.011
- Rineau F, Roth D, Shah F, et al (2012) The ectomycorrhizal fungus Paxillus involutus converts organic matter in plant litter using a trimmed brown-rot mechanism involving Fenton chemistry. Environmental microbiology 14:1477–1487. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02736.x
- Rineau F, Shah F, Smits MM, et al (2013) Carbon availability triggers the decomposition of plant litter and assimilation of nitrogen by an ectomycorrhizal fungus. The ISME journal 1–13. doi: 10.1038/ismej.2013.91
- Rodriguez P a, Bos JI (2012) Towards understanding the role of aphid effectors in plant infestation. Molecular Plant-Microbe Interactions 26:121004074516001. doi: 10.1094/MPMI-05-12-0119-FI
- Rupp L a, Mudge KW (1985) Ethephon and auxin induce mycorrhiza-like changes in the morphology of root organ cultures of Mugo pine. Physiol Plant 64:316–322. doi: 10.1111/j.1399-3054.1985.tb03346.x

- Ryberg M, Matheny PB (2012) Asynchronous origins of ectomycorrhizal clades of Agaricales. Proceedings Biological sciences / The Royal Society 279:2003–2011. doi: 10.1098/rspb.2011.2428
- Scheidegger C, Brunner I (1993) Freeze-fracturing for low-temperature scanning electron microscopy of Hartig net in synthesized Picea abies-Hebeloma crustuliniforme and-Tricholoma vaccinum ectomycorrhizas. New phytologist 123:123–132.
- Schmidt R, Cordovez V, de Boer W, et al (2015) Volatile affairs in microbial interactions. The ISME Journal 1–7. doi: 10.1038/ismej.2015.42
- Sebastiana M, Vieira B, Lino-Neto T, et al (2014) Oak root response to ectomycorrhizal symbiosis establishment: RNA-seq derived transcript identification and expression profiling. PLoS ONE. doi: 10.1371/journal.pone.0098376
- Sedjo R, Sohngen B (2012) Carbon Sequestration in Forests and Soils. Annual Review of Resource Economics 4:127–144. doi: 10.1146/annurev-resource-083110-115941
- Shah F, Nicolàs C, Bentzer J, et al (2015) Ectomycorrhizal fungi decompose soil organic matter using oxidative mechanisms adapted from saprotrophic ancestors. doi: 10.1111/nph.13722
- Shendure J, Ji H (2008) Next-generation DNA sequencing. Nature biotechnology 26:1135–1145. doi: 10.1038/nbt1486
- Sikes BA, Cottenie K, Klironomos JN (2009) Plant and fungal identity determines pathogen protection of plant roots by arbuscular mycorrhizas. Journal of Ecology 97:1274–1280.
- Song J, Win J, Tian M, et al (2009) Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106:1654–1659. doi: 10.1073/pnas.0809201106
- Splivallo R, Fischer U, Göbel C, et al (2009) Truffles regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene. Plant physiology 150:2018–2029. doi: 10.1104/pp.109.141325
- Steinkellner S, Lendzemo V, Langer I, et al (2007) Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant-fungus interactions. Molecules 12:1290–1306. doi: 10.3390/12071290
- Swarup K, Benková E, Swarup R, et al (2008) The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. Nature cell biology 10:946–954. doi: 10.1038/ncb1754
- Tagu D, De Bellis R, Balestrini R, et al (2001) Immunolocalization of hydrophobin HYDPt-1 from the ectomycorrhizal basidiomycete Pisolithus tinctorius during colonization of Eucalyptus globulus roots. New Phytologist 149:127–135. doi: 10.1046/j.1469-8137.2001.00009.x
- Tagu D, Nasse B, Martin F (1996) Cloning and characterization of hydrophobins-encoding ectomycorrhizal Basidiomycete Pisoliihus tinctorius cDNAs from the (Foster. Gene 168:93–97.

- Tatry MV, Kassis E El, Lambilliotte R, et al (2009) Two differentially regulated phosphate transporters from the symbiotic fungus Hebeloma cylindrosporum and phosphorus acquisition by ectomycorrhizal Pinus pinaster. The Plant Journal 57:1092–1102.
- Taylor AFS, Alexander I (2005) The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. Mycologist 19:102–112. doi: 10.1017/S0269-915X(05)00303-4
- Teale WD, Paponov I a, Palme K (2006) Auxin in action: signaling, transport and the control of plant growth and development. Nature reviews Molecular cell biology 7:847–859. doi: 10.1038/nrm2020
- Tedersoo L, May TW, Smith ME (2010) Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. Mycorrhiza 20:217–263. doi: 10.1007/s00572-009-0274-x
- van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C (2015) Ten years of next-generation sequencing technology. Trends in Genetics 30:418–426. doi: 10.1016/j.tig.2014.07.001
- Vayssières A, Pěnčík A, Felten J, et al (2015) Development of the Populus-Laccaria bicolor ectomycorrhiza modifies root auxin metabolism, signaling and response. Plant Physiology pp.114.255620. doi: 10.1104/pp.114.255620
- Wager A, Browse J (2012) Social Network: JAZ Protein Interactions Expand Our Knowledge of Jasmonate Signaling. Frontiers in plant science 3:41. doi: 10.3389/fpls.2012.00041
- Wang B, Qiu YL (2006) Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. Mycorrhiza 16:299–363.
- Wosten H a. (2001) HYDROPHOBINS : Multipurpose Proteins. Annual review of microbiology 55:625-46. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.625
- Woyke T, Rubin EM (2014) Searching for new branches on the tree of life. Science 346:698–699.
- Wu B, Beitz E (2007) Aquaporins with selectivity for unconventional permeants. Cellular and Molecular Life Sciences 64:2413–2421. doi: 10.1007/s00018-007-7163-2
- Xu H, Kemppainen M, Kayal W El, et al (2015a) Overexpression of Laccaria bicolor aquaporin JQ585595 alters root water transport properties in ectomycorrhizal white spruce (Picea glauca) seedlings. New Phytologist 205:757–770. doi: 10.1111/nph.13098
- Xu H, Navarro-Ródenas A, Cooke JEK, Zwiazek JJ (2015b) Transcript profiling of aquaporins during basidiocarp development in Laccaria bicolor ectomycorrhizal with Picea glauca. Mycorrhiza. doi: 10.1007/s00572-015-0643-6
- Zhang S, Xia YX, Kim B, Keyhani NO (2011) Two hydrophobins are involved in fungal spore coat rodlet layer assembly and each play distinct roles in surface interactions, development and pathogenesis in the entomopathogenic fungus, Beauveria bassiana. Molecular Microbiology 80:811–826. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07613.x
- Zhao Y (2010) Auxin biosynthesis and its role in plant development. Annual review of plant biology 61:49–64. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112308

Graphical abstract : Signaling processes at the ectomycorrhizae symbiotic interface.

Several different processes occur during the ontogenesis of ectomycorrhizal symbiosis. Presymbiotic phase is driven by root exudates, volatils (VOC) and fungal indole acid acetic (IAA). IAA leads to root growth arrest and stimulates fungal hyphae branching. After mantle formation, fungal hyphae penetrate within the apoplast. Plant cell wall-degrading enzymes are secreted into the apoplastic space in order to reshape plant and fungal cell walls and create the symbiotic interface. At the same time, fungus release small secreted proteins likely involved in either symbiotic interface (apoplastic effectors) or in reprogramming host physiology, immunity (cytoplasmic effectors) in order to promote symbiosis. Finally, a bi-directionnal exchange of nutrients is set between the plant and fungus within the Hartig-net, leading to a long-term mutualitic symbiosis.



Termes employés	Définition
SSPs	Protéines de moins de 300 acides aminés sécrétées à l'extérieur du microorganisme
	(souvent, mais pas uniquement, grâce à un peptide signal présent en N-terminale
	de la protéine)
Effecteur	Molécules/protéines sécrétées par un microorganisme altérant des processus cellulaires et/ou des structures de l'hôte en vue de promouvoir l'interaction (Win et al, 2012)
Effecteur	Molécules/protéines possédant des propriétés (induction par la présence de l'hôte.
candidat	localisation subcellulaire <i>in planta</i> , phénotype généré chez l'hôte) suggérant un rôle d'effecteur.
MiSSPs	Petites protéines sécrétées induites pendant la mycorhize, considérées comme des effecteurs candidats

 Tableau 1 : Définitions des termes utilisés dans ce manuscrit en rapport avec la notion d'effecteurs.



Figure 3 : Détection des PAMPs par les récepteurs PRR associés. Des composés microbiens (protéines, sucres), dénommées dès lors PAMPs (Pathogen Associated Molecuar Pattern), sont relargués par l'agent phytopathogène au cours de l'infection et reconnus par des récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptor) spécifiques, élicitant une réaction de défense associée. Certains effecteurs (tels que les effecteurs possédant un domaine LysM) ciblent les PAMPs (Ec6, Avr4) ou le récepteur PRR (Slp1) afin d'empêcher la reconnaissance de l'agent phytopathogène. Tiré de Monaghan & Zipfel, 2012.

Les effecteurs

Dans cette partie, je me focalise sur les protéines effectrices apoplastiques et cytoplasmiques des microorganismes filamenteux avant de décrire les points communs connus avec les champignons mutualistes. Les notions d'effecteurs, d'effecteurs candidats, de SSPs et de MiSSPs sont définies dans le Tableau 1.

1. Les effecteurs apoplastiques

L'apoplaste est la première zone à être colonisée par les champignons filamenteux, qu'ils soient pathogènes, endophytes ou mutualistes. Cette zone constitue une première ligne de défense et distingue les microorganismes étrangers en reconnaissant des PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern) via les récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptor, Figure 3), déclenchant le PTI (PAMPs Triggered Immunity). Le PTI implique des réponses de défenses (notamment la production d'espèces réactives d'oxygènes) et la sécrétion de molécules inhibitrices PR (chitinases, protéases, beta glucanases). Ainsi, les microorganismes pathogènes, notamment les champignons filamenteux, produisent des effecteurs qualifiés d'apoplastiques pour inhiber ces réactions de défenses.

Séquestration des PAMPs

Dans le cas d'une colonisation par les champignons filamenteux, l'action enzymatique de chitinases sécrétées dans l'apoplaste par la plante va amener à la libération d'oligomères de chitine dans la zone apoplastique (Malinovsky et al, 2014). Ces oligomères, considérés comme des PAMPs, pourront être détectés par des protéines PRR (Pattern Recognition Receptor) de la membrane plasmique des cellules végétales (Shinya et al, 2012). La reconnaissance de la chitine par les récepteurs PRR va permettre la détection du champignon par la plante et éliciter des réactions de défenses (Monaghan & Zipfel, 2012). Plusieurs stratégies existent chez les champignons phytopathogènes pour empêcher leur reconnaissance par les protéines PRR de la plante. La première a été mise en évidence avec l'effecteur Ecp6 sécrété par le champignon pathogène de tomate Cladosporium fulvum (de Jonge et al, 2010). Le domaine protéique conservé LysM d'Ecp6 permet l'interaction et la séquestration des fragments de chitines relargués (Figure 4 ; Sanchez-Vallet et al, 2013). Chez le même champignon, la seconde stratégie consistant à protéger les hyphes de l'action des chitinases est aussi mise en œuvre par l'intermédiaire d'un autre effecteur, Avr4 (van der Burg et al, 2006). On retrouve aussi ce mode d'action chez les effecteurs Mg1LysM et Mg3LysM du champignon hémibiotrophe Mycosphaerella



Figure 4 : Interaction entre les domaines LysM de l'effecteur Ecp6 et un tétramère de chitine.

Le champignon filamenteux pathogène *Cladosporium fulvum* sécrète l'effecteur ECP6 dans l'espace apoplastique afin de capter les oligomères de chitine relargués par la paroi fongique et empêcher leur détection par les protéines PRR (Pattern Recognition Receptor) de la plante. Tiré de Sanchez-Vallet et al, 2013



Figure 5 : Inhibition de l'activité protéasique par les effecteurs de pathogènes. A l'heure actuelle, cinq effecteurs de microorganismes pathogènes ciblent l'activité protéasique présente dans l'apoplaste des cellules végétales. Tiré de Jashni et al, 2015.

graminicola (Marshall et al, 2011). L'effecteur SLP1 du champignon Magnaporthe oryzae, ne protège pas les hyphes de M.oryzae de l'action des chitinases végétales mais en rentrant en compétition avec les oligomères de chitines au niveau des récepteurs PRR CEBiP et CERK1 impliqués dans la détection de la chitine (Mentlak et al, 2012 ; Shimizu et al, 2010). En parallèle de la reconnaissance des oligomères de chitine, les $\beta(1-3)(1-6)$ -glucanes présents dans la paroi fongique et les $\beta(1-3)$ -glucanes/ α -glucanes présents dans la paroi végétale sont suspectés d'être reconnus par un récepteur membranaire similaire au récepteur Dectin1 des mammifères et impliqué dans la réponse immunitaire associé à la reconnaissance de $\beta(1-3)(1-6)$ -glucanes. On peut donc suspecter la présence d'un récepteur similaire chez les plantes et potentiellement la présence d'effecteurs ciblant spécifiquement les β -glucanes (Fesel & Zuccaro, 2015).

On observe donc dans l'apoplasme trois stratégies différentes impliquant des effecteurs et la chitine, toutes ayant pour but final d'empêcher la détection du pathogène par le système immunitaire de la plante. On suspecte aussi les β -glucanes d'être des PAMPs détectés par la plante, bien que des données manquent encore.

Inhibition des protéases

L'apoplaste est directement acteur des réactions de défenses par la sécrétion de protéases impliquées dans la réponse hypersensible et les réponses dépendantes de l'acide salicylique. Cette stratégie de défense est fortement visée par les organismes pathogènes par l'intermédiaire de nombreux effecteurs dont le rôle est d'inhiber l'activité des protéases à cystéines (Figure 5 ; Song et al, 2009 ; Rooney et al, 2005). Par exemple, l'effecteur Pit2 sécrété par U. maydis est capable d'inhiber l'activité protéase à cystéine de type papaïne de maïs de l'hôte via un domaine protéique conservé de 14 acides aminés suffisant pour obtenir une activité inhibitrice (Mueller et al, 2013). Les protéases sont régulées par la présence d'inhibiteur naturel sécrété par la plante, les cystatines (van der Linde, 2012 ; Benchabane et al, 2015). Un des effecteurs de l'oomycète Phytophtora infestans, EPIC2B, est capable de mimer l'action de la cystatine et d'inhiber les protéases RCR3 et PP1 en venant se fixer sur le site catalytique à cystéine de celles-ci, bloquant leur activité (Kaschani et al, 2010 ; Song et al, 2009 ; Tian et al, 2007). Les protéases à sérine sont aussi ciblées par au moins deux effecteurs de P. infestans, EPI1 et EPI10 (Tian et al, 2004, Tian & Kamoun, 2005). D'autres effecteurs n'ont pas de rôle direct dans l'inhibition de l'activité des protéases mais empêche leur sécrétion dans l'apoplaste (Bozkurt et al, 2011).



R Annu. Rev. Plant Biol. 66:513–45

Figure 6 : **Processus d'invasion de l'hôte chez les champignons pathogènes et mutualistes**. Les champignons pathogènes et mutualistes utilisent une diversité de processus de pénétration et de colonisation de leurs plantes hôtes, quelque soit leurs styles de vies : nécrotrophe (a), biotrophe (b), symbiotique (c) ou hémibiotrophe (d). Adapté de Lo Presti et al, 2015.

Inhibition des péroxydases

Lors d'une agression par un microorganisme pathogène (Bolwell & Wojtaszek, 1997) ou d'un stress abiotique (Singh Gill & Tuteja, 2010), les plantes produisent des espèces réactives de l'oxygène soit à des fins de signalisation (Kwak et al, 2003 ; Foreman et al, 2003), soit pour provoquer une mort cellulaire et stopper la progression de l'organisme phytopathogène (Scheller et al, 2006 ; Torres et al, 2006). Ces espèces réactives de l'oxygène, tel que l'anion superoxyde O_2^- , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ou le radical hydroxyle OH⁻, sont produits principalement chez la plante par deux enzymes : les NADPH-oxidases associées au membrane plasmique (Keller et al, 1998) et les péroxydases apoplastiques ou pariétales (Bindschedler et al, 2006). Le champignon phytopathogène biotrophe U. maydis bloque la production d'espèce réactive de l'oxygène en sécrétant la protéine effectrice Pep1 qui va inhiber une peroxydase de la plante hôte (Hemetsberger et al, 2012), empêchant la formation du « burst oxydatif », responsable du phénotype de mort cellulaire et associé à la réponse hypersensible (Morel & Dangl, 1997). Ce mécanisme basé sur les espèces réactives de l'oxygène est aussi présent dans le cadre de la symbiose mycorhizienne et est suspecté de jouer un rôle de signalisation dans les étapes précoces de la symbiose (Baptista et al, 2007, Fester & Hause, 2005). A l'heure actuelle, aucun effecteur ne ciblant les mécanismes à l'origine du burst oxydatif chez les champignons mycorhiziens n'a été mis en évidence.

Les effecteurs cytoplasmiques

Transfert des effecteurs cytoplasmiques

Les effecteurs cytoplasmiques sont des petites protéines transférées depuis le microorganisme jusqu'au cytoplasme de la cellule de l'hôte. Chez les champignons phytopathogènes, cette étape intervient après la colonisation de la plante hôte par les hyphes. Cette colonisation peut se limiter au compartiment apoplastique, telle qu'observé chez le champignon phytopathogène biotrophe *C. fulvum* ou le symbionte *L. bicolor* (Figure 6), ou passer par une colonisation intracellulaire comme chez le symbionte endomycorhizien *R. irregularis* (à la différence que le symbionte ne pénétre pas le cytosol mais se développe entre la paroi végétale et la membrane plasmique) ou le champignon hémibiotrophe *M. oryzae* (Figure 6). Ces colonisations intra (ou pseudo intra) cellulaire aboutissent à la formation d'un organe spécialisé, tel que l'haustorium, l'appressorium, le complexe d'interface biotrophique ou l'arbuscule (Giraldo & Valent, 2013). Ces organes assurent une double fonction chez les organismes phytopathogènes : ils permettent aux phytopathogènes de capter les ressources

nutritives présentes dans la cellule végétale, fournissant le carbone nécessaire pour compléter le cycle sexuel de l'organisme, et délivre les effecteurs dans le cytoplasme de la cellule végétale (observable in vivo chez M. oryzae, Khang et al, 2010). La présence d'une structure spécialisée n'est pas pour autant une condition obligatoire à la translocation d'effecteurs. La famille des effecteurs Crinklers, mise en évidence chez les oomycètes, possèdent un motif d'adressage au noyau dans leur partie N-terminale, l'activité effectrice étant situé dans la région C-terminale (Schornack et al, 2010). Ce motif est conservé parmi les effecteurs candidats d'autres oomycètes et se révèle fonctionnel, y compris chez Aphanomycetes euteiches, un oomycète parasite de légumineuses qui ne produit pas d'haustoria pour délivrer ses effecteurs, suggérant un mécanisme de translocation indépendant de la formation d'un organe de sécrétion spécialisé (Schornack et al, 2010). Chez les champignons et oomycètes, le motif d'adressage RXLR dEEE a longtemps été discuté comme étant impliqué dans la translocation des effecteurs via l'interaction avec le phosphatidyl-inositol 3-phosphate extracellulaire avant endocytose par la cellule (Kale et al, 2010 ; Plett et al, 2011). Néanmoins, ces résultats ont été sujets à débats et controverses. Une étude démontrant la nonimplication de ce motif dans la translocation de deux effecteurs a aussi été publiée (Wawra et al, 2013). Ainsi, les mécanismes moléculaires permettant la translocation des effecteurs des champignons et oomycètes jusqu'à l'hôte restent assez peu clairs (Petre & Kamoun, 2014).

Localisation des effecteurs cytoplasmiques

Une fois transférés dans le cytoplasme, les effecteurs vont cibler le compartiment subcellulaire dans lequel se trouvent leurs partenaires d'interaction. Les recherches sur les effecteurs de microorganismes phytopathogènes ont démontré leur très grande diversité de localisation subcellulaire, touchant quasiment tous les organelles et compartiments (Rivas & Genin, 2011; Rovenich et al 2014) : réticulum endoplasmique (McLellan et al, 2013), le tonoplaste (Caillaud et al, 2012), les chloroplastes et mitochondries (Petre et al, 2015a), les plasmodesmes (Caillaud et al, 2014). Cette diversité de localisation subcellulaire se retrouve pour un répertoire d'effecteurs candidats d'un même agent phytopathogène, tel que le biotrophe obligatoire *Melampsora larici-populina* (Petre et al, 2015b). Un effecteur de la rouille du Peuplier parvient à cibler les chloroplastes par l'intermédiaire d'un motif d'adressage situé dans sa partie N-Terminale, ce motif étant similaire à ceux présents dans les protéines végétales adressées au chloroplaste (Petre et al, 2015a). On peut alors se demander

s'il existe un découplage entre la séquence protéique permettant l'adressage de l'effecteur à l'organelle cible et la séquence protéique nécessaire à la réalisation de son activité effectrice, ces deux séquences étant portées par des régions différentes de l'effecteur.

Fonctions des effecteurs cytoplasmiques

Régulation de l'expression des gènes de l'hôte

Une fois l'effecteur adressé à son compartiment cible, il réalise son activité effectrice en altérant le métabolisme et la physiologie de l'hôte par une interaction avec des cibles végétales de nature nucléique (Figure 7, ADN, ARN) ou protéique (Rovenich et al, 2014). Les effecteurs cytoplasmiques peuvent altérer l'expression des gènes végétaux en se fixant directement à l'ADN. Cette propriété a été démontrée chez des effecteurs de bactéries, notamment la famille des TAL effecteurs (Kay et al, 2007), la plus connue et étudiée pour ses nombreux débouchés appliqués (Bogdanove et Voytas, 2011 ; Moore et al, 2012). Cette famille d'effecteurs de bactéries identifiés chez Xanthomonas puis Ralstonia solanacearum et Burkholderia rhizoxinica localisent dans le noyau grâce à une séquence d'adressage NLS (Nuclear Localization Signal). Grâce à une séquence répétée d'environ 30 acides aminés, l'effecteur se fixe sur une séquence promotrice d'un gène cible dont l'expression se trouve altérée (Boch & Bonas, 2010). Cette propriété de modification spécifique à l'ADN est maintenant utilisée en biotechnologie (Liu et al, 2014). Chez les microorganismes filamenteux, des effecteurs d'oomycètes peuvent se fixer à l'ADN (Vargas et al, 2015), induirent une régulation de gène codant des protéines HSP (Song et al, 2015) ou des dommages à l'ADN sous forme de cassure double-brin (Ramirez-Garcès, 2016). Les effecteurs cytoplasmiques peuvent aussi interférer avec l'expression génique en interférant avec les mécanismes de « silencing » de l'ARN (Qiao et al, 2013). Il reste à démontrer que les effecteurs candidats de H. arabidopsidis localisant dans le noyau (Caillaud et al, 2012) et les effecteurs candidats de M. larici-populina et L. bicolor localisant dans le nucléole (Petre et al, 2015a; Chapitre IV de ce manuscrit) sont capables de se fixer sur séquence nucléique.

Dérégulation des voies de biosynthèses et de signalisation hormonales

Certains effecteurs de champignons phytopathogènes ciblent les voies hormonales des plantes qu'ils infectent. Chez *Ustilago maydis*, champignon pathogène du maïs, l'effecteur Shy1 possède une activité salicylate hydroxylase lui permettant de dégrader l'acide salicylique, phytohormone fortement impliquée dans les réactions de défenses (Yan & Dong, 2014) mais



Figure 7 : Diversité de cibles chez les effecteurs de microorganismes pathogènes filamenteux. Les effecteurs sécrétés par les microorganismes filamenteux pathogènes (champignons et oomycètes) sont capables d'interagir avec une grande variété de cibles de nature nucléique (ADN et ARN), protéique (protéases, répresseur transcriptionnelle), polysaccharidique (chitine) ou des précurseurs d'hormones. Tiré de Rovenich et al, 2014.



Nature Reviews | Genetics

Figure 8 : **Régulation des voies hormonales par le protéasome 26S**. Les voies hormonales de l'auxine, acide gibbérellique, acide jasmonique et éthylène utilisent toutes un système de régulation basé sur la présence de répresseur transcriptionnel dégradé par le protéasome 26S en présence de l'hormone. Tiré de Wolters & Jürgens, 2009.

aussi dans des processus de croissance et développement (Rivas-San Vicente & Plasencia, 2011). Chez le même agent pathogène, l'effecteur Cmu1 convertit le chorismate (un précurseur de l'acide salicylique) en phéphrénate par l'intermédiaire de son activité chorismate mutase. Ces deux effecteurs perturbent donc le métabolisme de l'acide salicylique en ciblant directement l'hormone ou un de ses précurseurs (par une intervention sur la voie de biosynthèse). Le champignon nécrotrophe Botrytis cinerea sécréte un exopolysaccharide (composé de $\beta(1-3)(1-6)$ -D-glucanes) visant à stimuler la voie de l'acide salicylique, entrainant une répression de la voie de signalisation dépendante de l'acide jasmonique (El Oirdi, 2011). Le champignon phytopathogène, dans ce cas, exploite un mécanisme de régulation préexistant chez la plante. Cette régulation se base sur la présence d'une protéine répresseur (JAZ, DELLA, Aux-IAA, EIN3) qui séquestre les facteurs transcriptionelles (ARF, PIF, MYC2, EIN3, BIC2) nécessaires à la transcription des gènes cibles. La fixation de l'hormone sur le répresseur va favoriser l'assemblage d'un complexe protéique visant à ubiquitinyler le répresseur afin qu'il soit dégradé par le protéasome 26S. Une fois dégradé, le facteur de transcription est libéré et peut se fixer sur les séquences promotrices des gènes cibles (Figure 8). Là aussi, les données disponibles proviennent majoritairement d'effecteurs bactériens (Kazan & Lyons, 2014) ciblant les protéines répresseurs de ces voies hormonales pour favoriser leur dégradation (Cui et al, 2013).

En conclusion de cette partie, les effecteurs déjà caractérisés chez les champignons filamenteux visent à altérer les activités enzymatiques (chitinases, protéases, péroxydases), les éliciteurs de réactions de défenses (chitine, potentiellement les β -glucanes), la signalisation hormonale et l'expression génique. D'autres effecteurs sont étudiés à l'heure actuelle mais sans que l'on possède pour l'instant leur mécanisme d'action détaillé. C'est le cas de l'effecteur ToxA du champignon nécrotrophe *Pyrenophora tritici-repentis*, localisant dans les chloroplastes (Manning & Ciufetti, 2005). ToxA interagit avec la protéine végétale ToxABP1 (Manning et al, 2007), orthologue d'une protéine d'*A. thaliana* impliquée dans le processus de formation des thylakoïdes, mais l'action précise de ToxA sur ToxABP1 reste indéterminée (Manning et al, 2010).

Quid des effecteurs chez les symbiotes ?

La recherche sur les protéines effectrices a démarrées à partir du concept de Flor (1970) sur la relation gène pour gène. La grande majorité des travaux réalisés sur les effecteurs aujourd'hui concernent les effecteurs présents chez les microorganismes phytopathogènes, en lien avec leur implication forte dans la virulence de ces microorganismes. Néanmoins, il existe maintenant des microorganismes modèles non pathogènes étudiés pour leur capacité à utiliser des protéines effectrices comme moyen de communication et stratégie d'interaction. Outre les champignons mycorhiziens L. bicolor et R. irregularis décrits dans le chapitre précédent, le champignon Piriformospora indica, un champignon mutualiste endophyte de l'ordre des Sebacinales, possèdent lui aussi des protéines effectrices (Raffiqi et al, 2013 ; Akum et al, 2015) afin de promouvoir la symbiose mutualiste qu'il met en place avec une très large gamme d'hôte (Qiang et al, 2012). Cette manipulation de l'hôte végétal semble notamment impacter les voies hormonales de régulation de l'acide jasmonique et gibbérellique ainsi que la voie de l'auxine (Schaffer et al, 2009). Chez les champignons, seul L. bicolor et R. irregularis sont rapporté comme utilisant des protéines effectrices ciblant respectivement les voies de l'acide jasmonique (Plett et al, 2014) et de l'éthylène (Kloppholz et al, 2011). La recherche sur les protéines effectrices ne se limite donc pas aux organismes pathogènes et s'intéresse aux mécanismes de translocation, à la localisation et aux fonctions des effecteurs, en différenciant les effecteurs présents dans la zone apoplastique des effecteurs actifs dans le cytoplasme. Il existe donc des similarités entre les microorganismes mutualistes et phytopathogènes dans leur stratégie de colonisation de l'hôte végétal. Il y a néanmoins un manque de données concernant les effecteurs d'organismes filamenteux, qu'ils soient des champignons ou des oomycètes, particulièrement ceux ayant un style de vie non pathogène. Les recherches actuelles sur les champignons ectomycorhiziens étudient donc la diversité de fonctions et de localisations d'effecteurs candidats, dans le but d'élucider les similitudes et divergence existant entre les effecteurs de champignons mutualistes et les champignons pathogènes.

Références

- Akum, F. N., Steinbrenner, J., Biedenkopf, D., Imani, J., and Kogel, K.-H. 2015. The Piriformospora indica effector PIIN 08944 promotes the mutualistic Sebacinalean symbiosis. Front. Plant Sci. 6:1–12
- Baptista, P., Martins, A., Pais, M. S., Tavares, R. M., & Lino-Neto, T. (2007). Involvement of reactive oxygen species during early stages of ectomycorrhiza establishment between *Castanea sativa* and *Pisolithus tinctorius*. *Mycorrhiza*, 17(3), 185–193. http://doi.org/10.1007/s00572-006-0091-4
- Boch, J., and Bonas, U. 2010. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. Annu. Rev. Phytopathol. 48:419–36
- Bogdanove, a. J., and Voytas, D. F. 2011. TAL Effectors: Customizable Proteins for DNA Targeting. Science (80). 333:1843–1846
- Bozkurt, T. O., Schornack, S., Win, J., Shindo, T., Ilyas, M., Oliva, R., Cano, L. M., Jones, a. M. E., Huitema, E., van der Hoorn, R. a. L., and Kamoun, S. 2011. Phytophthora infestans effector AVRblb2 prevents secretion of a plant immune protease at the haustorial interface. Proc. Natl. Acad. Sci. 108:20832–20837
- van den Burg, H. a, Harrison, S. J., Joosten, M. H. a J., Vervoort, J., and de Wit, P. J. G. M. 2006. Cladosporium fulvum Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. Mol. Plant. Microbe. Interact. 19:1420–1430
- Caillaud, M. C., Piquerez, S. J. M., Fabro, G., Steinbrenner, J., Ishaque, N., Beynon, J., and Jones, J. D. G. 2012. Subcellular localization of the Hpa RxLR effector repertoire identifies a tonoplast-associated protein HaRxL17 that confers enhanced plant susceptibility. Plant J. 69:252–265
- Caillaud, M.-C., Wirthmueller, L., Sklenar, J., Findlay, K., Piquerez, S. J. M., Jones, A. M. E., Robatzek, S., Jones, J. D. G., and Faulkner, C. 2014. The Plasmodesmal Protein PDLP1 Localises to Haustoria-Associated Membranes during Downy Mildew Infection and Regulates Callose Deposition. PLoS Pathog. 10:e1004496
- Cui, F., Wu, S., Sun, W., Coaker, G., Kunkel, B., He, P., and Shan, L. 2013. The Pseudomonas syringae type III effector AvrRpt2 promotes pathogen virulence via stimulating Arabidopsis auxin/indole acetic acid protein turnover. Plant Physiol. 162:1018–29
- Fesel, P. H., and Zuccaro, A. 2015. B-glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. Fungal Genet. Biol.
- Fester, T., & Hause, G. (2005). Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. Mycorrhiza, 15(5), 373–379. http://doi.org/10.1007/s00572-005-0363-4
- Giraldo, M. C., and Valent, B. 2013. Filamentous plant pathogen effectors in action. Nat. Rev. Microbiol. 11:800-14
- de Jonge, R., van Esse, H. P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M. H. a J., and Thomma, B. P. H. J. 2010. Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitintriggered immunity in plants. Science. 329:953–955
- Kale, S. D., Gu, B., Capelluto, D. G. S., Dou, D., Feldman, E., Rumore, A., Arredondo, F. D., Hanlon, R., Fudal, I., Rouxel, T., Lawrence, C. B., Shan, W., and Tyler, B. M. 2010. External Lipid PI3P Mediates Entry of Eukaryotic Pathogen Effectors into Plant and Animal Host Cells. Cell. 142:284–295
- Kaschani, F., Shabab, M., Bozkurt, T., Shindo, T., Schornack, S., Gu, C., Ilyas, M., Win, J., Kamoun, S., and van der Hoorn, R. A. L. 2010. An effector-targeted protease contributes to defense against Phytophthora infestans and is under diversifying selection in natural hosts. Plant Physiol. 154:1794–804
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., and Bonas, U. 2007. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. Science. 318:648–651
- Kazan, K., and Lyons, R. 2014. Intervention of Phytohormone Pathways by Pathogen Effectors. Plant Cell. 26:2285–2309
- Khang, C. H., Berruyer, R., Giraldo, M. C., Kankanala, P., Park, S.-Y., Czymmek, K., Kang, S., and Valent, B. 2010. Translocation of Magnaporthe oryzae effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell movement. Plant Cell. 22:1388–1403
- Kloppholz, S., Kuhn, H., and Requena, N. 2011. A Secreted Fungal Effector of Glomus intraradices Promotes Symbiotic Biotrophy. Curr. Biol. 21:1204–1209
- Li, Y., Moore, R., Guinn, M., and Bleris, L. 2012. Transcription activator-like effector hybrids for conditional control and rewiring of chromosomal transgene expression. Sci. Rep. 2:897
- Liu, W., Rudis, M. R., Peng, Y., Mazarei, M., Millwood, R. J., Yang, J. P., Xu, W., Chesnut, J. D., and Stewart, C. N. 2014. Synthetic TAL effectors for targeted enhancement of transgene expression in plants. Plant Biotechnol. J. 12:436–446
- Malinovsky, F. G., Fangel, J. U., and Willats, W. G. T. 2014. The role of the cell wall in plant immunity. Front. Plant Sci. 5:178
- Manning, V. a, Hardison, L. K., and Ciuffetti, L. M. 2007. Ptr ToxA interacts with a chloroplast-localized protein. Mol. Plant. Microbe. Interact. 20:168–177

- Manning, V. A., Chu, A. L., Scofield, S. R., and Ciuffetti, L. M. 2010. Intracellular expression of a hostselective toxin, ToxA, in diverse plants phenocopies silencing of a ToxA-interacting protein, ToxABP1. New Phytol. 187:1034–1047
- Marshall, R., Kombrink, A., Motteram, J., Loza-Reyes, E., Lucas, J., Hammond-Kosack, K. E., Thomma, B. P. H. J., and Rudd, J. J. 2011. Analysis of two in planta expressed LysM effector homologs from the fungus Mycosphaerella graminicola reveals novel functional properties and varying contributions to virulence on wheat. Plant Physiol. 156:756–69
- McLellan, H., Boevink, P. C., Armstrong, M. R., Pritchard, L., Gomez, S., Morales, J., Whisson, S. C., Beynon, J. L., and Birch, P. R. J. 2013. An RxLR Effector from Phytophthora infestans Prevents Re-localisation of Two Plant NAC Transcription Factors from the Endoplasmic Reticulum to the Nucleus. PLoS Pathog. 9
- Mentlak, T. a., Kombrink, a., Shinya, T., Ryder, L. S., Otomo, I., Saitoh, H., Terauchi, R., Nishizawa, Y., Shibuya, N., Thomma, B. P. H. J., and Talbot, N. J. 2012. Effector-Mediated Suppression of Chitin-Triggered Immunity by Magnaporthe oryzae Is Necessary for Rice Blast Disease. Plant Cell. 24:322–335
- Monaghan, J., and Zipfel, C. 2012. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. Curr. Opin. Plant Biol. 15:349–357
- El Oirdi, M., El Rahman, T. A., Rigano, L., El Hadrami, A., Rodriguez, M. C., Daayf, F., Vojnov, A., and Bouarab, K. 2011. Botrytis cinerea manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. Plant Cell. 23:2405–2421
- Petre, B., and Kamoun, S. 2014. How Do Filamentous Pathogens Deliver Effector Proteins into Plant Cells? J.M. McDowell, ed. PLoS Biol. 12:e1001801
- Petre, B., Lorrain, C., Saunders, D. G. O., Win, J., Sklenar, J., Duplessis, S., and Kamoun, S. 2015a. Rust fungal effectors mimic host transit peptides to translocate into chloroplasts. Cell. Microbiol.
- Petre, B., Saunders, D. G. O., and Sklenar, J. 2015b. Candidate Effector Proteins of the Rust Pathogen Melampsora larici-populina Target Diverse Plant Cell Compartments. Mol. Plant-Microbe Interact. 28:689–700
- Plett, J. M., Daguerre, Y., Wittulsky, S., Vayssières, A., Deveau, A., Melton, S. J., Kohler, A., Morrell-Falvey, J. L., Brun, A., Veneault-Fourrey, C., and Martin, F. 2014. Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus Laccaria bicolor stabilizes the Populus JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111:8299–304
- Plett, J. M., Kemppainen, M., Kale, S. D., Kohler, A., Legu??, V., Brun, A., Tyler, B. M., Pardo, A. G., and Martin, F. 2011. A secreted effector protein of laccaria bicolor is required for symbiosis development. Curr. Biol. 21:1197–1203
- Qiang, X., Weiss, M., Kogel, K. H., and Schäfer, P. 2012. Piriformospora indica-a mutualistic basidiomycete with an exceptionally large plant host range. Mol. Plant Pathol. 13:508–518
- Qiao, Y., Shi, J., Zhai, Y., Hou, Y., and Ma, W. 2015. Phytophthora effector targets a novel component of small RNA pathway in plants to promote infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112:5850–5
- Rafiqi, M., Jelonek, L., Akum, N. F., Zhang, F., and Kogel, K.-H. 2013. Effector candidates in the secretome of Piriformospora indica, a ubiquitous plant-associated fungus. Front. Plant Sci. 4:1–5
- Ramirez-Garcés, D., Camborde, L., Pel, M. J. C., Jauneau, A., Martinez, Y., Néant, I., Leclerc, C., Moreau, M., Dumas, B., and Gaulin, E. 2015. CRN13 candidate effectors from plant and animal eukaryotic pathogens are DNA-binding proteins which trigger host DNA damage response. New Phytol.
- Rivas, S., and Genin, S. 2011. A Plethora of Virulence Strategies Hidden Behind Nuclear Targeting of Microbial Effectors. Front. Plant Sci. 2:1–20
- Rivas-San Vicente, M., and Plasencia, J. 2011a. Salicylic acid beyond defence: Its role in plant growth and development. J. Exp. Bot. 62:3321–3338
- Rivas-San Vicente, M., and Plasencia, J. 2011b. Salicylic acid beyond defence: Its role in plant growth and development. J. Exp. Bot. 62:3321–3338
- Rovenich, H., Boshoven, J. C., and Thomma, B. P. H. J. 2014. Filamentous pathogen effector functions: Of pathogens, hosts and microbiomes. Curr. Opin. Plant Biol. 20:96–103
- Sánchez-Vallet, A., Saleem-Batcha, R., Kombrink, A., Hansen, G., Valkenburg, D. J., Thomma, B. P. H. J., and Mesters, J. R. 2013. Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization. Elife. 2013
- Schäfer, P., Pfiffi, S., Voll, L. M., Zajic, D., Chandler, P. M., Waller, F., Scholz, U., Pons-Kühnemann, J., Sonnewald, S., Sonnewald, U., and Kogel, K.-H. 2009. Phytohormones in plant root-Piriformospora indica mutualism. Plant Signal. Behav. 4:669–71
- Schornack, S., van Damme, M., Bozkurt, T. O., Cano, L. M., Smoker, M., Thines, M., Gaulin, E., Kamoun, S., and Huitema, E. 2010. Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107:17421–17426

- Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., Desaki, Y., Ishii-Minami, N., Nishizawa, Y., Minami, E., Okada, K., Yamane, H., Kaku, H., and Shibuya, N. 2010. Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. Plant J. 64:204–214
- Shinya, T., Motoyama, N., Ikeda, A., Wada, M., Kamiya, K., Hayafune, M., Kaku, H., and Shibuya, N. 2012. Functional characterization of CEBiP and CERK1 homologs in arabidopsis and rice reveals the presence of different chitin receptor systems in plants. Plant Cell Physiol. 53:1696–1706
- Song, J., Win, J., Tian, M., Schornack, S., Kaschani, F., Ilyas, M., van der Hoorn, R. a L., and Kamoun, S. 2009. Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106:1654–1659
- Song, T., Ma, Z., Shen, D., Li, Q., Li, W., Su, L., Ye, T., Zhang, M., Wang, Y., and Dou, D. 2015. An Oomycete CRN Effector Reprograms Expression of Plant HSP Genes by Targeting their Promoters. PLoS Pathog. 11
- Tian, M., Benedetti, B., and Kamoun, S. 2005. A Second Kazal-like protease inhibitor from Phytophthora infestans inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69B of tomato. Plant Physiol. 138:1785–93
- Tian, M., Huitema, E., Da Cunha, L., Torto-Alalibo, T., and Kamoun, S. 2004. A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from Phytophthora infestans targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. J. Biol. Chem. 279:26370–26377
- Tian, M., Win, J., Song, J., van der Hoorn, R., van der Knaap, E., and Kamoun, S. 2007. A Phytophthora infestans cystatin-like protein targets a novel tomato papain-like apoplastic protease. Plant Physiol. 143:364–77
- Vargas, W. A., Sanz-Martín, J. M., Rech, G. E., Armijos-Jaramillo, V. D., Rivera, L. P., Echeverria, M. M., Díaz-Mínguez, J. M., Thon, M. R., and Sukno, S. A. 2015. A fungal effector with host nuclear localization and DNA-binding properties is required for maize anthracnose development. Mol. Plant. Microbe. Interact.
- Wawra, S., Djamei, A., Albert, I., Nürnberger, T., Kahmann, R., and van West, P. 2013. In Vitro Translocation Experiments with RxLR-Reporter Fusion Proteins of Avr1b from Phytophthora sojae and AVR3a from Phytophthora infestans Fail to Demonstrate Specific Autonomous Uptake in Plant and Animal Cells. Mol. Plant. Microbe. Interact. 26:528–36
- Yan, S., and Dong, X. 2014. Perception of the plant immune signal salicylic acid. Curr. Opin. Plant Biol. 20:64– 68

Chapitre II

Objectifs de thèse


Figure 9 : **Analyses fonctionnelles précédemment menées sur les MiSSPs de** *L. bicolor*. Depuis l'obtention du génome de *L. bicolor* en 2008, plusieurs démarches ont été mises en œuvre pour étudier l'implication des MiSSPs dans la symbiose ectomycorhizienne.

Objectifs de thèse

Les premières recherches concernant les MiSSPs se sont focalisées sur les MiSSPs les plus fortement induites lors de l'interaction symbiotique, telles que MiSSP7, MiSSP8, MiSSP17 et MiSSP22 (**Figure 9**). Ces travaux visaient à vérifier la sécrétion effective de ces MiSSPs dans le milieu extérieur, ainsi qu'à rechercher d'éventuels partenaires protéiques cibles d'interactions (thèse de Yohann Daguerre). De plus, une collaboration avec le laboratoire du Professeur Alejandro Pardo (Université de Quilmes, Argentine), a permis l'obtention de lignées de mutants ARNi de *L. bicolor* S238N affectés dans l'expression des gènes codant les MiSSPs précédemment citées et suggère que certains MiSSPs sont des effecteurs de symbiose.

Les recherches effectuées se sont alors focalisées sur la protéine MiSSP7 dont le gène était le plus fortement surexprimé en condition de symbiose et ont abouti à la mise en évidence d'une interaction entre MiSSP7 et la protéine PtJAZ6 du Peuplier résultant en la stabilisation de PtJAZ6 par MiSSP7 durant la symbiose ectomycorhizienne (Plett, Daguerre, Wittulsky et al 2014). Cette étude démontre que MiSSP7 est un des acteurs majeurs dans l'établissement de l'interaction symbiotique, notamment en altérant la régulation de la voie de signalisation de l'acide jasmonique au cours de la symbiose (Plett et al, 2011 ; Daguerre, 2014), un mécanisme alors rencontré uniquement chez les microorganismes phytopathogènes (El Oirdi et al, 2011). Néanmoins, cet effecteur ne peut être considéré comme représentatif de l'action de l'ensemble des MiSSPs surexprimées en contexte de symbiose, les effecteurs de microorganismes pathogènes étant connus pour posséder une grande variabilité de cibles et de localisations. On peut donc émettre l'hypothèse que les effecteurs de *Laccaria bicolor* aurait eux aussi une diversité de localisation et de fonction qu'il est nécessaire d'étudier pour mieux comprendre comment *L. bicolor* établi une symbiose avec son hôte végétal

Néanmoins, il manquait une analyse détaillée de la composition du sécrétome des champignons ectomycorhiziens, notamment l'importance qu'occupent les petites protéines sécrétées (SSPs) dans ces sécrétomes. Bien que la protéine MiSSP7 ait été démontrée comme étant capable d'être adressée au noyau de la cellule végétale, la localisation subcellulaire *in planta* d'autres effecteurs de symbiose est inconnue, rendant difficile la compréhension du dialogue moléculaire entre *L. bicolor* et son hôte ainsi que l'impact des MiSSPs dans ce dialogue. De plus, l'analyse fonctionnelle a permis de mettre en évidence des interactants

potentiels par double hybride en levure pour deux effecteurs candidats mais sans apporter davantage d'informations sur les fonctions de ces effecteurs.



Les objectifs de ma thèse ont donc été définis de manière à apporter des données expérimentales concernant (1) la composition du sécrétome des champignons ectomycorhiziens, (2) la localisation subcellulaire d'un jeu d'effecteurs MiSSPs potentiels et (3) la fonction de l'effecteur MiSSP8. Ces trois problématiques de recherches ont été abordées avec une approche multidisciplinaire associant approches bioinformatiques et approches fonctionnelles (**Encadré 1**).

1. Y-a t-il des différences entre le sécrétome des champignons ECM et le sécrétome des champignons saprotrophes? Que représentent les SSPs dans ces sécrétomes ? Existe t-il des SSPs partagées entre champignons saprotrophes et ectomycorhiziens.

Le premier objectif de ma thèse est de réaliser une analyse comparative *in silico* de 49 sécrétomes de champignons. Le jeu de génomes, composé majoritairement de génomes de champignons ectomycorhiziens (11) et saprotrophes (28), est complété par des sécrétomes de champignons pathogènes, mycoparasite, mycorhizien à éricoïde et orchidées ainsi qu'une levure, afin de mieux évaluer l'impact du style de vie fongique sur la composition du sécrétome. L'analyse se focalise en particulier sur la recherche de SSPs partagées entre champignons saprotrophes et ectomycorhiziens ou, au contraire, spécifiques de l'un des deux styles de vies. L'analyse de ces sécrétomes vise à mieux appréhender la proportion de SSPs présente dans les sécrétomes de champignons et à identifier des effecteurs candidats spécifiques au style de vie ectomycorhizien. Ces résultats ont été publiés dans le journal en ligne Frontiers in Microbiology.

Où sont localisés les MiSSPs de L. bicolor dans la cellule végétale ?

Le second objectif de ma thèse vise à évaluer la capacité de onze effecteurs potentiels MiSSPs de *L. bicolor* à être adressés à des compartiments subcellulaires distincts lorsqu'exprimés dans la cellule végétale, permettant d'évaluer la capacité des MiSSPs à cibler le métabolisme végétal lors de la symbiose de manière similaire aux effecteurs de pathogènes. Cette démarche devrait aussi permettre d'identifier des effecteurs potentiels qui pourront par la suite faire l'objet d'une analyse fonctionnelle afin d'élucider leur cible et leur mécanisme d'interaction, dans la continuité des travaux précédemment réalisés sur l'effecteur MiSSP7. L'utilisation d'un système hétérologue pour l'expression des MiSSPs, à savoir la plante modèle *Nicotiana benthamiana*, permet d'obtenir dans un délai réduit des informations quant à la localisation subcellulaires d'effecteurs potentiels. L'application de cette démarche

permettra aussi d'évaluer la fiabilité d'un système hétérologue pour étudier des effecteurs candidats d'un symbiote mycorhizien.

Quel est l'interactant de MiSSP8 ? D'où provient son motif répété ?

Enfin, le troisième objectif de ma thèse est de poursuivre l'analyse fonctionnelle de l'effecteur MiSSP8 de *L. bicolor* en associant des démarches de biologie moléculaire, biochimie, biophysique et immunologie afin d'identifier son interactant et poursuivre son analyse fonctionnelle. MiSSP8 est la seconde MiSSPs la plus induite durant la symbiose (Martin et al, 2008) et il a été montré que les mutants ARNi pour *missp8* ne sont pas capables de former des mycorhizes. Les précédents résultats obtenus ont aussi mis en évidence des partenaires d'interactions protéiques qu'il est nécessaire de confirmer par l'intermédiaire d'une méthode alternative. MiSSP8 contient enfin un motif répété en C-terminale dans sa séquence non référencé dans les bases de données existantes et potentiellement impliqué dans sa fonction.

Présentation du modèle d'étude

Mon projet de thèse s'inscrit dans un programme de recherche s'intéressant aux interactions biotrophes entre les microorganismes et les arbres. Il consiste plus particulièrement en l'étude de l'interaction mutualiste établie entre le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor* et le peuplier, *Populus trichocarpa* ou le sapin de Douglas *Pseudotsuga menziesii*.

1. Populus trichocarpa

Le Peuplier est un arbre modèle de la famille des Salicacées (Angiospermes) présent dans l'ensemble de l'hémisphère Nord. Cet arbre est cultivé, notamment en France, du fait de sa croissance rapide et de ses applications (industrie du papier, biocarburant). Son génome est le premier génome d'arbre disponible (Tuskan et al, 2006), faisant de cet arbre un organisme modèle aussi bien en biologie végétale que dans le domaine des interactions plantesmicroorganismes (Jansson & Douglas, 2007 ; Cronk, 2005). Le Peuplier est en effet à la fois un hôte *de L. bicolor* mais aussi du champignon pathogène *Melampsora larici-populina*, biotrophe obligatoire possédant un cycle hétéroécique constitué d'une phase biotrophe principale sur le Peuplier avec une phase de latence sur le mélèze utilisé comme hôte alternant. Le taux de mycorhization de *L. bicolor* avec *Populus tremula x alba* 717-1-B-4 est inférieur à celui observé chez l'hôte naturel de *L. bicolor*, le sapin de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) (Plett et al, 2015). L'hybride *Populus tremula x alba* cultivar 717-1-B-4 présente la particularité d'être transformable, ce qui en fait un modèle utilisable pour des approches de biologie moléculaire et de génétique inverse (Song et al, 2006).

2. Pseudotsuga menziesii

Le Pin douglas fait partie de la famille des Pinacées (Gymnospermes) et se trouve essentiellement en Amérique du Nord. Bien qu'étant l'hôte naturel de *L. bicolor*, avec un fort taux de mycorhization en serre, son génome n'est, à l'heure actuelle, pas encore disponible.



Figure 10 : *Laccaria bicolor* et ses hôtes végétaux. Le champignon basidiomycète *Laccaria bicolor* et ses deux hôtes végétaux, le Peuplier *Populus trichocarpa* et le sapin de Douglas *Pseudotsuga menziesii* dans leur milieu naturel. Photos tirées de wikimedia.org et Yohann Daguerre.

3. Laccaria bicolor

Dans la continuité de l'effort de séquençage mis en œuvre sur le Peuplier, le laboratoire d'Ecogénomique des interactions a coordonné le séquençage du génome de *Laccaria bicolor*, en collaboration avec le Joint Genome Institute, donnant ainsi accès au premier génome de champignon ectomycorhizien (Martin et al, 2008). *Laccaria bicolor* est un champignon basidiomycète ectomycorhizien rencontré dans les forêts tempérées, en association avec le sapin de Douglas, son hôte naturel (**Figure 10**). Il fait partie de l'ordre des Agaricales, plus spécifiquement de la famille des Hydnangiacées. Son cycle de vie est similaire au cycle de vie des autres champignons ectomycorhiziens basidiomycètes, avec une phase pré-symbiotique précédent la colonisation de la racine avant de former un corps fructifère via l'apport de carbone fourni par la plante au cours de la symbiose.

L'acquisition des génomes de l'hôte et du symbiote ectomycorhizien a ouvert la voie à des études de post-génomiques plus ciblées, notamment l'analyse des gènes fortement et spécifiquement régulés pendant la symbiose et codant des petites protéines sécrétées dénommées alors MiSSPs pour Mycorrhiza induced Small Secreted Proteins (Martin et al, 2008). Des études transcriptomiques utilisant des puces à ADN sur l'interaction *L. bicolor/P. menziesii* ont permis de mettre en évidence l'existence de gènes spécifiquement exprimés par *L. bicolor* pendant la symbiose avec *P. menziesii* et pas avec *P. trichocarpa*, ainsi qu'un core régulon de gènes de *L. bicolor* surexprimés aussi bien chez *P. trichocarpa* que *P. menziesii*, (Plett et al, 2015). Parmi ce core régulon se trouve plusieurs protéines MiSSPs étudiées au laboratoire, notamment MiSSP7, MiSSP8 et MiSSP17, laissant penser que leurs fonctions sont impliquées dans des processus clés de mise en place de la symbiose plutôt que dans les processus qui contrôlent la spécificité d'hôte.

4. Références

- Akum, F. N., Steinbrenner, J., Biedenkopf, D., Imani, J., and Kogel, K.-H. 2015. The Piriformospora indica effector PIIN_08944 promotes the mutualistic Sebacinalean symbiosis. Front. Plant Sci. 6:1–12
- Boch, J., and Bonas, U. 2010. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. Annu. Rev. Phytopathol. 48:419–36
- Bogdanove, a. J., and Voytas, D. F. 2011. TAL Effectors: Customizable Proteins for DNA Targeting. Science (80-.). 333:1843–1846
- Bozkurt, T. O., Schornack, S., Win, J., Shindo, T., Ilyas, M., Oliva, R., Cano, L. M., Jones, a. M. E., Huitema, E., van der Hoorn, R. a. L., and Kamoun, S. 2011. Phytophthora infestans effector AVRblb2 prevents secretion of a plant immune protease at the haustorial interface. Proc. Natl. Acad. Sci. 108:20832–20837
- van den Burg, H. a, Harrison, S. J., Joosten, M. H. a J., Vervoort, J., and de Wit, P. J. G. M. 2006. Cladosporium fulvum Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. Mol. Plant. Microbe. Interact. 19:1420–1430
- Caillaud, M. C., Piquerez, S. J. M., Fabro, G., Steinbrenner, J., Ishaque, N., Beynon, J., and Jones, J. D. G. 2012. Subcellular localization of the Hpa RxLR effector repertoire identifies a tonoplast-associated protein HaRxL17 that confers enhanced plant susceptibility. Plant J. 69:252–265
- Caillaud, M.-C., Wirthmueller, L., Sklenar, J., Findlay, K., Piquerez, S. J. M., Jones, A. M. E., Robatzek, S., Jones, J. D. G., and Faulkner, C. 2014. The Plasmodesmal Protein PDLP1 Localises to Haustoria-Associated Membranes during Downy Mildew Infection and Regulates Callose Deposition. PLoS Pathog. 10:e1004496
- Cui, F., Wu, S., Sun, W., Coaker, G., Kunkel, B., He, P., and Shan, L. 2013. The Pseudomonas syringae type III effector AvrRpt2 promotes pathogen virulence via stimulating Arabidopsis auxin/indole acetic acid protein turnover. Plant Physiol. 162:1018–29
- Fesel, P. H., and Zuccaro, A. 2015. ??-glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. Fungal Genet. Biol.
- Giraldo, M. C., and Valent, B. 2013. Filamentous plant pathogen effectors in action. Nat. Rev. Microbiol. 11:800–14
- de Jonge, R., van Esse, H. P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M. H. a J., and Thomma, B. P. H. J. 2010. Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. Science. 329:953–955
- Kale, S. D., Gu, B., Capelluto, D. G. S., Dou, D., Feldman, E., Rumore, A., Arredondo, F. D., Hanlon, R., Fudal, I., Rouxel, T., Lawrence, C. B., Shan, W., and Tyler, B. M. 2010. External Lipid PI3P Mediates Entry of Eukaryotic Pathogen Effectors into Plant and Animal Host Cells. Cell. 142:284–295
- Kaschani, F., Shabab, M., Bozkurt, T., Shindo, T., Schornack, S., Gu, C., Ilyas, M., Win, J., Kamoun, S., and van der Hoorn, R. A. L. 2010. An effector-targeted protease contributes to defense against Phytophthora infestans and is under diversifying selection in natural hosts. Plant Physiol. 154:1794–804
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., and Bonas, U. 2007. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. Science. 318:648–651
- Kazan, K., and Lyons, R. 2014. Intervention of Phytohormone Pathways by Pathogen Effectors. Plant Cell. 26:2285–2309
- Khang, C. H., Berruyer, R., Giraldo, M. C., Kankanala, P., Park, S.-Y., Czymmek, K., Kang, S., and Valent, B. 2010. Translocation of Magnaporthe oryzae effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell movement. Plant Cell. 22:1388–1403

- Kloppholz, S., Kuhn, H., and Requena, N. 2011. A Secreted Fungal Effector of Glomus intraradices Promotes Symbiotic Biotrophy - Supp. nformations. Curr. Biol. 21:1204– 1209
- Li, Y., Moore, R., Guinn, M., and Bleris, L. 2012. Transcription activator-like effector hybrids for conditional control and rewiring of chromosomal transgene expression. Sci. Rep. 2:897
- Liu, W., Rudis, M. R., Peng, Y., Mazarei, M., Millwood, R. J., Yang, J. P., Xu, W., Chesnut, J. D., and Stewart, C. N. 2014. Synthetic TAL effectors for targeted enhancement of transgene expression in plants. Plant Biotechnol. J. 12:436–446
- Malinovsky, F. G., Fangel, J. U., and Willats, W. G. T. 2014. The role of the cell wall in plant immunity. Front. Plant Sci. 5:178
- Manning, V. a, Hardison, L. K., and Ciuffetti, L. M. 2007. Ptr ToxA interacts with a chloroplast-localized protein. Mol. Plant. Microbe. Interact. 20:168–177
- Manning, V. A., Chu, A. L., Scofield, S. R., and Ciuffetti, L. M. 2010. Intracellular expression of a host-selective toxin, ToxA, in diverse plants phenocopies silencing of a ToxA-interacting protein, ToxABP1. New Phytol. 187:1034–1047
- Marshall, R., Kombrink, A., Motteram, J., Loza-Reyes, E., Lucas, J., Hammond-Kosack, K. E., Thomma, B. P. H. J., and Rudd, J. J. 2011. Analysis of two in planta expressed LysM effector homologs from the fungus Mycosphaerella graminicola reveals novel functional properties and varying contributions to virulence on wheat. Plant Physiol. 156:756–69
- McLellan, H., Boevink, P. C., Armstrong, M. R., Pritchard, L., Gomez, S., Morales, J., Whisson, S. C., Beynon, J. L., and Birch, P. R. J. 2013. An RxLR Effector from Phytophthora infestans Prevents Re-localisation of Two Plant NAC Transcription Factors from the Endoplasmic Reticulum to the Nucleus. PLoS Pathog. 9
- Mentlak, T. a., Kombrink, a., Shinya, T., Ryder, L. S., Otomo, I., Saitoh, H., Terauchi, R., Nishizawa, Y., Shibuya, N., Thomma, B. P. H. J., and Talbot, N. J. 2012. Effector-Mediated Suppression of Chitin-Triggered Immunity by Magnaporthe oryzae Is Necessary for Rice Blast Disease. Plant Cell. 24:322–335
- Monaghan, J., and Zipfel, C. 2012. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. Curr. Opin. Plant Biol. 15:349–357
- El Oirdi, M., El Rahman, T. A., Rigano, L., El Hadrami, A., Rodriguez, M. C., Daayf, F., Vojnov, A., and Bouarab, K. 2011. Botrytis cinerea manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. Plant Cell. 23:2405–2421
- Petre, B., and Kamoun, S. 2014. How Do Filamentous Pathogens Deliver Effector Proteins into Plant Cells? J.M. McDowell, ed. PLoS Biol. 12:e1001801
- Petre, B., Lorrain, C., Saunders, D. G. O., Win, J., Sklenar, J., Duplessis, S., and Kamoun, S. 2015a. Rust fungal effectors mimic host transit peptides to translocate into chloroplasts. Cell. Microbiol.
- Petre, B., Saunders, D. G. O., and Sklenar, J. 2015b. Candidate Effector Proteins of the Rust Pathogen Melampsora larici-populina Target Diverse Plant Cell Compartments. Mol. Plant-Microbe Interact. 28:689–700
- Plett, J. M., Daguerre, Y., Wittulsky, S., Vayssières, A., Deveau, A., Melton, S. J., Kohler, A., Morrell-Falvey, J. L., Brun, A., Veneault-Fourrey, C., and Martin, F. 2014. Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus Laccaria bicolor stabilizes the Populus JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111:8299–304
- Plett, J. M., Kemppainen, M., Kale, S. D., Kohler, A., Legué, V., Brun, A., Tyler, B. M., Pardo, A. G., and Martin, F. 2011. A secreted effector protein of laccaria bicolor is required for symbiosis development. Curr. Biol. 21:1197–1203

- Qiang, X., Weiss, M., Kogel, K. H., and Schäfer, P. 2012. Piriformospora indica-a mutualistic basidiomycete with an exceptionally large plant host range. Mol. Plant Pathol. 13:508–518
- Qiao, Y., Shi, J., Zhai, Y., Hou, Y., and Ma, W. 2015. Phytophthora effector targets a novel component of small RNA pathway in plants to promote infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112:5850–5
- Rafiqi, M., Jelonek, L., Akum, N. F., Zhang, F., and Kogel, K.-H. 2013. Effector candidates in the secretome of Piriformospora indica, a ubiquitous plant-associated fungus. Front. Plant Sci. 4:1–5
- Ramirez-Garcés, D., Camborde, L., Pel, M. J. C., Jauneau, A., Martinez, Y., Néant, I., Leclerc, C., Moreau, M., Dumas, B., and Gaulin, E. 2015. CRN13 candidate effectors from plant and animal eukaryotic pathogens are DNA-binding proteins which trigger host DNA damage response. New Phytol.
- Rivas, S., and Genin, S. 2011. A Plethora of Virulence Strategies Hidden Behind Nuclear Targeting of Microbial Effectors. Front. Plant Sci. 2:1–20
- Rivas-San Vicente, M., and Plasencia, J. 2011a. Salicylic acid beyond defence: Its role in plant growth and development. J. Exp. Bot. 62:3321–3338
- Rivas-San Vicente, M., and Plasencia, J. 2011b. Salicylic acid beyond defence: Its role in plant growth and development. J. Exp. Bot. 62:3321–3338
- Rovenich, H., Boshoven, J. C., and Thomma, B. P. H. J. 2014. Filamentous pathogen effector functions: Of pathogens, hosts and microbiomes. Curr. Opin. Plant Biol. 20:96–103
- Sánchez-Vallet, A., Saleem-Batcha, R., Kombrink, A., Hansen, G., Valkenburg, D. J., Thomma, B. P. H. J., and Mesters, J. R. 2013. Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization. Elife. 2013
- Schäfer, P., Pfiffi, S., Voll, L. M., Zajic, D., Chandler, P. M., Waller, F., Scholz, U., Pons-Kühnemann, J., Sonnewald, S., Sonnewald, U., and Kogel, K.-H. 2009. Phytohormones in plant root-Piriformospora indica mutualism. Plant Signal. Behav. 4:669–71
- Schornack, S., van Damme, M., Bozkurt, T. O., Cano, L. M., Smoker, M., Thines, M., Gaulin, E., Kamoun, S., and Huitema, E. 2010. Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107:17421–17426
- Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., Desaki, Y., Ishii-Minami, N., Nishizawa, Y., Minami, E., Okada, K., Yamane, H., Kaku, H., and Shibuya, N. 2010. Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. Plant J. 64:204–214
- Shinya, T., Motoyama, N., Ikeda, A., Wada, M., Kamiya, K., Hayafune, M., Kaku, H., and Shibuya, N. 2012. Functional characterization of CEBiP and CERK1 homologs in arabidopsis and rice reveals the presence of different chitin receptor systems in plants. Plant Cell Physiol. 53:1696–1706
- Song, J., Win, J., Tian, M., Schornack, S., Kaschani, F., Ilyas, M., van der Hoorn, R. a L., and Kamoun, S. 2009. Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106:1654–1659
- Song, T., Ma, Z., Shen, D., Li, Q., Li, W., Su, L., Ye, T., Zhang, M., Wang, Y., and Dou, D. 2015. An Oomycete CRN Effector Reprograms Expression of Plant HSP Genes by Targeting their Promoters. PLoS Pathog. 11
- Tian, M., Benedetti, B., and Kamoun, S. 2005. A Second Kazal-like protease inhibitor from Phytophthora infestans inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69B of tomato. Plant Physiol. 138:1785–93

- Tian, M., Huitema, E., Da Cunha, L., Torto-Alalibo, T., and Kamoun, S. 2004. A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from Phytophthora infestans targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. J. Biol. Chem. 279:26370–26377
- Tian, M., Win, J., Song, J., van der Hoorn, R., van der Knaap, E., and Kamoun, S. 2007. A Phytophthora infestans cystatin-like protein targets a novel tomato papain-like apoplastic protease. Plant Physiol. 143:364–77
- Vargas, W. A., Sanz-Martín, J. M., Rech, G. E., Armijos-Jaramillo, V. D., Rivera, L. P., Echeverria, M. M., Díaz-Mínguez, J. M., Thon, M. R., and Sukno, S. A. 2015. A fungal effector with host nuclear localization and DNA-binding properties is required for maize anthracnose development. Mol. Plant. Microbe. Interact.
- Wawra, S., Djamei, A., Albert, I., Nürnberger, T., Kahmann, R., and van West, P. 2013. In Vitro Translocation Experiments with RxLR-Reporter Fusion Proteins of Avr1b from Phytophthora sojae and AVR3a from Phytophthora infestans Fail to Demonstrate Specific Autonomous Uptake in Plant and Animal Cells. Mol. Plant. Microbe. Interact. 26:528–36
- Yan, S., and Dong, X. 2014. Perception of the plant immune signal salicylic acid. Curr. Opin. Plant Biol. 20:64–68

Chapitre III

Analyse comparative de sécrétomes de champignons ectomycorhiziens et saprotrophes

Publication n°1

"Comparative analysis of secretomes from ectomycorrhizal fungal with an emphasis on small-secreted proteins"

Pellegrin C, Morin E, Martin F and Veneault-Fourrey C

Résumé: Ce chapitre présente une analyse comparative de l'ensemble des protéines prédites comme sécrétées, appelé sécrétome, comprenant 11 génomes de champignons ectomycorhiziens et 28 sécrétomes de champignons saprotrophes. Cette analyse vise à mieux comprendre l'influence du style de vie sur le sécrétome des champignons ectomycorhiziens. La comparaison des 49 sécrétomes révèle que le style de vie fongique influence le sécrétome dans sa composition et non dans sa taille, une grande majorité (74%) des sécrétomes analysés contenant entre 500 et 1000 protéines prédites comme sécrétées. De plus, les sécrétomes des champignons ectomycorhiziens possèdent des capacités protéasiques et lipasiques intactes par rapport aux autres champignons analysés. En revanche, plusieurs familles de CAZymes sécrétées impliquées dans la dégradation de la paroi végétale sont manquantes, confirmant de précédentes études génomiques. Une analyse de clustering ciblées sur les petites protéines sécrétées (SSPs) a permis d'identifier des SSPs fortement conservées (>70% d'identité) entre les champignons ectomycorhiziens et saprotrophes, ou au contraire spécifiques au style de vie ectomycorhizien. Certaines de ces SSPs ne possèdent pas d'annotations, faisant d'elles des effecteurs candidats potentiellement partagés par plusieurs champignons ectomycorhiziens. Cet article a été publié le 18 Novembre 2015 dans le journal Frontiers in Microbiology.





Comparative Analysis of Secretomes from Ectomycorrhizal Fungi with an Emphasis on Small-Secreted Proteins

Clement Pellegrin^{1, 2}, Emmanuelle Morin², Francis M. Martin² and Claire Veneault-Fourrey^{1, 2*}

¹ UMR 1136 Interactions Arbres/Microorganismes, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France, ² UMR 1136 Interactions Arbres/Microorganismes, Laboratoire d'Excellence ARBRE, Institut National de la Recherche Agronomique, INRA-Nancy, Champenoux, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Jean-Michel Ané, University of Wisconsin-Madison, USA

Reviewed by:

Pierre-Marc Delaux, John Innes Centre, France Kevin Garcia, University of Wisconsin-Madison, USA

> *Correspondence: Claire Veneault-Fourrey claire.fourrey@univ-lorraine.fr

Specialty section:

This article was submitted to Plant Biotic Interactions, a section of the journal Frontiers in Microbiology

Received: 15 September 2015 Accepted: 31 October 2015 Published: 18 November 2015

Citation:

Pellegrin C, Morin E, Martin FM and Veneault-Fourrey C (2015) Comparative Analysis of Secretomes from Ectomycorrhizal Fungi with an Emphasis on Small-Secreted Proteins. Front. Microbiol. 6:1278. doi: 10.3389/fmicb.2015.01278 Fungi are major players in the carbon cycle in forest ecosystems due to the wide range of interactions they have with plants either through soil degradation processes by litter decayers or biotrophic interactions with pathogenic and ectomycorrhizal symbionts. Secretion of fungal proteins mediates these interactions by allowing the fungus to interact with its environment and/or host. Ectomycorrhizal (ECM) symbiosis independently appeared several times throughout evolution and involves approximately 80% of trees. Despite extensive physiological studies on ECM symbionts, little is known about the composition and specificities of their secretomes. In this study, we used a bioinformatics pipeline to predict and analyze the secretomes of 49 fungal species, including 11 ECM fungi, wood and soil decayers and pathogenic fungi to tackle the following questions: (1) Are there differences between the secretomes of saprophytic and ECM fungi? (2) Are small-secreted proteins (SSPs) more abundant in biotrophic fungi than in saprophytic fungi? and (3) Are there SSPs shared between ECM, saprotrophic and pathogenic fungi? We showed that the number of predicted secreted proteins is similar in the surveyed species, independently of their lifestyle. The secretome from ECM fungi is characterized by a restricted number of secreted CAZymes, but their repertoires of secreted proteases and lipases are similar to those of saprotrophic fungi. Focusing on SSPs, we showed that the secretome of ECM fungi is enriched in SSPs compared with other species. Most of the SSPs are coded by orphan genes with no known PFAM domain or similarities to known sequences in databases. Finally, based on the clustering analysis, we identified shared- and lifestyle-specific SSPs between saprotrophic and ECM fungi. The presence of SSPs is not limited to fungi interacting with living plants as the genome of saprotrophic fungi also code for numerous SSPs. ECM fungi shared lifestyle-specific SSPs likely involved in symbiosis that are good candidates for further functional analyses.

Keywords: ectomycorrhizal, saprotrophs, secretomics, small-secreted proteins, symbiosis, secretomes

INTRODUCTION

In forest ecosystems, tree roots are continuously in contact with beneficial, commensal and pathogenic soil microbes. These microbial communities, called the microbiome, are also responsible for nutrient (C, N, and P) recycling and exchanges and have an impact on soil fertility (Chaparro et al., 2012; Lakshmanan et al., 2014) and carbon sequestration (Schimel and Schaeffer, 2012). Consequently, the root microbiome is driving forest health, productivity and sustainability (Wagg et al., 2014). Among those microorganisms, fungi stand as key players that demonstrate a wide range of interactions with plants. This includes wood decayers, saprotrophic soil decomposers, plant pathogens and mutualistic symbionts (Bonfante and Genre, 2010; Veneault-Fourrey and Martin, 2011). Ectomycorrhizal (ECM) symbioses appeared more than 180 Mya (Hibbett and Matheny, 2009) several times independently (Ryberg and Matheny, 2012; Kohler et al., 2015). ECM symbioses evolved from ecologically diverse decayer precursors (white- and brown-rot wood decayers, litter decayers) and radiated in parallel, following the origins of their host plant lineages (Kohler et al., 2015). Polyphyletic evolution of the ECM lifestyle is marked not only by convergent losses of different components of the ancestral saprotrophic apparatus but also by rapid genetic turnover in symbiosisinduced genes (Kohler et al., 2015). The ECM symbiosis is the most prominent mycorrhiza occurring in forest ecosystems. The tree supplies the ECM fungus with up to 30% of its photosynthesis-derived carbohydrates in return for up to 70% of its N and P needs, which are received from the ECM hyphal networks that extend deep within the soil (Nehls, 2008; Martin and Nehls, 2009). Thus, this mutualistic interaction relies on a constant nutrient exchanges between partners and contributes to better tree growth and health by improving mineral nutrition, strengthening plant defenses and directly contributing to the exclusion of competitive microbes (Wallander et al., 2001; Franklin et al., 2014).

Fungi release in the extracellular matrix a wide range of proteins to decay their substrates and to interact with their microbial, plant, or animal competitors and partners (Stergiopoulos and de Wit, 2009; Tian et al., 2009; Talbot et al., 2013; Essig et al., 2014). The fungal secretomes are composed of several protein categories, including proteases, lipases, Carbohydrate-Active enZymes (CAZymes), secreted proteins of unknown function and small-secreted proteins (SSP) (Alfaro et al., 2014). These secreted proteins either participate in organic matter degradation with hydrolytic enzymes such as CAZymes (Zhao et al., 2014), proteases or lipases or in interactions with their host through surface proteins like hydrophobins (Linder et al., 2005) or SSPs (Martin and Kamoun, 2011; van Ooij, 2011). ECM fungi have a reduced set of plant cell wall-degrading enzymes (Kohler et al., 2015). Over the past decade, SSPs have appeared as the cornerstone in the molecular dialog with host plants by altering host metabolism and/or defense responses in plant-microbe interactions (Kloppholz et al., 2011; Giraldo and Valent, 2013; Rovenich et al., 2014; Lo Presti et al., 2015). They were gradually associated with the term effector, which is defined as "microbial or pest secreted molecules that alter host-cell processes or structures and generally promote the microbe lifestyle" (Win et al., 2012). SSPs appear to play a key role in the ECM symbiosis (Plett and Martin, 2015). The protein MiSSP7 from *Laccaria bicolor* is required to establish symbiosis. This MiSSP is targeted to the host-plant nuclei where it interacts with the jasmonate co-receptor JAZ6 suppressing the plant defense reactions and allowing the development of the apoplastic Hartig net (Plett et al., 2011, 2014).

However, despite their ecological importance, little is known about the secretome of ECM fungi as most published analyses focused on the full genome repertoire of CAZymes, either secreted or not (Kohler et al., 2015). Only a few studies combined both in silico prediction of secretome and proteomic analysis of secretome (Vincent et al., 2012; Doré et al., 2015). To investigate whether the various components of the fungal secretome (CAZymes, proteases, lipases, SSPs) differ between ECM, pathogenic and saprotrophic species, we predicted, annotated and compared the secretomes of 49 fungal species, including 11 ECM symbionts recently sequenced (Kohler et al., 2015) and available via the JGI fungal genome portal MycoCosm (Grigoriev et al., 2014). Using this large set of predicted gene repertoires, we showed that the secretome size is not related to the fungal lifestyle. We also identified SSPs shared between ECM and saprophytic fungi, as well as lifestyle-specific SSPs.

RESULTS

Correlation between Secretome and Fungal Lifestyles

To determine whether secretomes and SSPs are related to biotrophic or saprotrophic lifestyles, we developed a pipeline to identify and compare the secretome from 49 fungal fungi including 41 Basidiomycota, six Ascomycota, one Zygomycota, and one Chytridiomycota (Figure 1, Table 1). Predicted secreted proteins contain an N-terminus type II secretion signal peptide, no transmembrane domain and do not contain sequences that retain them in organelles (mitochondria, plasts, ER, Golgi, etc.). Within the Basidiomycota, soil decayers and white-rot fungi display the largest secretomes. They displayed a wide range of sizes ranging from 155 to 1715 signal peptide-containing proteins (Figure 2). The total number of genes predicted in the fungal genomes analyzed ranged from 4000 to 25,000 and the proportion of secreted proteins (SP) from 3 to 10% of the total proteome. Most of the 49 secretomes analyzed (73.5%) contained between 500 and 1000 signal peptide (SP)-containing proteins (Figure 2). However, some secretomes are out of this range with a greater (12% of analyzed secretomes) or smaller (14% of analyzed secretomes) number of secreted proteins. This excess or lower level of secreted proteins is not restricted to a single lifestyle, as three white-rot fungi (Galerina marginata, Sphaerobolus stellatus, and Auricularia subglabra), one litter decayer (Gymnopus luxurians) and one plant-biotrophic pathogen (Melampsora larici populina) possess more than 1000 SP-containing proteins (Figure 2). Plant pathogenic fungi have the largest proportion of secreted proteins. The size of the secretome from pathogenicand white rot-fungi correlates with their proteome size, with

Frontiers in Microbiology www.frontiersin.org



a correlation coefficient r^2 of 0.97 and 0.84, respectively (**Supplementary Image 1A**). In contrast, the secretome size from brown-rot decayers and ECM fungi does not correlate with the proteome size as they display a correlation coefficient of 0.57 and 0.30, respectively (**Supplementary Image 1A**). The fungi with the smallest secretomes are the ECM *Tuber melanosporum*, the mycoparasitic *Tremella mesenterica*, the litter decayer *Phycomyces blakesleeanus*, the plant biotrophic pathogen *Ustilago maydis* and the yeast *Pichia stipitis*.

Enrichment of Functional Categories

To identify ECM-specific proteins in secreted proteins with a known PFAM domain (if any), we performed an enrichment analysis on the protein repertoires from species belonging to five fungal lifestyles (white-rot and brown-rot decayers, litter decayers, ECM, and plant pathogens; **Table 2**). Most of the PFAM domains identified in secreted proteins are related to enzymatic activities [proteases, lipases, and glycosyl hydrolases (GH)]. None of the enriched categories of PFAM-containing secreted proteins is shared by all ECM fungi studied (**Table 2**).

Composition of Fungal Secretomes by CAZymes, Proteases, and Lipases

Our analysis then focused on four categories (i.e., proteases, lipases, CAZymes, and SSPs) known for their biological and ecological relevance in saprotrophic and ECM fungi. In this study, we defined SSPs as predicted secreted proteins smaller than 300 amino acids. Secretomes have been annotated according to similarities with available databases or a chosen cut-off (**Figure 3**). SSPs are the most abundant secreted proteins in all species analyzed, followed by CAZymes, proteases and finally lipases (**Figure 3**).

CAZymes

The average number of secreted PCW-degrading CAZymes of ECM fungi is significantly reduced when compared to the one of the other fungal lifestyles, except plant pathogens (**Supplementary Image 2**, **Supplementary Data sheet 1**). A detailed analysis of the CAZyme families and their evolution is provided in Kohler et al. (2015).

Proteases

To assess the protease capability of the analyzed fungi (mainly found in forest ecosystems), we performed a BLASTP search against the MEROPS database. We considered families S08, S09, M36, S53, and A01 for endoproteases and families M28 and S28 for exoproteases as they are ecologically relevant for ECM (Rineau et al., 2013). We then subdivided the proteases into exoproteases and endoproteases. Proteases represent approximately 7% of the secretome, ranging from 6 endo- or exoproteases for the litter decayer Agaricus bisporus to 78 proteases for the white-rot fungus A. subglabra. Both types of proteases are present in all studied species (Figure 4). Endoproteases are present in higher numbers than exoproteases independently of the lifestyle (Figure 4). No significant differences were found between biotrophic and saprotrophic species (Supplementary Image 3), indicating that ECM fungi have conserved the protease ability of their saprotrophic cousins.

Lipases

Lipases are the less represented secreted proteins, regardless of the fungal lifestyles. The secretome of the white-rot fungus *S. stellatus* contains the highest number of secreted lipases (44), whereas the ECM symbiont *Pisolithus tinctorius* and the yeast *Pichia stipitis* have only two secreted lipases. Genome-wide

Frontiers in Microbiology www.frontiersin.org

TABLE 1 | List of fungal species analyzed in this study.

Name	Lifestyle	Phylum	Family
Agaricus bisporus	Litter decayers	Basidiomycota	Agaricacae
Amanita thiersii	Litter decayers	Basidiomycota	Amanitacae
Amanita muscaria	Ectomycorrhizal	Basidiomycota	Amanitaceae
Plicaturopsis crispa	Brown rot	Basidiomycota	Amylocorticiaceae
Piloderma croceum	Ectomycorrhizal	Basidiomycota	Atheliales
Auricularia subglabra	White rot	Basidiomycota	Auriculariaceae
Heterobasidion annosum	White rot	Basidiomycota	Bondarzewiaceae
Botryobasidium botryosum	Brown rot	Basidiomycota	Botryobasidiaceae
Coniophora puteana	Brown rot	Basidiomycota	Coniophoraceae
Punctularia strigosozonata	White rot	Basidiomycota	Corticiaceae
Hebeloma cylindrosporum	Ectomycorrhizal	Basidiomycota	Cortinariaceae
Dacryopinax sp	Brown rot	Basidiomycota	Dacrymycetaceae
Fomitopsis pinicola	White rot	Basidiomycota	Fomitopsidaceae
Sphaerobolus stellatus	White rot	Basidiomycota	Geastraceae
Gloeophyllum trabeum	Brown rot	Basidiomycota	Gloeophyllaceae
Fomitiporia mediterranea	White rot	Basidiomycota	Hymenochaetaceae
Jaapia argillacea	Brown rot	Basidiomycota	Jaapiaceae
Melampsora larici-populina	Pathogen	Basidiomycota	Melampsoraceae
Hvdnomerulius pinastri	Brown rot	Basidiomycota	Paxillaceae
Paxillus involutus	Ectomycorrhizal	Basidiomycota	Paxillaceae
Paxillus rubicondulus	Ectomycorrhizal	Basidiomycota	Paxillaceae
Phanerochaete chrysosporium	White rot	Basidiomycota	Phanerochaetaceae
Pleurotus ostreatus	White rot	Basidiomycota	Pleurotaceae
Trametes versicolor	White rot	Basidiomycota	Polyporaceae
Conrinonsis cinerea	Litter decavers	Basidiomycota	Psathyrellaceae
Schizophyllum commune	White rot	Basidiomycota	Schizophyllaceae
Pisolithus tinctorius	Ectomycorrhizal	Basidiomycota	Sclerodermataceae
Pisolithus microcarpus	Ectomycorrhizal	Basidiomycota	Sclerodermataceae
Selorodorma citrinum	Ectomycorrhiza	Basidiomycota	Sclerodermataceae
Schooling vormiforg		Basidiomycota	Schaoinaceae
Diriformoopora Indica	Enderbyte	Basidiomycota	Sebacinaceae
	Brown ret	Basidiamyaata	Sepacifiaceae
Selpula lacrymans	Brown rot	Basidiamyeete	Serpulaceae
	White rot	Basidiomycota	Strophanaceae
Hypnoloma sublateritium		Basidiomycota	Strophariaceae
	Ectomycorrniza	Basidiomycota	Sullaceae
iremella mesenterica	Mycoparasitic	Basidiomycota	Iremellaceae
Laccaria bicolor	Ectomycorrhiza	Basidiomycota	Iricholomataceae
Gymnopus luxurians	Litter decayers	Basidiomycota	Iricholomatocae
Iulasnella calospora	Orchid symbiont	Basidiomycota	lulasnellales
Ustilago maydis	Pathogen	Basidiomycota	Ustilaginaceae
Aspergillus nidulans	Litter decayers	Ascomycota	Trichocomaceae
Cryphonectria parasitica	Pathogen	Ascomycota	Cryphonectriaceae
Oidiodendron maius	Ericoid symbiont	Ascomycota	Myxotrichaceae
Pichia stipitis	Yeast	Ascomycota	Saccharomycetaceae
Stagonospora nodorum	Pathogen	Ascomycota	Phaeosphaeriaceae
Trichoderma reesei	Litter decayers	Ascomycota	Hypocreaceae
Tuber melanosporum	Ectomycorrhizal	Ascomycota	Tuberaceae
Batrachochytrium dendrobatidis	Pathogen	Chvtridiomvcota	Incertae sedis
Phycomyces blakesleeanus	Litter decavers	Zvgomvcota	Phycomycetaceae
,	Enter abouyoro	2,90,00.00	

November 2015 | Volume 6 | Article 1278



analysis of secreted lipases shows differences between GX and GGGX lipase classes (Figure 5), the two main classes used by the Lipase Engineering Database to classify lipases. Among the 49 fungal secretomes, the GGGX family, which contains carboxylesterases and Candida rugosa lipase-like (CRL), is more represented than the GX class (Figure 5). Two fungi (the white rot Phycomyces blakesleeanus and the yeast Pichia stipitis) have no GGGX class lipases (Figure 5A). ECM fungi lack secreted carboxylesterases (CE) from the GGGX family, except for Piloderma croceum (Figure 5A), contrasting with the ericoid symbiont Oidiodendron maius presenting a high number of both CE and CRL. Among GX class lipases, only two fungi (the ECM symbiont Suillus luteus and the white rot G. marginata) have lysophospholipases (Figure 5B). By contrast, thioesterases are found among all ECM fungi except Scleroderma citrinum (Figure 5B). ECM fungi display a low repertoire of filamentous fungal lipases compared with white rot fungi (Supplementary Image 4).

Presence of SSPs in ECM Secretomes

There is a positive correlation between the number of SSPs and the secretome size, with the largest secretomes having the highest number of SSPs (**Supplementary Image 1B**). ECM fungi display significantly higher percentage of SSPs in their secretome than saprophytic species (**Figure 6**), whereas this percentage does not significantly vary between the other lifestyles. Species-specific SSPs (no sequence similarity within the set of compared fungi using BLASTP) are more abundant in plant pathogens, whereas they display similar levels in other lifestyles (**Figure 6**). Overall, ECM fungi are enriched in SSPs compared to the other fungal lifestyles, but do not display significantly higher numbers of species-specific SSPs.

Identification of Shared- and Lifestyle-specific SSPs

To identify conserved SSPs shared between the 28 saprotrophic (white rot, brown rot, and soil and litter decayers) and 14 mycorrhizal fungi (orchid, ericoid and ECM symbionts), we performed a clustering analysis based on sequence identity using CD-HIT software with an identity threshold set to 70% (**Figure 7**). The clustering analysis has been performed on a total of 16,821 SSP sequences and generated a total of 14,284 clusters, of which 101 clusters contain SSPs from at least three

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

TABLE 2	PFAM	enrichment	analysis	in fungal	secretomes.
---------	------	------------	----------	-----------	-------------

Lifestyles	PFAM	Description
Plant pathogen	PF07732	Multicopper oxidase
	PF07731	Multicopper oxidase
	PF00082	Peptidase_S8
	PF00394	Multicopper oxidase
	PF00026	Eukaryotic aspartyl protease
	PF00150	Glycoside hydrolase family 5
	PF00135	Carboxylesterase
	PF01565	FAD binding domain
	PF01083	Cutinase
	PF00722	Glycosyl hydrolases family 16
Brown rot	PF09286	Pro-kumamolisin
	PF00135	Carboxylesterase
	PF13668	Ferritin-like
	PF00722	Glycosyl hydrolases family 16
	PF00082	Peptidase_S8
	PF00026	Eukaryotic aspartyl protease
	PF00150	Glycoside hydrolase family 5
	PF00657	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase
	PF01764	Lipase (class 3)
	PF01915	Glycosyl hydrolase family 3 C-terminal domain
	PF00704	Glycosyl hydrolases family 18
	PF00933	Glycosyl hydrolase family 3 N terminal domain
	PF00450	Peptidase_S10
	PF03330	RIpA like double-psi beta-barrel
White rot	PF09286	Pro-kumamolisin
	PF00135	Carboxylesterase family
	PF00722	Glycosyl hydrolases family 16
	PF00082	Peptidase S8
	PF00026	Peptidase S8
	PF00150	Glycoside hydrolase family 5
	PF01764	Lipase (class 3)
	PF03443	Glycoside hydrolase family 61
	PF01185	Hydrophobin
	PF00450	Serine carboxypeptidase
	PF03330	RIpA like double-psi beta-barrel
	PF10342	Ser-Thr- rich GPI-anchored membrane protein
Litter decayers	PF07732	Multicopper oxidase
	PF00082	Peptidase S8
	PF00026	Eukaryotic aspartyl protease
	PF00704	Glycosyl hydrolases family 18
Ectomycorrhizal	nono	

PFAM enrichment analysis in secreted proteins compared to non-secreted proteins has been performed according to Saunders et al. (2012). Enriched PFAM domains shared by all members of one fungal lifestyle (plant pathogen, white rot, brown rot, litter decayers, and ectomycorrhizal) are shown.

different fungal species (**Figure 7A**). Only the latter clusters have been kept for further analysis. Most of the defined clusters are species-specific (clusters with only one species) (**Supplementary Data sheet 2**). There is no cluster containing

SSPs shared between all lifestyles, but seven SSP clusters are shared between ECM and saprotrophic fungi only (**Figure 7B**). PFAM annotations indicate that those proteins are related to fungal proteins of unknown function and uncharacterized domains (PF09435 and PF08520), thaumatin (PF0314), GH 25 (PF01183), cyclophylin (PF00160), and ADP-ribosylation family (PF00025) (**Table 3**).

ECM fungi share most of their SSPs with brown rot (19 clusters), white rot (7 clusters), and litter decayers (3 clusters) (Figure 7B). Moreover, 17 clusters are specific to ECM fungi (Table 3). These clusters contain proteins with PFAM domains associated with ceratoplatanin (PF07249), Ser-Thr-rich glycosyl-phosphatidyl-inositol-anchored membrane proteins (PF10342), GH 25 (PF01183), CUE domains likely binding ubiquitin (PF02845), NADPH-binding protein (PF13460), thiol-oxydoreductases (PF07249), and Evr1/Alr family proteins likely involved in the maturation of Fe/S clusters (PF04777). Six clusters specific for ECM fungi contain SSPs without any PFAM domain, suggesting the presence of lifestyle-specific SSPs among ECM symbionts. Finally, SSPs specific to saprotrophic fungi include fungal hydrophobin (PF01185) and GH 61 (PF03443) sequences. To harness evolution of SSP-encoding genes, we performed phylogenetic analysis on the cluster containing the highest number of SSPs from saprotrophic (white rot, brown rot, and litter decayer) and ectomycorrhizal fungi (Figure 7C). Two clades are highly supported by bootstraps. Clade I contains mainly Boletales and one Atheliales, whereas Clade II contains mainly Agaricales and Polyporales. These two clades are highly consistent with taxonomy and are thus not independent from it. Most interestingly, clade I is enriched but not exclusively with ECM fungi, whereas clade II is enriched but not exclusively with saprotrophic fungi. This analysis is supporting an independent diversification of SSPs. However, clade I contains among seven ECM fungi Serpula lacrymans, a brown-rot fungus and clade II contains among 11 saprotrophic fungi, two ECM fungi: Hebeloma cylindrosporum and Amanita muscaria. This suggests that SSPs of ECM fungi may have evolved from their saprotrophic ancestors.

DISCUSSION

This genomic comparative genomic study is based on in silico analysis and bioinformatics tools. The results should thus be taken with care as they may be impacted by both qualities of sequencing (Supplementary Data sheet 3) and annotation tools used. For instance, secretome size found for two white rot fungi, S. stellatus and A. subglabra, are strongly higher than any other fungal secretome analyzed in this study (1715 and 1682 predicted secreted proteins, respectively). Moreover, proteins can be secreted using unconventional secretion system (Nickel and Rabouille, 2009) and as they do not contain any signal peptide, they are not predicted as secreted proteins using our bioinformatics pipeline. For instance, proteomic analysis of H. cylindrosporum's exoproteome identified 228 secreted proteins not computationally predicted as secreted (Doré et al., 2015). On other hand, a proteomic analysis on L. bicolor freeliving mycelium revealed 815 secreted proteins using SDS-PAGE



FIGURE 3 | Global composition of 49 fungal secretomes. Predicted secretomes have been annotated based on four functional categories (Proteases, SSP, CAZymes, Lipases). Sizes of secretomes are presented as absolute number. Bars represent number of proteins in each category of secreted proteins. Phylogenetic tree is adapted from Kohler et al. (2015).



shotgun method (Vincent et al., 2012), a number similar to the one of *in silico* predicted secreted proteins (854 proteins predicted as secreted). However, the two exoproteome are different in their composition (Vincent et al., 2012). Vincent et al., also highlighted that the experimental approach used for separation and identification of proteins has an impact

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org



Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

November 2015 | Volume 6 | Article 1278



on the detection of secreted proteins (Vincent et al., 2012). Therefore, combination of both computational and experimental approaches appears as the most accurate strategy to study fungal secretome's composition.

Fungal Secretomes, Not a Matter of Size

In this study, we predicted, analyzed and compared the secretome of 49 fungal species, including 11 ECM fungi. We focused our analysis on ECM secretomes aiming to identify shared- or lifestyle-specific features. A previous analysis on 33 microbial secretomes (mostly Ascomycota and Oomycota) showed that the number of predicted secreted proteins was related to the phylogenetic relationships between species rather than their ecological traits (i.e., lifestyles) (Krijger et al., 2014). Our study, mostly performed on Basidiomycota, confirms and extends those conclusions by showing that most of the analyzed secretomes contain 500–1000 proteins and their size is not related to the species lifestyle. However, a recent proteomics survey of secreted proteins involved in lignocellulose degradation in Basidiomycota highlighted differences between fungi having different lifestyles. The authors suggested that the lifestyle shapes the composition, but not the size of fungal secretomes (Alfaro et al., 2014). In the present study, we surveyed the secretome composition of ECM fungi and compared it to saprotrophic and pathogenic species.

ECM Fungi Have a Reduced Repertoire of Secreted PCW-degrading CAZymes

CAZymes are important for both organic matter degradation and colonizing the host in pathogen/symbiotic interactions by facilitating the breakdown of plant cell wall components (van den Brink and de Vries, 2011; Zerillo et al., 2013; Brouwer et al., 2014). ECM fungal genomes have lost genes encoding for CAZymes and lytic polysaccharide mono-oxygenases (Kohler et al., 2015), similar to what has been observed in brown rot fungi, and likely due to their intercellular interactions

9

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

November 2015 | Volume 6 | Article 1278



ri.2007

FIGURE 7 | Shared Small-Secreted Proteins among four different

lifestyles. (A) Number of clusters involving at least three different species.

0.04

Punst-82157

FIGURE 7 | Continued

(B) Four sets Venn diagram showing number of clusters of SSPs shared between 11 ECM fungi, 2 orchid symbionts, 12 white rot, 8 brown rot, and 7 soil or litter decayer fungi, based on CD-HIT clustering with identity threshold set to 70%. **(C)** Phylogenetic tree inferred from 1000 bootstraps using maximum likelihood phylogeny of the largest cluster containing SSPs from both ECM fungi and each of saprotrophic fungal species (white rot, brown rot, litter decayer). Bootstrap values are shown at the corresponding node. Colors indicate fungal lifestyle and orders of the different fungi are given.

with plants (Eastwood et al., 2011; Floudas et al., 2012). Our data detail these results by showing that ECM fungi secrete less PCW active CAZymes than white rot fungi, although we did not find any statistically significant differences when we compared ECM fungi with brown rot fungi or other saprotrophs (i.e., soil and litter decayers or yeast). The remaining plant cell wall degradative capacities are likely involved both in the presymbiotic phase, where ECM fungi are not yet in symbiosis with a host, and during the first steps of the colonization process, where the ECM fungus needs to penetrate the plant root cortex.

ECM and Saprotrophic Fungi Have Similar Protease and Lipase Repertoires

In most temperate and boreal forest soils, organic matter is predominant. The role of ECM fungi in soil organic matter degradation and/or modification is known and required decomposition abilities. However, the consequence of soil organic matter modification by ECM fungi in particular for carbon storage is under debate (Lindahl and Tunlid, 2015). Nitrogen is mainly found in an organic form, such as proteins, and carbon in complex carbohydrates. Recent studies using the ECM fungus Paxillus involutus suggest that glucose (corresponding to carbon provided by the plant) controls the assimilation of organic nitrogen by this ECM fungus (Rineau et al., 2012; Shah et al., 2013). Mobilization of nitrogen in organic matter requires the action of secreted proteases (Geisseler et al., 2011). Another recent study proposes that endoproteases from the A01, M36, and S53 families in combination with exoproteases (M28, S28, and S9 families) are likely required to degrade soil proteins (Shah et al., 2013). Additionally, subtilisins (S08 family) are dominant in the secretomes of saprotrophic fungi (Hu and Leger, 2004). Most mycoparasitic and pathogenic fungi display an elevated number of subtilisin-like serine proteases (Muszewska et al., 2011) that play a key role in these interactions (Bryant et al., 2009). In contrast, ECM fungi display fewer subtilisins (S08 family) in comparison with white rot fungi, endophytes, ericoid fungi, and pathogenic fungi. This reduced set of subtilisins appears specific to the ECM fungi (and to a lesser extent to several brown rot fungi taxonomically-related to ECM fungi). The reduced number of subtilisins might be a way for ECM fungi to avoid eliciting plant defense mechanisms (Figueiredo et al., 2014).

In plant pathogenic fungi, secreted lipases are involved in propagule adhesion and plant tissue penetration to promote

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

Clade II

(Continued)

TABLE 3 | Small-secreted proteins shared among lifestyles.

Cluster	Nb. of species	Protein length	PFAM	Fungal species within clusters	Description			
id	inside clusters	(min–max)	domain					
CLUSTE	CLUSTERS CONTAINING ONLY ECM FUNGAL SPECIES							
92	5	234–236	None	P. involutus, P. rubicondulus, P. microcarpus, P. tinctorius, S. citrinum	No PFAM domain			
97	5	194–206	PF02845	P. involutus, P. rubicondulus, P. microcarpus, P. tinctorius, S. citrinum	CUE domain			
52	3	110-257	PF01183	P. involutus, P. rubicondulus, Suillus luteus	Glycosyl hydrolases family 25			
154	4	220	PF13460	P. involutus, P. rubicondulus, S. citrinum, S. luteus	NADH(P)-binding			
169	4	132–189	PF10342	P. involutus, P. rubicondulus, P. microcarpus, P. tinctorius	Ser-Thr-rich gpi-anchored family			
126	3	293–294	PF01764	P. microcarpus, P. tinctorius, S. citrinum	Lipase (class 3)			
143	3	98 - 246	PF10342	P. involutus, P. rubicondulus, S. luteus	Ser-Thr-rich gpi-anchored family			
147	3	160–234	PF04777	P. microcarpus, P. tinctorius, S. citrinum	Erv1 / Alr family			
251	3	152-263	None	P. microcarpus, P. tinctorius, S. citrinum	No PFAM domain			
264	3	241-252	None	P. microcarpus, P. tinctorius, S. citrinum	No PFAM domain			
267	3	208–249	PF00491	P. involutus, P. rubicondulus, P. microcarpus	Arginase family			
292	3	225–229	PF03227	P. microcarpus, P. tinctorius, S. citrinum	GILT/Thiol oxidoreductases			
373	3	148 - 153	None	P. microcarpus, P. tinctorius, S. citrinum	No PFAM domain			

CLUSTERS CONTAINING BOTH ECM AND SAPROTROPHIC FUNGAL SPECIES

0	21	179–186	PF00025 PF00071	A. bisporus, A. muscara, A. thiersii, C. cinerea, G;trabeum, H. cylindrosporum, H. annosum, H. sublateritium, P. involutus, P. rubicondulus, P. croceum, P. microcarpus, P. tinctorius, P. ostreatus, P. crispa, P. strigozonata, S. commune, S. citrinum, S. lacrymans, S. luteus, T. versiocher	ADP-ribosylation family Ras family
1	18	217–240	PF00160	A. bisporus, A. muscara, A. thiersii, F. pinicola, G. trabeum, G. luxurians, H. annosum, H. sublateritium, L. bicolor, P. rubicondulus, P. chrysosporium, P. microcarpus, P. tinctorius, P. crispa, P. strigosozonata, S. citrinum, S. lacrymans, T. versicolor	Cyclophylin
12	10	224–247	PF01183	A. bisporus, A. subglabra, G. trabeum, P. rubicondulus, P. chrisosporium, P. ostreatus, P. strigosozonata, S. commune, S. lacrymans, T. versicolor	Glycosyl Hydrolase 25
CLUSTERS CO	NTAINING ONLY	(SAPROTROPH	HIC FUNGAL :	SPECIES (WHITE ROT, BROWN ROT, LITTER DECAYERS)	

16	7	238–257	PF03443	G. luxurians, H. annosum, J. argillacea, P. ostreatus, P. crispa, P. strigosozonata, T. versicolor	Glycosyl Hydrolase 61
56	5	242 - 248	PF03443	A. bisporus, A. thiersii, P. crispa, S. lacrymans, T. versicolor	Glycosyl Hydrolase 61
217	3	105–110	PF01185	F. mediterranea, G. luxurians, J. argillacea	Fungal hydrophobin

List of clusters containing only small-secreted proteins from ectomycorrhizal fungal species (ECM), both ectomycorrhizal and saprotrophic fungal species and only saprotrophic fungal species (white rot, brown rot, litter decayers). PFAM analysis were performed with MotifFinder with an e-value cut off of 1.10⁻⁰⁸, based on CD-HIT clustering analysis with identity threshold set to 70%.

colonization (Voigt et al., 2005; Chu et al., 2008). They may also be used to facilitate nutrient absorption from the host or involved in the inhibition of immunity-related callose formation (Blümke et al., 2014). In *Magnaporthe oryzae*, a lipase-like protein upregulated during plant penetration and biotrophic development is likely involved in both appressorium and manipulation of cell to cell communication through plasmodesmata (Oliveira-Garcia E; 28th Fungal Genetics Conference, Pacific-Groove, CA, USA). However, in mutualistic interactions, no functional studies have described the role of secreted lipases. Because levels of secreted lipases is low in each fungal lifestyle, it is not surprising that we do not see a reduction in secreted lipases similar to what has been observed with secreted CAZymes.

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

ECM Fungi Share SSPs with Saprotrophic Fungi, But Also Display Symbiosis-specific SSPs

SSPs have been extensively studied in recent years for their involvement in host-pathogen interactions as effectors (Giraldo and Valent, 2013). However, those SSPs have been found in most fungal species regardless of their lifestyle. Interestingly, several SSPs are secreted by free-living mycelium and are thus non-specific to symbiotic tissues (Vincent et al., 2012; Doré et al., 2015). This suggests a role of SSPs in the biology of extramatrical mycelium, which is the one interacting with rhizospheric microbes. These secreted proteins are likely involved in a variety of processes including differentiation of fungal structure, such as fruiting body, (e.g., hydrophobins), cell-to-cell communication (Murphy et al., 2012), competition between fungi (Trejo-Hernández et al., 2014) and fungal-host interactions (Chisholm et al., 2006; Plett and Martin, 2015). Our genome-wide survey reflects the versatility of SSPs with both shared- and lifestyle-specific proteins. Among the 17 SSP clusters only found in ECM fungi, we found many proteins identified as ceratoplatanins. Ceratoplatanin is a fungal elicitor of plant defenses and is therefore considered to be involved in pathogen-associated molecular patterns (de Oliveira et al., 2011; Baccelli et al., 2014). Finding ECM-specific ceratoplatanins in mutualistic fungi suggested that that they are involved in microbial-associated molecular patterns (MAMP) involved in polysaccharide recognition. Additionally, a recent study showed that the ceratoplatanin ELP1 from the soil fungus Trichoderma atroviride forms highly ordered monolayers at a hydrophobic surface/liquid-interface and hybrid ordered layers when added to hydrophobins (Bonazza et al., 2015).

Several of the PFAM domains found in ECM-specific sequences, such as Ser-Thr/GPI rich anchored proteins and the lysozyme-like GH 25, are also related to cell wall remodeling and/or organization. Interestingly, these PFAM domains are enriched in the secretomes of rust fungi (Saunders et al., 2012), suggesting a possible role for the biotrophic way of life. Ser-Thr-GPI anchored proteins may be involved in the development of fruiting bodies (Frey et al., 2015) as well as in signaling when they interact with MAPK (Shen et al., 2015). Six clusters do not have any known PFAM domains, suggesting new families of ECM-specific SSPs. Finally, three SSP clusters are specific to saprotrophic fungi; they include fungal hydrophobin (PF01185) and copper-dependent lytic polysaccharide monooxygenases GH 61/AA9 (PF03443) (Levasseur et al., 2013). Orchid mycorrhizal symbionts do not share SSP clusters with ECM fungi. However, they share three SSP clusters with white rot fungi and a single SSP cluster with both white and brown rot fungi. This suggests that orchid symbionts are more similar to saprotrophic fungi and is consistent with a recent comparative genomic study (Martino, personal communication). Overall, ECM fungi share a large set of SSPs with brown rot fungi, white rot fungi and litter decayers in that order, supporting the view of a continuum between ECM fungi, rot fungi and litter-decayer fungi (Riley et al., 2014). Phylogenetic analysis confirms at least some SSPs from ectomycorrhizal fungi have evolved from SSPs found in saprotrophic ancestors. Knowing that MiSSP7 from *L. bicolor* is an effector protein required for ECM symbiosis establishment (Plett et al., 2014), one could wonder whether this SSP evolved from saprotrophic fungi. We finally identified a number of SSPs specific to the ECM fungi, which make them good candidates for further functional analyses.

Altogether, those results support the concept of a continuum from saprophytic to ECM fungi, where ECM fungi share common secreted proteins with their saprophytic cousins, but also contain ectomycorrhiza-specific SSPs likely involved in the fine-tuning of the mutualistic interaction established with their host(s). The present findings confirmed and extended the large scale genome analysis showing that emergence of ECM symbiosis has been associated with a loss of plant cell wall degrading enzymes and a rapid turn-over of symbiosis-related genes (Kohler et al., 2015). Overall, SSPs represent a significant part of the fungal secretomes analyzed, especially among ECM fungi. The fact that ECM fungi are enriched in SSPs compared with the other lifestyles might reflect the conservation of SSPs from saprotrophic ancestors and the expansion of symbiosis-specific SSPs dedicated to the molecular cross-talk between partners, the accommodation of hyphae in planta, the establishment and functioning of the symbiosis (Garcia et al., 2015). This stresses the need for functional analysis of the candidate effectors to allow for more accuracy in future computational studies (Sperschneider et al., 2015).

METHODS

Bioinformatics Pipeline and Functional Annotation of Fungal Secretomes

Prediction of secreted proteins was performed using a custom bioinformatic pipeline (Figure 1) assessing the following combined sequence characteristics: (a) proteins were predicted as secreted if the presence of a signal peptide was detected with SignalP, with D-cutoff values set to "sensitive" (version 4.1; option eukaryotic; Petersen et al., 2011), and no transmembrane helix or one overlapping the signal peptide found by TMHMM using default parameters (version 2.0; Melén et al., 2003) and (b) protein subcellular localization. Proteins were considered as secreted if subcellular localization was assigned as a secretory pathway using TargetP with the -N option to exclude plants (version 1.1; Emanuelsson et al., 2000) and as extracellular with WolfPsort using the option "fungi" (version 0.2; Horton et al., 2007). To filter out proteins that permanently reside in the endoplasmic reticulum (ER) lumen, we scanned the proteins for the KDEL motif (Lys-Asp-Glu-Leu) in the C-terminal region (prosite accession "PS00014") with PS-SCAN (version 1.79). Annotation of the secreted proteins was completed by a BLASTP query comparing protein sequences against different resources and specialized databases ($e^{value} = 10^{-5}$ and choosing the best hit) using the followingdatabases: (1) CAZyme (http://www.cazy. org/), (2) MEROPS (http://merops.sanger.ac.uk/), and (3) Lipase Engineering Database (http://www.led.uni-stuttgart.de/) and the following international DNA databases: (1) Uniprot Swissprot and (2) JGI Mycocosm. We also performed domain searches

with the HMMER package (version 3.0, default parameters; Finn et al., 2011) for PFAM domains. To predict whether the secreted proteins targeted nuclei, we used PredictNLS (default parameters, version 1.0.20; https://rostlab.org/owiki/index.php/ PredictNLS) for determine the presence of a nuclear localization signal. We also estimated the percentage of cysteine and the KRrich regions of the secreted proteins. We considered secretome proteins smaller than 300 amino acids as SSPs. Data mining and comparison and figure plotting have been performed using the R software (R Core Team, 2014, http://www.R-project.org/) and an *in-house* Python script.

Clustering Analysis and Venn Diagram

The clustering analysis has been performed based on sequence identity with CD-HIT software (Huang et al., 2010). The identity threshold has been set to 70% and only clusters involving at least three different fungal species have been taken in account. Protein sequences have been retrieved with an *in-house* Python script. Clustering analysis data have been used to generate a 4-sets Venn diagram.

Phylogenetical and Statistical Analysis

Phylogenetic analysis of the largest cluster containing both saprotrophic and ectomycorrhizal fungal species has been performed on protein sequences using MAFFT v7 for alignment (Katoh and Standley, 2013), Gblocks v0.91b for alignment curation (Talavera and Castresana, 2007) and RAxML v7.7.2 for phylogeny inference. Trees are inferred from 1000 bootstraps (Stamatakis, 2006), all with default parameters.

Pairwise *t*-test and pairwise wilcoxon test, both with holm correction, have been performed using the R Software (R Core Team, 2014, http://www.R-project.org/) with *p*-values cut-off fixed at 0.01.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FM and CV designed the study. CP performed the clustering and secretome analyses. EM designed the bioinformatics pipeline to identify the secretomes and performed the PFAM enrichment analysis. CP and CV wrote the manuscript. FM and CV edited the manuscript. All authors commented on the manuscript before submission. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This material is based on work conducted by the US Department of Energy Joint Genome Institute, a DOE Office of Science User Facility, supported under contract no. DE-AC02-05CH11231. This work was supported by the French National Research

REFERENCES

Alfaro, M., Oguiza, J. A., Ramírez, L., and Pisabarro, A. G. (2014). Comparative analysis of secretomes in basidiomycete fungi. J. Proteomics 102, 28–43. doi: 10.1016/j.jprot.2014.03.001 Agency through the Laboratory of Excellence ARBRE (grant no. ANR-11-LBX-002-01), the Plant-Microbe Interactions Project, Genomic Science Program, of the U.S. Department of Energy, Office of Science, Biological, and Environmental Research (grant no. DE-AC05-00OR22725), the Institut National de la Recherche Agronomique, the Région de Lorraine, and the European Fund for Regional Development (funding for the Functional Genomics Facilities at Institut National de la Recherche Agronomique-Nancy), the Université de Lorraine (Ph.D. scholarship to CP). We thank Dr. Igor Grigoriev (JGI) and the Mycorrhizal Genomics Initiative consortium principal investigators for access to the genome sequences before publication. We also thank Dr. Sylvain Raffaelle (INRA Toulouse, France) for helpful input regarding the enrichment analysis. We thank Joe Spatafora for helpful comments on phylogenetic analyses and the two reviewers for their valuable input in the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb. 2015.01278

Supplementary Data sheet 1 | Prevalence of secreted Plant Cell Wall Degradative CAZymes.

Supplementary Data sheet 2 | Raw output from CD-HIT clustering software.

Supplementary Data sheet 3 | Assessment of genome completeness using CEGMA score.

Supplementary Image 1 | Correlation between Proteome size, Secretome size, and number of Small-secreted proteins within different lifestyles. Proteome size and Secretome size are plotted with linear regression and adjusted R-squared (A) as well as Secretome size and number of SSPs (B). Confidence interval (95%) is shown in gray.

Supplementary Image 2 | Composition in secreted PCW-degrading CAZymes. The prevalence of 21 families of CAZymes active on plant material has been compared between 6 different fungal lifestyles including saprotrophic (white rot, brown rot, and other saprotrophs) and biotrophic (ectomycorrhizal fungi, orchid symbiont, and pathogen) fungi. Boxplots for each category and every lifestyle show median (bold horizontal line), first and third quartiles (upper and lower limit of the box) and maximum and minimum values (straight vertical lines). Different letters indicates significant differences (p < 0.01) using pairwise comparisons with Wilcoxon rank sum test and holm correction of p-values.

Supplementary Image 3 | Prevalence of secreted exoproteases and endoproteases among lifestyles. Proteasic ability is represented as a boxplot for each lifestyles, showing median (bold horizontal line), first and third quartiles (upper and lower limit of the box) and maximum and minimum values (straight vertical lines).

Supplementary Image 4 | Prevalence of secreted GX and GGGW class liapses among lifestyles. Lipasic ability is represented as a boxplot for each lifestyles, showing median (bold horizontal line), first and third quartiles (upper and lower limit of the box) and maximum and minimum values (straight vertical lines).

- Altschul, S. F., Gish, W., and Miller, W. Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403–410.
- Baccelli, I., Lombardi, L., Luti, S., Bernardi, R., Picciarelli, P., Scala, A., et al. (2014). Cerato-platanin induces resistance in Arabidopsis leaves

through stomatal perception, overexpression of salicylic acid- and ethylenesignalling genes and camalexin biosynthesis. *PLoS ONE* 9:e100959. doi: 10.1371/journal.pone.0100959

- Blümke, A., Falter, C., Herrfurth, C., Sode, B., Bode, R., Schäfer, W., et al. (2014). Secreted fungal effector lipase releases free fatty acids to inhibit innate immunity-related callose formation during wheat head infection. *Plant Physiol.* 165, 346–358. doi: 10.1104/pp.114.236737
- Bonazza, K., Gaderer, R., Neudl, S., Przylucka, A., Allmaier, G., Druzhinina, I. S., et al. (2015). The fungal cerato-platanin protein EPL1 forms highly ordered layers at hydrophobic/hydrophilic interfaces. *Soft Matter* 11, 1723–1732. doi: 10.1039/C4SM02389G
- Bonfante, P., and Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plantfungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat. Commun.* 1, 48. doi: 10.1038/ncomms1046
- Brouwer, H., Coutinho, P. M., Henrissat, B., and de Vries, R. P. (2014). Carbohydrate-related enzymes of important Phytophthora plant pathogens. *Fungal Genet. Biol.* 72, 192–200. doi: 10.1016/j.fgb.2014.08.011
- Bryant, M. K., Schardl, C. L., Hesse, U., and Scott, B. (2009). Evolution of a subtilisin-like protease gene family in the grass endophytic fungus Epichloë festucae. *BMC Evol. Biol.* 9:168. doi: 10.1186/1471-2148-9-168
- Chaparro, J. M., Sheflin, A. M., Manter, D. K., and Vivanco, J. M. (2012). Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biol. Fertil. Soils* 48, 489–499. doi: 10.1007/s00374-012-0691-4
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B. J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124, 803–814. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.008
- Chu, F. H., Wang, S. Y., Lee, L. C., and Shaw, J. F. (2008). Identification and characterization of a lipase gene from Antrodia cinnamomea. *Mycol. Res.* 112, 1421–1427. doi: 10.1016/j.mycres.2008.06.006
- de Oliveira, A. L., Gallo, M., Pazzagli, L., Benedetti, C. E., Cappugi, G., Scala, A., et al. (2011). The structure of the elicitor cerato-platanin (CP), the first member of the CP fungal protein family, reveals a double psibarrel fold and carbohydrate binding. J. Biol. Chem. 286, 17560–17568. doi: 10.1074/jbc.M111.223644
- Doré, J., Perraud, M., Dieryckx, C., Kohler, A., Morin, E., Henrissat, B., et al. (2015). Comparative genomics, proteomics and transcriptomics give new insight into the exoproteome of the basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum* and its involvement in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 208, 1169–1187. doi: 10.1111/nph.13546
- Eastwood, D. C., Floudas, D., Binder, M., Majcherczyk, A., Schneider, P., Aerts, A., et al. (2011). The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi. *Science* 333, 762–765. doi: 10.1126/science.1205411
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., and von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. J. Mol. Biol. 300, 1005–1016. doi: 10.1006/jmbi.2000.3903
- Essig, A., Hofmann, D., Münch, D., Gayathri, S., Künzler, M., Kallio, P. T., et al. (2014). Copsin, a novel peptide-based fungal antibiotic interfering with the peptidoglycan. J. Biol. Chem. 289, 34953–34964. doi: 10.1074/jbc.M114.599878
- Figueiredo, A., Monteiro, F., and Sebastiana, M. (2014). Subtilisin-like proteases in plant-pathogen recognition and immune priming: a perspective. *Front. Plant Sci.* 5:739. doi: 10.3389/fpls.2014.00739
- Finn, R. D., Clements, J., and Eddy, S. R. (2011). HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res.* 39 (Web Server issue), W29– W37. doi: 10.1093/nar/gkr367
- Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R. A., Henrissat, B., et al. (2012). The paleozoic origin of enzymatic from 31 fungal genomes. *Science* 336, 1715–1719. doi: 10.1126/science.1221748
- Franklin, O., Näsholm, T., Högberg, P., and Högberg, M. N. (2014). Forests trapped in nitrogen limitation - an ecological market perspective on ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 203, 657–666. doi: 10.1111/nph.12840
- Frey, S., Lahmann, Y., Hartmann, T., Seiler, S., and Pöggeler, S. (2015). Deletion of *S mgpi1* encoding a GPI-anchored protein suppresses sterility of the STRIPAK mutant ∆Smmob3 in the filamentous ascomycete *S ordaria macrospora*. *Mol. Microbiol.* 97, 676–697. doi: 10.1111/mmi.13054
- Garcia, K., Delaux, P. M., Cope, K. R., and Ané, J. M. (2015). Molecular signals required for the establishment and maintenance of ectomycorrhizal symbioses. *New Phytol.* 208, 79–87. doi: 10.1111/nph.13423

- Geisseler, D., Horwath, W. R., and Scow, K. M. (2011). Soil moisture and plant residue addition interact in their effect on extracellular enzyme activity. *Pedobiologia* 54, 71–78. doi: 10.1016/j.pedobi.2010.10.001
- Giraldo, M. C., and Valent, B. (2013). Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 800–814. doi: 10.1038/nrmicro3119
- Grigoriev, I. V., Nikitin, R., Haridas, S., Kuo, A., Ohm, R., Otillar, R., et al. (2014). MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Res.* 42, 1–6. doi: 10.1093/nar/gkt1183
- Hibbett, D. S., and Matheny, P. B. (2009). The relative ages of ectomycorrhizal mushrooms and their plant hosts estimated using Bayesian relaxed molecular clock analyses. *BMC Biol.* 7:13. doi: 10.1186/1741-7007-7-13
- Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J., et al. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.* 35, 585–587. doi: 10.1093/nar/gkm259
- Hu, G., and Leger, R. J. (2004). A phylogenomic approach to reconstructing the diversification of serine proteases in fungi. J. Evol. Biol. 17, 1204–1214. doi: 10.1111/j.1420-9101.2004.00786.x
- Huang, Y., Niu, B., Gao, Y., Fu, L., and Li, W. (2010). CD-HIT suite: a web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinformatics* 26, 680–682. doi: 10.1093/bioinformatics/btq003
- Katoh, K., and Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780. doi: 10.1093/molbev/mst010
- Kloppholz, S., Kuhn, H., and Requena, N. (2011). A secreted fungal effector of glomus intraradices promotes symbiotic biotrophy. *Curr. Biol.* 21, 1204–1209. doi: 10.1016/j.cub.2011.06.044
- Kohler, A., Kuo, A., Nagy, L. G., Morin, E., Barry, K. W., Buscot, F., et al. (2015). Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nat. Genet.* 47, 410–415. doi: 10.1038/ng.3223
- Krijger, J.-J., Thon, M. R., Deising, H. B., and Wirsel, S. G. R. (2014). Compositions of fungal secretomes indicate a greater impact of phylogenetic history than lifestyle adaptation. *BMC Genomics* 15:722. doi: 10.1186/1471-2164-15-722
- Lakshmanan, V., Selvaraj, G., and Bais, H. (2014). Functional soil microbiome: belowground solutions to an aboveground problem. *Plant Physiol.* 166, 689–700. doi: 10.1104/pp.114.245811
- Levasseur, A., Drula, E., Lombard, V., Coutinho, P. M., and Henrissat, B. (2013). Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnol. Biofuels* 6:41. doi: 10.1186/1754-6834-6-41
- Lindahl, B. D., and Tunlid, A. (2015). Ectomycorrhizal fungi-potential organic matter decomposers, yet not saprotrophs. *New Phytol.* 205, 1443–1447. doi: 10.1111/nph.13201
- Linder, M. B., Szilvay, G. R., Nakari-Setälä, T., and Penttilä, M. E. (2005). Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 877–896. doi: 10.1016/j.femsre.2005.01.004
- Martin, F. M., and Kamoun, S. (eds.). (2011). "Effectors in plant-microbe interactions," in *Effectors in Plant–Microbe Interactions* (Chichester, UK: Wiley-Blackwell), i–xvi.
- Martin, F., and Nehls, U. (2009). Harnessing ectomycorrhizal genomics for ecological insights. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 508–515. doi: 10.1016/j.pbi.2009.05.007
- Melén, K., Krogh, A., and von Heijne, G. (2003). Reliability measures for membrane protein topology prediction algorithms. J. Mol. Biol. 327, 735–744. doi: 10.1016/S0022-2836(03)00182-7
- Murphy, E., Smith, S., and De Smet, I. (2012). Small signaling peptides in Arabidopsis development: how cells communicate over a short distance. *Plant Cell* 24, 3198–3217. doi: 10.1105/tpc.112.099010
- Muszewska, A., Taylor, J. W., Szczesny, P., and Grynberg, M. (2011). Independent subtilases expansions in fungi associated with animals. *Mol. Biol. Evol.* 28, 3395–3404. doi: 10.1093/molbev/msr176
- Nehls, U. (2008). Mastering ectomycorrhizal symbiosis: the impact of carbohydrates. J. Exp. Bot. 59, 1097–1108. doi: 10.1093/jxb/erm334
- Nickel, W., and Rabouille, C. (2009). Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 10, 148–155. doi: 10.1038/nrm2645
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8, 785–786. doi: 10.1038/nmeth.1701
- Plett, J. M., Daguerre, Y., Wittulsky, S., Vayssières, A., Deveau, A., Melton, S. J., et al. (2014). Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria*

bicolor stabilizes the Populus JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 8299–8304. doi: 10.1073/pnas.1322671111

- Plett, J. M., Kemppainen, M., Kale, S. D., Kohler, A., Legué, V., Brun, A., et al. (2011). A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Curr. Biol.* 21, 1197–1203. doi: 10.1016/j.cub.2011.05.033
- Plett, J. M., and Martin, F. (2015). Reconsidering mutualistic plant-fungal interactions through the lens of effector biology. *Curr. Opin. Plant Biol.* 26, 45–50. doi: 10.1016/j.pbi.2015.06.001
- Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., et al. (2015). Fungal effectors and plant susceptibility. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 513–545. doi: 10.1146/annurev-arplant-043014-114623
- R Core Team (2014). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- Riley, R., Salamov, A. A., Brown, D. W., Nagy, L. G., Floudas, D., Held, B. W., et al. (2014). Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 9923–9928. doi: 10.1073/pnas.1400592111
- Rineau, F., Roth, D., Shah, F., Smits, M., Johansson, T., Canbäck, B., et al. (2012). The ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* converts organic matter in plant litter using a trimmed brown-rot mechanism involving Fenton chemistry. *Environ. Microbiol.* 14, 1477–1487. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02736.x
- Rineau, F., Shah, F., Smits, M. M., Persson, P., Johansson, T., Carleer, R., et al. (2013). Carbon availability triggers the decomposition of plant litter and assimilation of nitrogen by an ectomycorrhizal fungus. *ISME J.* 1–13. doi: 10.1038/ismej.2013.91
- Rovenich, H., Boshoven, J. C., and Thomma, B. P. (2014). Filamentous pathogen effector functions: of pathogens, hosts and microbiomes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 20C, 96–103. doi: 10.1016/j.pbi.2014.05.001
- Ryberg, M., and Matheny, P. B. (2012). Asynchronous origins of ectomycorrhizal clades of Agaricales. Proc. Biol. Sci. R. Soc. 279, 2003–2011. doi: 10.1098/rspb.2011.2428
- Saunders, D. G. O., Win, J., Cano, L. M., Szabo, L. J., Kamoun, S., and Raffaele, S. (2012). Using hierarchical clustering of secreted protein families to classify and rank candidate effectors of rust fungi. *PLoS ONE* 7:e29847. doi: 10.1371/journal.pone.0029847
- Schimel, J. P., and Schaeffer, S. M. (2012). Microbial control over carbon cycling in soil. *Front. Microbiol.* 3:348. doi: 10.3389/fmicb.2012.00348
- Shah, F., Rineau, F., Canbäck, B., Johansson, T., and Tunlid, A. (2013). The molecular components of the extracellular protein-degradation pathways of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytol.* 200, 875–887. doi: 10.1111/nph.12425
- Shen, H., Chen, S. M., Liu, W., Zhu, F., He, L. J., Zhang, J. D., et al. (2015). Abolishing cell wall glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in candida albicans enhances recognition by Host Dectin-1. *Infect. Immun.* 83, 2694–2704. doi: 10.1128/IAI.00097-15
- Sperschneider, J., Gardiner, D. M., Thatcher, L. F., Lyons, R., Singh, K. B., Manners, J. M., et al. (2015). Genome-wide analysis in three fusarium pathogens identifies rapidly evolving chromosomes and genes associated with pathogenicity. *Genome Biol. Evol.* 7, 1613–1627. doi: 10.1093/gbe/evv092
- Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688–2690. doi: 10.1093/bioinformatics/btl446
- Stergiopoulos, I., and de Wit, P. J. G. M. (2009). Fungal effector proteins. Annu. Rev. Phytopathol. 47, 233–263. doi: 10.1146/annurev.phyto.112408.132637
- Talavera, G., and Castresana, J. (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst. Biol.* 56, 564–577. doi: 10.1080/10635150701472164

- Talbot, J. M., Bruns, T. D., Smith, D. P., Branco, S., Glassman, S. I., Erlandson, S., et al. (2013). Independent roles of ectomycorrhizal and saprotrophic communities in soil organic matter decomposition. *Soil Biol. Biochem.* 57, 282–291. doi: 10.1016/j.soilbio.2012.10.004
- Tian, C., Beeson, W. T., Iavarone, A. T., Sun, J., Marletta, M. A., Cate, J. H. D., et al. (2009). Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus Neurospora crassa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 22157–22162. doi: 10.1073/pnas.0906810106
- Trejo-Hernández, A., Andrade-Domínguez, A., Hernández, M., and Encarnación, S. (2014). Interspecies competition triggers virulence and mutability in Candida albicans-Pseudomonas aeruginosa mixed biofilms. *ISME J.* 8, 1974–1988. doi: 10.1038/ismej.2014.53
- van den Brink, J., and de Vries, R. P. (2011). Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 1477–1492. doi: 10.1007/s00253-011-3473-2
- van Ooij, C. (2011). Symbiosis: establishing the roots of a relationship. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 629. doi: 10.1038/nrmicro2642
- Veneault-Fourrey, C., and Martin, F. (2011). Mutualistic interactions on a knifeedge between saprotrophy and pathogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 444–450. doi: 10.1016/j.pbi.2011.03.022
- Vincent, D., Kohler, A., Claverol, S., Solier, E., Joets, J., Gibon, J., et al. (2012). Secretome of the free-living mycelium from the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor. J. Proteome Res.* 11, 157–171. doi: 10.1021/pr20 0895f
- Voigt, C. A., Schäfer, W., and Salomon, S. (2005). A secreted lipase of Fusarium graminearum is a virulence factor required for infection of cereals. *Plant J.* 42, 364–375. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02377.x
- Wagg, C., Bender, S. F., Widmer, F., and van der Heijden, M. G. A. (2014). Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 5266–5270. doi: 10.1073/pnas.1320054111
- Wallander, H., Nilsson, L. O., Hagersberg, D., and Baath, E. (2001). Estimation of the biomass and seasonal growth of externalmycelium of ectomycorrhizal fungi in the field. *New Phytol.* 151, 753–760. doi: 10.1046/j.0028-646x.2001. 00199.x
- Win, J., Chaparro-Garcia, A., Belhaj, K., Saunders, D. G. O., Yoshida, K., Dong, S., et al. (2012). Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 77, 235–247. doi: 10.1101/sqb.2012.77.015933
- Zerillo, M. M., Adhikari, B. N., Hamilton, J. P., Buell, C. R., Lévesque, C. A., and Tisserat, N. (2013). Carbohydrate-active enzymes in pythium and their role in plant cell wall and storage polysaccharide degradation. *PLoS ONE* 8:e72572. doi: 10.1371/journal.pone.0072572
- Zhao, Z., Liu, H., Wang, C., and Xu, J. (2014). Correction: comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC Genomics* 15:6. doi: 10.1186/1471-2164-15-6

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

Copyright © 2015 Pellegrin, Morin, Martin and Veneault-Fourrey. This is an openaccess article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Chapitre IV

Localisation subcellulaire *in planta* d'effecteurs candidats sécrétés par le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor*

Publication n°2

'Candidate effector proteins from the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* can target distinct subcellular plant compartments'

Résumé : Ce chapitre s'intéresse à la localisation subcellulaire d'effecteurs potentiels de type MiSSPs de *L. bicolor* une fois adressés dans la cellule végétale. Un jeu de onze MiSSPs a été sélectionné sur la base de leur induction dans les ectomycorhizes établies entre *L. bicolor* et ces deux hôtes végétaux, le Peuplier (*Populus trichocarpa*) et le sapin de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*). Cette induction dans les deux hôtes de *L. bicolor* permet de poser l'hypothèse que ces MiSSPs assurent une fonction essentielle dans l'établissement de la symbiose. Les effecteurs fongiques déjà étudiés dans d'autres modèles fongiques sont supposés être transférés dans le cytoplasme, bien que peu de modèles permettent à l'heure actuelle d'étudier ce transfert (cela est possible chez *Ustilago maydis*, agent phytopathogène du maïs et *Magnaporthe oryzae*, agent phytopathogène du riz).

De manière à localiser les MiSSPs *in planta*, une protéine fusion avec la eGFP en N-Terminale de la forme mature des SSPs (i.e, sans signal peptide) est exprimée dans des feuilles de tabacs avant observation en microscopie confocale à balayage laser. Bien que les MiSSPs soient exprimées en système hétérologue, impliquant que les cibles végétales soient conservées (i.e, ni spécifique du tissus, ni de l'hôte), trois d'entre elles localisent dans le nucléole ou le cytoplasme. Ce résultat suggére que ces MiSSPs ciblent le métabolisme de la cellule végétale, les rapprochant des effecteurs d'agents phytopathogènes. Ce chapitre est présenté sous forme d'un article de recherche rédigé en anglais mais il est prévu de prolonger cette étude en exprimant le même jeu de MiSSPs dans des racines de Peuplier via l'infection par *Agrobacterium rhizogenes*. Cette approche permettra non seulement de confirmer la localisation des MiSSPs d'intérêt, mais aussi d'évaluer la fiabilité du système hétérologue utilisé dans la localisation d'effecteurs potentiels de *L. bicolor* et la recherche d'interactants par co-immunoprécipitation *in planta*.
Candidate effector proteins from the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* can target distinct subcellular plant compartments.

<u>Clément Pellegrin^{1,2}</u>, Yohann Daguerre^{1,2}, Frederic Guinet¹, Annegret Kohler^{1,2}, Francis Martin² and Claire-Veneault-Fourrey^{1,2}*

¹ Université de Lorraine, UMR 1136 Interactions Arbres/Microorganismes, Vandœuvre-lès-Nancy, France

² Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UMR 1136 Interactions Arbres/Microorganismes, Laboratoire d'Excellence ARBRE, INRA-Nancy, 54280 Champenoux, France.

Abstract

Soil-borne ectomycorrhizal (ECM) fungi are able to form mutualistic symbiosis with trees by surrounding plant root cortex cells with their hyphae and establishing a long term relationships with their hosts. Although colonization of plant root cortex by ectomycorrhizal fungi hyphae have long been studied, little is known about the molecular dialogue which occurs between the symbiont and its partner and which factors protect ectomycorrhizal symbiont from plant defense reactions. Genome-wide transcriptomic analysis of Laccaria bicolor revealed among the most symbiosis induced genes, transcripts encoding for smallsecreted proteins, so called Mycorrhiza induced Small-Secreted proteins (MiSSPs). These MiSSPs share common features with pathogenic effectors, known as cornerstone in plantpathogenic interactions, which target plant metabolism by entering in a wide range of plant compartments. In order to assess the ability of MiSSP proteins to target distinct subcellular plant compartments, we selected a set of eleven MiSSPs induced both in ECM-root tips of Laccaria bicolor with Populus trichocarpa and Pseudotsuga menziesii. We performed in planta subcellular localization of these MiSSPs, using the plant model Nicotiana benthamiana. Among the eleven MiSSPs transiently expressed, three MiSSPs are able to target distinct plant compartments, whereas eight of them display nucleo-cytoplasmic localization as GFP alone. These results give an insight on the diversity of plant compartments that candidate effector proteins from an ectomycorrhizal symbiont can target and identify some candidates for further functional analysis.

Introduction

Soils of temperate forest hold a wide diversity of microorganisms able to perform either biotic interactions or inside their environment, leading to a continuum of interrelationships ranging from saprotrophism to parasitism. These microorganisms are involved in carbon and nitrogen cycling and thus play a major role in ecosystem functioning (Schimel & Schaeffer, 2012; Itoo & Reshi, 2013 ; Phillips et al, 2014). As a consequence, the microbiome is directly linked to forest sustainability and productivity. Fungi play a major role due to their ability to degrade complex polysaccharides through enzymatic degradation and non-enzymatic decomposition (Lindahl & Tunlid, 2015). Fungi also establish complex biotic interactions including pathogenic and mutualistic symbiosis (Raaijmakers et al, 2009). The ectomycorrhizal fungi are soil-borne fungi able to colonize roots of trees found in temperate forest (Wang, 2006). This colonization leads to a long-term relationship between fungal hyphae and trees, allowing a bi-directional exchange of nutrients between the two partners (Nehls et al, 2010). In order to allow this exchange to occur, ECM fungi colonize plant root cortex with a network of labyrinthic hyphae, creating the so-called Hartig Net. This Hartig net is considered as the symbiotic interface between host and symbiont. Although nutrients exchanges between plant and ECM fungus are well documented (Behie & Bidochka, 2014), it remains unclear how ECM fungi are able to maintain an intimate relationships over the long term without triggering plant defense reactions.

A few years ago, genome-wide transcriptomic analyses of *Laccaria bicolor* identified fifty genes encoding for predicted small secreted proteins and whose expression is strongly induced by symbiosis (Martin et al, 2008). These so-called MiSSPs, Mycorrhiza-induced Small Secreted Proteins, share some features with small-secreted proteins found in plant pathogenic microorganisms. Thus, it has been suggested that MiSSPs may be involved in ECM symbiosis establishment and/or functioning (Martin et al, 2008). Known effectors from plant pathogenic microbes are either apoplastic or translocated into the host through a specialized structure such as the haustorium for some filamaentous fungi and oomycetes (Lo Presti et al, 2015) or Type 3 Secretion System for pathogenic bacteria (McCann & Gutmann, 2008). Once translocated into host cells, these effectors are able to target a wide range of plant compartments in order to counteract plant defense responses and thus allow pathogenic microorganisms to fulfill their lifecycle, either by killing the host plant or by using host resources to fulfill biotrophic pathogens (Dou & Zhou, 2012). Therefore, effectors promote pathogenic lifecycle by interacting in distinct subcellular compartments with various plant

protein partners (Caillaud et al, 2012,2014 ; Petre et al, 2015a,b). MYCORRHIZA-INDUCED SMALL SECRETED PROTEIN of 7kDa is the first symbiotic effector characterized (Plett et al, 2011). MiSSP7 is interacting with a key regulator of jasmonate signaling pathway, the repressor protein Jasmonate Zim domain (JAZ) PtJAZ6 (Plett et al, 2014). Binding of MiSSP7 to PtJAZ6 in host nuclei stabilizes the JAZ6 protein by preventing its JA-mediated degradation. This led to the suppression of JA-dependent gene expression. These results suggest that, like plant pathogenic microbes, ECM fungi use effectors to target plant host hormone pathways to sustain fungal colonization. Consequently, it is of great interest to understand what could be the role of the fifty other MiSSPs of *Laccaria bicolor* identified *in silico*. The first step was therefore to identify the *in planta* subcellular localisation of these MiSSPs.

In this study, we firstly identified *L. bicolor* MiSSP encoding genes, which are induced in both ECM root tips formed with *Populus trichocarpa* (poplar) and *Pseudotsuga menziesii* (Douglas fir), as these MiSSPs are indeed good candidates for being involved in major, common processes driving the symbiosis establishment and/or functioning. Given that it is not possible with our system to deliver the candidate effector via the symbiont, we then used an *Agrobacterium tumefaciens* transient expression assay in *N. benthamiana* leaves. This assay is widely used for this kind of analysis in plant microbe interactions (Tzfira & Citovsky, 2008). We then transiently expressed each MiSSPs fused to the GFP protein into *Nicotiana benthamiana* leaves and characterize the subsequent subcellular localization using confocal laser-scanning microscopy (CLSM). We found three MiSSPs are able to target distinct subcellular plant compartment such as nucleolus or cytoplasm. These MiSSPs are good candidates for further functional analysis.

Results

Transcript profiling identified *L. bicolor* MiSSPs transcripts induced in Poplar and Douglas fir ectomycorrhiza.

In order to identify potential candidate effectors, we used a published microarray dataset to select MiSSPs that (i) are induced in ECM root tips of both *Populus trichocarpa* and *Pseudotsuga menziesii*, (ii) have no predicted PFAM domain and (iii) are *Laccaria*-specific (**Figure 1A**). Microarray analysis revealed 11 MiSSP whose transcript having an expression level significantly increased (\geq 5 fold compared to the free-living mycelium) in *P.trichocarpa* and *Pseudotsuga menziesii* ectomycorrhiza (**Figure 1B, Table 1**).



Figure 1 : Identification and *in planta* subcellular localization of 11 MISSPs proteins from *Laccaria bicolor*. (A) Greenhouse ectomycorrhiza between *Laccaria bicolor* and two different hosts, Poplar (*Populus trichocarpa*) and Douglas fir (*Pseudotsuga menziesil*) have been harvested, RNA extracted and hybridized on a NimbleGen microarray constructed with *Laccaria bicolor* genome (Martin et al, 2008). (B) 11 MISSPs have been identified as over-expressed in ECM root-tips compared to the free-living myceilum. (C) Translent expression in Nicotiana benthamiana leaves of MiSSPs fused to eGFP before imaging with confocal laser scanning microscopy. Abbreviations: eGFP = enhanced Green Fluorescenct Protein, ORF = Open Reading Frame, Kan = Kanamycine, LB/RB = Left border / Right border.

Level of induction vary amongst MiSSPs but is similar between Poplar and Douglas fir ECM, showing these MiSSP are induced whatever the plant host (**Figure 1B**). We carried out subcellular localization on this set of eleven MiSSPs (**Figure 1C**) as we consider them more likely involved in core mechanisms controlling the symbiosis establishment and/or functioning than in host specificity.

MiSSP proteins localizes in different subcellular compartments *in Nicotiana benthamiana* leaves

Once the set of candidate effectors was identified, we performed *in planta* subcellular localization by creating a N-terminal fusion comprising the mature protein sequence of each of the 11 MiSSPs selected (i.e, without the signal peptide) and the eGFP protein driven by a 35S promoter. Among 11 MiSSPs transiently expressed in *N. benthamiana*, three MiSSPs localized in different and distinct plant compartments (**Figure 2A-C**), the eight remaining MiSSPs displaying a nucleo-cytoplasmic localization as GFP alone do (**Figure 2D-K**). The three MiSSPs of interest are either excluded from nucleus (MiSSP11.6, MiSSP25.3) or targeted to the nucleolus (MiSSP31). MiSSP31, which localized inside the nucleolus, contains a predicted NLS sequence and is predicted as a RNA-binding protein by KOG database, consistent with its localization in the nucleolus region accumulating ribosomic RNA. MiSSP25.3 and MiSSP11.6 are strictly excluded from the nucleus. MISSP25.3 contains a domain DUF965 whose function remains unknown. MiSSP11.6 does not have any conserved domain.

Discussion

In this study, we analyzed ectomycorrhiza transcript profilings to identify a set of MiSSP whose encoding genes are induced in both poplar and Douglas fir ectomycorrhizal root tips. We then applied a high throughput screening workflow developed to identify candidate effectors from filamentous pathogenic fungi (Petre et al, 2015a). We expressed this set of MiSSP in tobacco leaves in order to assess the ability of these candidate effectors from an ectomycorrhizal symbiont to target distinct subcellular compartment. We found at least three candidate effectors from L. bicolor target distinct host cell compartments, suggesting they are affecting the plant metabolism. Microarray constructed with *L. bicolor* gene models (V1.0) were used to produce transcript profiles of fungal genes expression on ectomycorrhizae from Poplar (*Populus trichocarpa*) or Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*). A core regulon containing several MiSSPs proteins expressed at all stages of ectomycorrhizal symbiosis in



Figure 2: MiSSP proteins are targeted to distinct plant compartments.

Transient expression of N-Terminal fusion between EGFP and MiSSP in tobacco leaves show diverse plant compartments targeted by MiSSP proteins. Three MiSSPs are able to target specific subcellular compartment such as the nucleolus (A) or are excluded from the nucleus (B,C). By contrast, the other MiSSPs have a nucleocytoplasmic localization as GFP alone (D-K).

Poplar and Douglas fir ECM root tips and a variable regulon suspected to be involved in host specificity were characterized (Plett et al, 2015).

MiSSPs are addressed to distinct host cellular compartments.

In planta expression of 11 MiSSPs proteins showed that three of them target different subcellular host compartment: nucleolus or cytoplasm, suggesting *L. bicolor* may use MiSSPs to alter host gene expression, regulation and/or cytoplasmic metabolic pathway. This strategy is well known and studied in plant pathogenic microorganisms in which multiple effectors target different plant compartments in order to promote pathogenicity (Rovenich et al, 2014). For instance, six candidate effectors from poplar foliar rust *Melampsora larici populina*, an obligate biotrophic fungus, target different subcellular compartment such as nucleolus, nucleus, chloroplasts and mitochondria once expressed in tobacco leaves (Petre et al, 2015a). One of them, CTP1, is able to target chloroplast and mitochondria by mimicking host-transit peptide once translocated into plant cells (Petre et al, 2015b). In *L. bicolor*, the effector protein MiSSP7 is addressed to the plant nucleus and interacts with PtJAZ6 protein in order to prevent its JA-mediated degradation by proteasome, leading to host gene modification (Plett, Daguerre, Wittulsky et al, 2014).

The candidate effector MiSSP31 targets the host nucleolus

Among MiSSPs studied, MiSSP31 was located inside the nucleolus, a specific region of the nucleus where ribosomal rDNA are transcribed into rRNA and ribosome subunits assembly occurs (Boisvert et al, 2007). Such subcellular addressing has previously been reported for candidate effectors in plant pathogenic fungi, with putative interactants identified using *in planta* co-immunoprecipitation but their function remains unknown (Petre et al, 2015a). Moreover, in *Legionella pneumophilia*, LegAS4 effector protein is delivered to the host cells through a type IV Secretion System (T4SS) before interacting with rDNA chromatin region inside the host nucleolus, altering host gene expression (Li et al, 2013 ; Rolendo et al, 2013). These results suggest another common way for biotrophic fungi and bacteria to modify gene expression of their host and interact with the machinery of host gene expression regulation.

MiSSP25.3 and MiSSP11.6 are addressed to the cytoplasm or are restrained to the plasma membrane, but do not reach the nucleus. Cytoplasmic effectors have been intensively studied among plant pathogenic fungi, where they have been shown to be translocated into cytoplasm before targeting several different functions of the host cell such as host ubiquitylation system

(Park et al, 2012, reviewed in Banfield, 2015) or hormone signaling (Djamei et al, 2011). One can hypothesize than it exists common cellular targets between mutualism effectors and plant pathogen effectors, as it has been shown for MiSSP7 (Plett, Daguerre, Wittulsky et al, 2014), but also cellular targets specific to the mutualistic lifestyle which implies a long term relationships with the plant hosts. Further functional analysis such as plasmolyysis experiment and identification of putative protein partners are necessary to clarify localisation and impact of these two MiSSPs on plant cell metabolism and physiology.

Effectors with nucleo-cytoplasmic localization

Eight over 11 MiSSPs studied display a nucleo-cytoplasmic localization. This localization is difficult to interpret and thus considered as non-informative, as the expression of a single GFP leads to a similar subcellular localization. However, we can hypothesize three different explanations regarding L. bicolor candidate effectors with a nucleo-cytoplasmic localization: (i) they might interact with a nucleo-cytoplasmic interactant. (ii) they target host-specific proteins absent in *N.benthamiana* or root-specific proteins not present in leaves. Biases in the expression of candidate effectors in a heterologous system could be assessed by expressing the same set of candidates genes in poplar roots through A. rhizogenes-mediated transformation, although currently available protocols are not very efficient (Cseke et al, 2007). This would allow validation or not of N. benthamiana as an effective system to easily screen candidate effectors. (iii) They are apoplastic effectors. Expressing mature form of the candidate effectors (i.e, without signal peptide) exclude all the effectors present in the apoplastic space rather than a cytosolic organelle. Apoplastic effectors are known to play a key role in pathogenic interactions by inhibiting protease, chitinase activity (Song et al, 2009; Kaschani et al, 2010) or hiding fungal hyphae from plant Pattern Recognition Receptor detection (Sanchez-Vallet et al, 2013; Mentlak et al, 2012). Expression of the same set of candidates with their signal peptide would allow to determine whether some of them are addressed to the apoplastic compartment or not. In this study, only 27% of L. bicolor candidate effectors studied gave an distinct subcellular localization, lower than efficiencies (40%) obtained with poplar and wheat yellow rust candidate effectors (Petre et al, 2015a/b), likely due to expression in leaf of candidate effectors usually expressed in roots.

Conclusions

In this study, we used an *in silico* pipeline and a heterologous expression system to identify subcellular localization of a set of candidate effectors from the mutualistic symbiont L. *bicolor* whose expression is significantly up-regulated in two hosts of *L. bicolor*, *P. trichocarpa* and *P. menziesii*. We then expressed this set of 11 MiSSPs *in planta* in order to assess their ability to reach different subcellular plant compartments and identify MiSSPs of particular interest. Our results identify three MiSSPs which targets nucleolus or are excluded from the nucleus, pointing out the interest for further functional investigations for these MiSSPs.

Materials and Methods

Accession number

The complete expression datasets are available as series (accession number GSE62225 and GSE62226 at the Gene Expression Omnibus at the National Center for Biotechnology Information website.

Bacterial strains and molecular cloning

The opening reading frame (ORF) of the candidate effectors MiSSPs, flanked with *attb* sequences and corresponding to mature form of proteins (i.e, without the signal peptide), have been first gene synthesized into pBluescriptII SK vector (Genecust, Luxembourg). LR Cloning reaction with destination vector pK7WFG2 (Gent University) were performed according to manufacturer's instructions (Invitrogen).

Transient protein expression in Nicotiana benthamiana leaf cells

Electrocompetent *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 have been transformed with pK7WFG2 vectors containing ORF of interest. Overnight grown *A.tumefaciens GV3101* have been incubated into infiltration buffer (10mM MgCl₂, 10mM MES pH5.6, 150uM acetosyringone) 1 hour with gentle agitation. O.D is adjusted to 0.2 prior to leaf infiltration in four weeks-old *Nicotiana benthamiana* leaves. Imaging has been performed after 20 to 30 hours post infiltration.

Western blot

Infiltrated *N.benthamiana* leaves were frozen and ground in liquid nitrogen into powder, boiled in Laemmli buffer at 90°C for 15min, centrifugated 5 min. at 13000 rpm. 10ul of supernatant was load on a 4-20% Tris-Glycine gel.

Immunoblot analyses

SDS-PAGE gel were electrotransfered onto a PVDF membrane with a trans-blot device (Biorad). Membrane were blocked in PBS 0.05% Tween20 3% BSA, then incubated overnight with anti-GFP primary antibody (Abcam, United Kingdom). Detection has been done with a Horse radish peroxidase conjugated secondary antibody targeting primary antibody and the Clarity ECL substrate kit (Biorad). Imaging has been carried out on a Chemidoc XRS imager (Biorad, USA).

Acknowledgments

This work was supported by the French National Research Agency through the Laboratory of Excellence ARBRE (grant no. ANR-11-LBX-002-01), the Plant-Microbe Interactions Project, Genomic Science Program, of the U.S. Department of Energy, Office of Science, Biological, and Environmental Research (grant no. DE-AC05-00OR22725), the Institut National de la Recherche Agronomique, the Région de Lorraine, and the European Fund for Regional Development (funding for the Functional Genomics Facilities at Institut National de la Recherche Agronomique), the Université de Lorraine (Ph.D. scholarship to CP).

References

Banfield, M. J. 2015. Perturbation of host ubiquitin systems by plant pathogen/pest effector proteins. Cellular Microbiology. 17:18–25

- Behie, S. W., and Bidochka, M. J. 2014. Nutrient transfer in plant-fungal symbioses. Trends in plant science. :1–7
- Boisvert, F.-M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J., and Lamond, A. I. 2007. The multifunctional nucleolus. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 8:574–585
- Caillaud, M. C., Piquerez, S. J. M., Fabro, G., Steinbrenner, J., Ishaque, N., Beynon, J., and Jones, J. D. G. 2012. Subcellular localization of the Hpa RxLR effector repertoire identifies a tonoplast-associated protein HaRxL17 that confers enhanced plant susceptibility. Plant Journal. 69:252–265
- Caillaud, M.-C., Wirthmueller, L., Sklenar, J., Findlay, K., Piquerez, S. J. M., Jones, A. M. E., Robatzek, S., Jones, J. D. G., and Faulkner, C. 2014. The Plasmodesmal Protein PDLP1 Localises to Haustoria-Associated Membranes during Downy Mildew Infection and Regulates Callose Deposition. PLoS Pathogens. 10:e1004496
- Cseke, L. J., Cseke, S. B., and Podila, G. K. 2007. High efficiency poplar transformation. Plant Cell Reports. 26:1529–1538
- Djamei, A., Schipper, K., Rabe, F., Ghosh, A., Vincon, V., Kahnt, J., Osorio, S., Tohge, T., Fernie, A. R., Feussner, I., Feussner, K., Meinicke, P., Stierhof, Y.-D., Schwarz, H., Macek, B., Mann, M., and Kahmann, R. 2011. Metabolic priming by a secreted fungal effector. Nature. 478:395–398
- Dou, D., and Zhou, J.-M. 2012. Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground. Cell host & microbe. 12:484–95
- Itoo, Z., and Reshi, Z. 2013. The Multifunctional Role of Ectomycorrhizal Associations in Forest Ecosystem Processes. The Botanical Review. 79:371–400

- Kaschani, F., Shabab, M., Bozkurt, T., Shindo, T., Schornack, S., Gu, C., Ilyas, M., Win, J., Kamoun, S., and van der Hoorn, R. a L. 2010. An effector-targeted protease contributes to defense against Phytophthora infestans and is under diversifying selection in natural hosts. Plant physiology. 154:1794–1804
- Lindahl, B., and Tunlid, A. 2014. Ectomycorrhizal fungi-potential organic matter decomposers, yet not saprotrophs. New Phytologist. 205:1443–1447
- Li, T., Lu, Q., Wang, G., Xu, H., Huang, H., Cai, T., Kan, B., Ge, J., and Shao, F. 2013. SETdomain bacterial effectors target heterochromatin protein 1 to activate host rDNA transcription. EMBO reports. 14:733–40
- Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., Zuccaro, A., Reissmann, S., and Kahmann, R. 2015. Fungal Effectors and Plant Susceptibility. Annual Review of Plant Biology. 66:513–545
- Martin, F., Aerts, A., Ahrén, D., Brun, A., Danchin, E. G., Duchaussoy, F., Gibon, J., Kohler, A., Lindquist, E., Pereda, V., Salamov, A., Shapiro, H. J., Wuyts, J., Blaudez, D., Buée, M., Brokstein, P., Canb"ack, B., Cohen, D., Courty, P. E., Coutinho, P. M., Delaruelle, C., Detter, J. C., Deveau, A., S, DiFazio, Duplessis, S., L, Fraissinet-Tachet, Lucic, E., P, Frey-Klett, Fourrey, C., Feussner, I., Gay, G., Grimwood, J., Hoegger, P. J., Jain, P., Kilaru, S., Labbé, J., Lin, Y. C., Legué, V., Le Tacon, F., Marmeisse, R., Melayah, D., Montanini, B., Muratet, M., Nehls, U., H, Niculita-Hirzel, Oudot-Le Secq, M. P., Peter, M., Quesneville, H., Rajashekar, B., Reich, M., Rouhier, N., Schmutz, J., Yin, T., Chalot, M., Henrissat, B., K"ues, U., Lucas, S., de Peer, Y., Podila, G. K., Polle, A., Pukkila, P. J., Richardson, P. M., Rouzé, P., Sanders, I. R., Stajich, J. E., Tunlid, A., Tuskan, G., and Grigoriev, I. V. 2008. The genome of Laccaria bicolor provides insights into mycorrhizal symbiosis. Nature. 452:88–92
- McCann, H. C., and Guttman, D. S. 2008. Evolution of the type III secretion system and its effectors in plant-microbe interactions. New Phytologist. 177:33–47
- Mentlak, T. a, Kombrink, A., Shinya, T., Ryder, L. S., Otomo, I., Saitoh, H., Terauchi, R., Nishizawa, Y., Shibuya, N., Thomma, B. P. H. J., and Talbot, N. J. 2012. Effectormediated suppression of chitin-triggered immunity by magnaporthe oryzae is necessary for rice blast disease. The Plant cell. 24:322–35
- Nehls, U., Göhringer, F., Wittulsky, S., and Dietz, S. 2010. Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: A review. Plant Biology. 12:292–301
- Park, C.-H., Chen, S., Shirsekar, G., Zhou, B., Khang, C. H., Songkumarn, P., Afzal, A. J., Ning, Y., Wang, R., Bellizzi, M., Valent, B., and Wang, G.-L. 2012. The Magnaporthe oryzae Effector AvrPiz-t Targets the RING E3 Ubiquitin Ligase APIP6 to Suppress Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity in Rice. The Plant cell. :1– 16
- Petre, B., Saunders, D. G. O., and Sklenar, J. 2015a. Candidate Effector Proteins of the Rust Pathogen Melampsora larici-populina Target Diverse Plant Cell Compartments. Molecular Plant-Microbe Interactions. 28:689–700
- Petre, B., Saunders, D. G. O., Sklenar, J., Lorrain, C., Krasileva, K. V., Win, J., Duplessis, S., and Kamoun, S. 2015b. In planta expression screens of candidate effector proteins from the wheat yellow rust fungus reveal processing bodies as a pathogen-targeted plant cell compartment. bioRxiv.

- Phillips, L., Ward, V., and Jones, M. 2013. Ectomycorrhizal fungi contribute to soil organic matter cycling in sub-boreal forests. The ISME journal. :1–15
- Plett, J. M., Daguerre, Y., Wittulsky, S., Vayssières, A., Deveau, A., Melton, S. J., Kohler, A., Morrell-Falvey, J. L., Brun, A., Veneault-Fourrey, C., and Martin, F. 2014. Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus Laccaria bicolor stabilizes the Populus JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 111:8299–304
- Plett, J. M., and Martin, F. 2015. Reconsidering mutualistic plant–fungal interactions through the lens of effector biology. Current Opinion in Plant Biology. 26:45–50
- Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C., and Moënne-Loccoz, Y. 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. Plant and Soil. 321:341–361
- Rolando, M., Sanulli, S., Rusniok, C., Gomez-Valero, L., Bertholet, C., Sahr, T., Margueron,
 R., and Buchrieser, C. 2013. Legionella pneumophila Effector RomA Uniquely Modifies
 Host Chromatin to Repress Gene Expression and Promote Intracellular Bacterial
 Replication. Cell Host & Microbe. 13:395–405
- Rovenich, H., Boshoven, J. C., and Thomma, B. P. 2014. Filamentous pathogen effector functions: of pathogens, hosts and microbiomes. Current opinion in plant biology. 20C:96–103
- Sánchez-Vallet, A., Saleem-Batcha, R., Kombrink, A., Hansen, G., Valkenburg, D.-J., Thomma, B. P., and Mesters, J. R. 2013. Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization. eLife. 2:e00790
- Schimel, J. P., and Schaeffer, S. M. 2012. Microbial control over carbon cycling in soil. Frontiers in Microbiology. 3:1–11
- Song, J., Win, J., Tian, M., Schornack, S., Kaschani, F., Ilyas, M., van der Hoorn, R. a L., and Kamoun, S. 2009. Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 106:1654–1659
- Tzfira, T., and Citovsky, V. 2008. Agrobacterium From Biology to Biotechnology.
- Wang, B., and Qiu, Y. L. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. Mycorrhiza. 16:299–363

Chapitre V

Contribution à l'analyse fonctionnelle de MiSSP8, un effecteur candidat nécessaire à la symbiose ectomycorhizienne

Partie I. MiSSP8 est lié à des protéines présentes chez les champignons saprotrophes

Publication n°3

'A small-secreted protein from *Laccaria bicolor* is required for ectomycorrhizal symbiosis and contains a motif found in proteins from saprotrophic fungi.'

Résumé : Ce chapitre traite de l'analyse fonctionnelle d'un effecteur candidats de *L. bicolor*, MYCORRHIZA INDUCED SMALL SECRETED PROTEIN of 8 kDa (MiSSP8). Le gène codant cette petite protéine sécrétée de cinquante acides aminés est l'un des gènes les plus induits dans la symbiose ectomycorhizienne établie avec le Peuplier et le sapin de Douglas (Martin et al. 2008). La première partie de ce chapitre est présentée sous la forme d'un article de recherche combinant mes travaux de thèse et une partie des travaux antérieurs issus de la thèse de Yohann Daguerre (Daguerre, 2014). Nous avons démontré que MiSSP8 de *Laccaria bicolor* est une MiSSP indispensable pour la formation d'ectomycorhize et la formation d'un manteau interne structuré. Le gène *MiSSP8* est surexprimé à la fois dans les tissus symbiotiques mais aussi dans le carpophore, suggérant un rôle de cette protéine dans l'agrégation des hyphes. La protéine MiSSP8 contient un motif de type DWRR, retrouvé uniquement dans des protéines de champignons saprotrophes et ectomycorhiziens, suggère qu'un motif protéique, présent dans des protéines liés à la saprotrophie, est aussi utilisé par des champignons ectomycorhiziens dans des protéines liés à la symbiose.

La deuxième partie de ce chapitre présente les résultats des analyses menées dans le but de mettre en évidence l'interactant et la fonction de la protéine MiSSP8. Des travaux antérieurs (Daguerre, 2014) avait permis d'identifier des interactants protéiques potentiels par double hybride en levure (Y2H). La validation de ces interactions a été entreprise et les résultats sont présentés. La localisation extracellulaire de MiSSP8 en feuille de Tabac, caractérisée à l'aide d'un système hétérologue, nous a conduit à tester l'interaction de MiSSP8 avec des glycanes pariétaux ou des lipides membranaires pouvant engendrer une activité microbienne. Ces hypothèses ont été testées. Les résultats sont discutés dans leur ensemble et des perspectives de recherche sont proposées.

A small-secreted protein from *Laccaria bicolor* is required for ectomycorrhizal symbiosis and contains a motif found in proteins from saprotrophic fungi.

Clément Pellegrin^{1,2}, Yohann Daguerre^{1,2}, Joske Ruytinx^{1,2}, Minna Kempainnen³ Emmanuelle Morin^{1,2}, Frédéric Guinet^{1,2}, Annegret Kohler^{1,2}, Alejandro Pardo³, Francis Martin^{1,2} & Claire-Veneault-Fourrey^{1,2}

Affiliations

¹ INRA, UMR 1136, Interactions Arbres/Microorganismes (IAM), Centre INRA de Nancy, Champenoux, France

² Université de Lorraine, UMR 1136, Interactions Arbres/Microorganismes (IAM), Faculté des Sciences, Vandoeuvre les Nancy, France

³ Laboratorio de Micologia Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnologia, Universidad Nacional de Quilmes and CONICET, Roque Saenz Pena 352, B1876 Bernal, Provincia de Buenos Aires, Argentina

Corresponding author : claire.fourrey@univ-lorraine.fr

Abstract

Ectomycorrhizal (ECM) symbioses are mutualistic interactions occurring between soil-borne fungi and roots of trees. This long-term mutualistic relationship suggests a strict coordination of both roots and fungal hyphae development with a control of plant defense reactions. ECM fungi have evolved from saprotrophic ancestors through the loss of a large set of plant cell wall degrading enzymes and a rapid turn-over of symbiotic genes. Among them, Mycorrhiza induced Small Secreted Proteins (MiSSP) are hypothesized to be symbiotic effectors acting like effectors of pathogenic microbes which manipulate host responses to promote pathogenicity. Here, we investigate requirement for ectomycorrhizal symbiosis establishment of the candidate effector MYCORRHIZA-INDUCED SMALL SECRETED PROTEIN of 8kDa. MiSSP8 transcript is accumulating at a higher level in symbiotic and fruiting body tissues compared to free-living mycelium. The predicted MiSSP8 protein sequence contains a novel repetitive motif. This novel motif is fungal specific and is mostly found in small proteins predicted as secreted from saprotrophic and ectomycorrhizal fungi, suggesting neofunctionalization of a saprotrophic protein into symbiotic function.

Introduction

Forest soils contain a wide diversity of microorganisms displaying multiple ways of life from saprotrophy to pathogen, through biotrophy (Buée et al, 2009; Uroz et al, 2010, Fierer et al, 2007). Tree-associated microorganisms are considered as key drivers for tree health, productivity, and ecosystem functioning (Berg et al., 2014, Frontiers in Microbiol; Berg et al., 2015). In particular, fungal communities are essential for (i) C and N cycling in forest ecosystem and (ii) C sequestration in soils (van der Heijden, 1998; Lindahl and Tunlid, 2015, Averill et al., 2014; Read & Perez-Moreno, 2003). Saprotrophic fungi secrete a large set of extracellular enzymes to efficiently degrade complex and diverse organic compounds such as lignocellulosic material found in organic matter (Eastwood et al, 2011; de Boer et al, 2005). Trees forming ectomycorrhiza (ECM) with soil fungi dominate northern forest ecosystems (Brundrett, 2009). These mutualistic interactions rely on bidirectional exchanges of nutrients and are crucial for nutrient cycling and C sequestration. The host tree provide to the fungus Cderived from its photosynthetate and in return ECM fungi deliver N, P and water to the roots. ECM fungi evolved several times during the Mycota evolution from saprotrophic ancestors. The polyphyletic evolution of the ECM lifestyle is marked by convergent losses of different components of the ancestral saprotrophic apparatus (i.e., cellulases and lignin peroxidases) (Kohler et al., 2015). However, some ECM fungi, such as Paxillus involutus, can actively decompose organic matter when linked to the host plant to scavenge N (Lindahl and Tunlid, 2015). This decomposition of organic matter by ECM fungi may also increase C availability to saprotrophic fungi nearby. Consequently, it is important to understand the mechanisms controlling the establishment of the interfaces between root of trees and the fungi. Despite these critical ecological roles, the nature of signals exchanged between the two partners that mediate the ECM symbiosis have remained mainly uncharacterized (Garcia et al., 2015). Hyphae from ECM fungi are able to respond to roots exudates and stimulate lateral root formation by the production of hormones (auxin, ethylene) (Felten et al., 2009; Spivallo et al., 2009; Krause et al., 2015) and volatile organic compounds (Ditengou et al, 2015). Lateral roots are first surrounded by fungal hyphae to form a fungal mantle. Fungal hyphae penetrate within the apoplast of cortical root cells and develop a highly branched network of fungal hyphae called the Hartig net, the site for nutrient exchanges. Host-derived C is used for fungal growth and to build up the fruiting body, a spore-releasing structure (Genre & Bonfante, 2012). The Hartig-Net formation leads to a massive fungal colonization within the apoplast of colonized roots, without eliciting strong and long lasting root defences. Consequently, it

clearly appears that these mutualistic interactions relies on the ability of ECM fungi to deal with the host immune system, composed of several levels of localized and systemic defence reactions (Okmen & Doehlemann, 2014 ; Spoel & Dong, 2012 ; Jones & Dangl, 2006; Asai & Shirasu, 2015). However, how the control of plant defense responses is achieved is not well understood, representing a critical knowledge gap.

Transcriptomic analysis of the genome of the ECM fungus L. bicolor identified a set of genes encoding for predicted small-secreted proteins, which expression is highly induced or specific to symbiotic tissues, named MiSSPs for Mycorrhiza-induced Small Secreted Proteins (Martin et al, 2008). Comparative transcriptomic analysis of ECM root tips of two different hosts Populus trichocarpa and Pseudotsuga menziesii colonized with L. bicolor highlight a set of MiSSPs expressed in both plants as well as host-specific MiSSPs (Plett et al, 2015). Recent analysis suggest that fungal MiSSPs are likely a common tool used by ECM Basidiomyceta to dialogue with their hosts (Kohler et al., 2015; Doré et al., 2015; Liao et al, 2015). As MiSSPs proteins share similar features with effectors of plant-pathogenic microbes, required to manipulate plant immune system, it is hypothesized that mutualistic symbionts use MiSSPs to subvert host immunity and manipulate its metabolism to promote symbiosis establishment and/or functioning (Plett & Martin, 2015). In a previous study, MiSSP7 from L. bicolor was described to be the first symbiosis effector (Plett et al., 2011). In the P.trichocarpa nuclei, MiSSP7 binds and stabilizes the co-receptor of jasmonic acid, the JAsmonate Zim domain 6 protein from P. trichocarpa (PtJAZ6) in presence of jasmonic acid (JA). This stabilization is leading to the repression of part of the JA-mediated signaling pathway (Plett et al, 2014). Interestingly, a similar strategy has also been reported for Secreted Protein 7 (SP7) from the endomycorrhizal symbiont Rhizophagus irregularis (formerly Glomus intraradices). This symbiont secretes the effector protein SP7 to target transcription factor MtERF19 from Medicago truncatula, leading to alteration of host-gene expression (Kloppholz et al, 2011). These studies have demonstrated that two mycorrhizal fungi use effector proteins to interfere with host-hormonal-signaling pathway. However, 50 MiSSP encoding genes have been previously identified in ECM roots tips between L. bicolor and P. trichocarpa (Martin et al., 2008) and require functionnal analysis. Moreover, very little is yet known about the evolutionary origin of these symbiotic effectors. Apparition of ECM symbiosis in different phyla of Eumycota is marked by a rapid gene innovation leading to novel symbiosis-induced orphan genes, likely through de novo gene formation and/or neofunctionalization of duplicated genes (Kohler et al., 2015). Although MiSSPs represent up to 38% of the orphan

and symbiosis-induced genes ECM root tips (Kohler et al., 2015), SSPs shared and specific to ECM way of life have been recently identified as well as other shared and specific to saprotrophic fungi (Pellegrin et al., 2015). This study also highlights that SSPs are not limited to biotrophic fungi as the genomes of saprotrophic fungi also code for numerous SSPs (Pellegrin et al., 2015).

In this study, we report the analysis of the MYCORRHIZA-INDUCED SMALL SECRETED PROTEIN of 8kDa (MiSSP8) protein. We show that RNAi-knockdown of *MiSSP8* strongly impairs the formation of ECM, demonstrating than MiSSP8 is a symbiotic molecular determinant. This SSP is highly expressed in both ECM and fruiting body, suggesting that MiSSP8 plays a role in the development of both symbiotic and non symbiotic tissues. MiSSP8 protein shares an unknown repetitive motif with a set of proteins, 90% of them being small (<300 amino acids) proteins predicted as secreted, from saprotrophic and ectomycorrhizal fungi. This suggests that MiSSP8 is linked to an ancient class of SSPs found in saprotrophic fungi.

Methods

Microorganisms and plant material

Saccharomyces cerevisiae strains YTK12 (Jacobs et al., 1997), MaV103 and MaV203 (Invitrogen) were propagated on YAPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, and 40 mg/L adenine) and cultured at 30°C. The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* strain S238N (Maire P. D. Orton) and RNAi-lines of *L bicolor* were maintained at 25°C on modified Pachlewski medium P5 + / -150 μ g/ml of hygromycine depending on the S238N strain or the RNAi-line tested (Paschlewski and Pachlewskia, 1974). *In vitro* mycorrhization experiments were performed with the hybrid *Populus tremula x Populus alba* (clone INRA 717-1-B4). Plants were micropropagated *in vitro* and grown on half MS medium (Murashige and Skoog, 1962) in glass culture tubes under a 16 h photoperiod at 24°C in a growth chamber.

Yeast secretion tests

Functional validation of the predicted signal peptide of MiSSPs was conducted with a yeast signal sequence trap assay (Plett et al., 2011). The pSUC2-GW gateway vector, which carries a truncated invertase, SUC2, lacking both its initiation methionine and signal peptide, was used. cDNA encoding the full lenght MiSSP8 was cloned into pSUC2-GW plasmids using BP

/ LR clonase (GATEWAY ©, Invitrogen). Yeast strain YTK12 was transformed with 200 ng of the plasmid using the lithium acetate method, (Gietz and Schiestl, 2007). All transformants were confirmed by PCR with vector-specific primers. Transformants were grown on yeast minimal medium with glucose (SD-W medium: 0.67% Yeast Nitrogen Base without amino acids, 0.075% tryptophan dropout supplement, 2% glucose and 2% agar). To assay for invertase secretion, overnight yeast cultures were diluted to an $OD_{600} = 1$ and 20µl of dilution were plated onto YPSA medium containing sucrose as a sole source of carbon (1% yeast extract, 2% peptone, 2% sucrose, and 1 µg/ mL antimycin A). The YTK12 strain transformed with the pSUC2-GW / SUC2SP vector encoding the invertase with signal peptide and untransformed YTK12 strain were positive and negative controls, respectively.

Genetic transformation of L. bicolor

Transformation of L. bicolor S238N was performed using the RNAi/Agrobacterium-mediated transformation (AMT) vector for intron hairpin RNA (ihpRNA) expression. Transformation of L. bicolor was constructed with the pHg/pSILBAy vector system (Kemppainen and Pardo, 2010) and by using the full-length cDNA sequence of the target gene MiSSP8 (JGI protein ID 298667). The plasmid cloning steps were carried out in E. coli strain TOP10 (Invitrogen) applying standard molecular methodologies. All the PCR amplification reactions were done with a proof-reading Taq DNA polymerase (Fermentas Life Sciences). The PCR amplicons were cloned by restriction in two steps into the pSILBAy intronic sequence to form an intron spacer-separated inverted sequence repeat. This ihpRNA expression cassette, transcribed from the Agaricus bisporus gpdII-promoter, was further cloned as a full pSILBAy plasmid into the SacI site present in the T-DNA of pHg. The binary vector pHg carries the hygromycin B resistance cassette and joining of the two plasmids created the RNAi/AMT vector pHg/pSyMiSSP8. The pHg/pSyMiSSP8 were used for transforming L. bicolor dikaryotic strain S238N with Agrobacterium tumefaciens strain AGL1 (Kemppainen and Pardo, 2010). The transformed fungal strains were selected with 300 g/ml hygromycin B (Invitrogen) and were later maintained under 150 g/ml hygromycin B selection pressure on modified P5 medium. Five randomly selected pHg/pSyMiSSP8, pHg/pSyMiSSP17 and pHg/pSyMiSSP22 L. bicolor transformant strains were used for further molecular and physiological analyses.

Molecular analyses of Laccaria bicolor transformants.

Plasmid rescue of the right border (RB) - linked gDNA was carried out with BamHI cut and self-ligated *Laccaria* gDNA according to Kemppainen et al., 2008. Sequencing of the rescued

plasmids was done using M13/pUC-reverse primer(-26)17mer. Left border (LB) TAIL-PCR was done according to Kemppainen et al., 2009, using T-DNA specific nested primers LB1-3 (Mullins et al., 2001) and arbitrary primer AD2 (Liu et al., 1995). L3/AD2 amplified TAIL-PCR products were TA-subcloned into pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen) and sequenced with L3 primer. Inverse PCR was done according to Kemppainen et al., 2009, using primers gpdRC (Chen et al., 2000) and L1 (Mullins et al., 2001). Specific PCR amplicon was subcloned into pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen) and sequenced with L1 primer.

All the PCR reactions were carried out using T-personal thermocycler (Biometra ®) and PCR chemicals from Fermentas. Sequencing reaction were purchased from Macrogen Sequencing Service, Soul.

In vitro mycorrhization experiments

For *in vitro* mycorrhization tests between *P. tremula x P. alba* and *L. bicolor*, we used an existing sandwich co-culture system described in Felten et al. (2009). Briefly, poplar explants were synchronized for rooting for one week on MS containing 2mg/L IBA and then cultured another three weeks in the absence of IBA on cellophane on MS. Rooted plants were arranged together with 10 days old *L. bicolor* mycelium pre-grown on cellophane-covered, sugar reduced Pachlewski medium. The contact was realized on sugar reduced Pachlewski medium supplemented with 1g/L MES sodium salt and 1.2% (w/v) agar, pH 5.8. Membranes harbouring the fungus were laid upside down on roots, enabling roots colonization and ECM formation. The bottom part of the plate was covered with a black plastic bag to reduce illumination and plates were maintained vertically at 24°C and under a 16h photoperiod in a growth-chamber. After 4 weeks of incubation, the percentage of mycorrhization is estimated as the number of fungal colonized lateral root tips over the total number of lateral roots. At least 10-20 biological replicates were analysed for the wild-type *L. bicolor* strain S238N and five independent *L. bicolor missp8* RNAi lines. Two independent empty vector transformants *L. bicolor* lines (pSYL7 and pSYL9) were also tested for their ability to colonize roots.

To analyze transcriptomic profiling during the time course of mycorrhization, tissues were taken from in vitro root systems of *P. tremula x alba* after 2, 7, 12 and 20 days post contact with *L. bicolor*. *L. bicolor* free living mycelium grown on the same medium and *L. bicolor* mycelium grown on the same plate but not in direct contact with roots were used, repectively, as the control tissue and the extramatricial mycelium. Three biological replicates of between 50-100 mg of tissues harvested as described above were used for RNA extraction for each

timepoint. Total RNA extraction was performed using the RNAeasy kit (Qiagen) as per the manufacturer's instructions with the addition of 25 mg polyethylene glycol 8000/mL RLC buffer to the extraction solution. An on-column DNA digestion step with DNAse I (Qiagen) was also included to avoid DNA contamination. RNA quality was verified by Experion HighSens capillary gels (Bio-Rad).

RNA extraction, cDNA synthesis and qPCR

Frozen 100 mg samples were ground in liquid nitrogen using mortar and pestle. Total RNA was extracted using RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) with a slightly modified protocol, adding 2% PEG8000 to the RLC extraction buffer and including a DNase treatment on column. RNA integrity and absence of gDNA was confirmed by Experion (BioRad) analysis according to the manufacturer's instructions. RNA samples were diluted in water to a concentration of 200ng/µl, afterwards exact concentration of the sample was spectrophotometrically determined. cDNA was synthesized from 1.1 µg of total RNA using High Capacity cDNA RT Kit (Applied Biosystems, Life technologies) according to manufacturer's instructions.

PCR primers with a melt temperature of $60 + /-1^{\circ}$ C and if possible overspanning exon-exon boundary, were designed to amplify 100-200 bp fragments of five reference genes (protID 611151, 313997, 446085, 246915 and 319764). Primer sequences for an additional reference gene (prot ID 293350, elongation factor) and *MiSSP8* were described previously by (Plett et al, 2014). Primer efficiencies were calculated for each pair, on a standard curve that was generated through a fourfold dilution series of a pooled sample over at least 5 dilution points. Resulting efficiencies were all within 85 – 115% range.

Real-time qPCR was performed in an optical 96 well plate with a StepOne sequence detection system (Applied Biosystems, life technologies) and fast cycling conditions (20s at 95°C, 40 cycles of 3s at 95°C and 30s at 60°C). Each 10 μ l reaction contained 2X Fast SYBR green Master Mix (Applied Biosystems, life technologies), 300 nM gene-specific forward and reverse primer, water and 11 ng cDNA. No template controls containing additional water instead of cDNA were included in the experiment. A melting curve was generated to assure specificity of amplification. Data were expressed relatively to the sample with the highest expression level (2 –(Ct-Ctmin)) and normalized against six reference genes. Stability of the reference genes was confirmed by geNorm analysis (Vandesompele et al., 2002). The normalisation factor NF for each sample was calculated as the geometric mean of the relative expression level of the six reference genes. Consequently, the expression level of MiSSP8 for

an individual sample was obtained by the formula 2 –(Ct-Ctmin)/NF according to Vandesompele et al. 2002. Finally, data were rescaled to the FLM ("control" condition) resulting in an expression of one for the FLM at each time point.

Motif analysis

For identification of similar proteins sharing motif DWRR found in MiSSP8 sequence, we designed the following regular expression [DSNPGY]-W-[KR]-R-x(4,20) and used PS-Scan software (v1.79) to scan 354 fungal proteomes available on the Mycocosm website (http://jgi.doe.gov/data-and-tools/mycocosm/), 2774 bacterial genomes available at the NCBI website (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) and 10 different plant or algae genomes available on the Phytozome website (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html). Protein sequences retrieved have been then scanned by GLAM2 (Gapped Local Alignments Motifs) software v 4.11.0 (Frith et al, 2008) with default parameters in order to assess conservation of the DWRR motif. The same sequences have been then randomized and scanned again with GLAM2 in order to control that the motif does not appear randomly.

Results

MiSSP8 is strongly expressed in ECM root tips and fruiting body

The *MiSSP8* gene was initially identified by oligoarray-based transcript profiling as the third highly induced *L.bicolor* gene in mature ECM root tips of *P. trichocarpa / L. bicolor* and *Pseudotsuga menziesii / L. bicolor* compared to free-living mycelium (Martin et al. 2008). In order to confirm this up-regulation, we assessed *MiSSP8* transcript levels by RT-qPCR in ECM root tips sampled during the *in vitro* interaction between *P. tremula* x *P. alba. / L. bicolor*. The level of *MiSSP8* transcripts was up-regulated from day 7 to day 15 post-contact compared to free-living mycelium (**Figure 1A**). Interestingly, increased *MiSSP8* expression was specific to the mycelium not in direct contact with roots, did not increased during the ECM timecourse (**Figure 1A**). We also investigated *MiSSP8* expression during fruiting body development, as the hyphal aggregates forming the ECM mantle is reminiscent of the hyphal aggregates forming the fruiting body maturation (**Figure 1B**). However, expression of MiSSP8 in fruiting body was significantly higher than its expression in ECM

roots tips or FLM, with a mean expression of 298,3 and 102,7 RPKM for cap and stipe respectively (Figure 1B).

MiSSP8 protein is a non-structured protein containing a signal peptide functional in yeast

The predicted MiSSP8 sequence contains a signal peptide at its N-terminus as predicted by SignalP v4.1. In order to confirm the predicted signal peptide is functional and properly recognized by eukaryotic cells, we fused the full-length sequence of MiSSP8 (i.e, including its signal peptide) to the yeast SUC2 invertase. Fusion of a functional signal peptide to SUC2 invertase enables the secretion of the invertase in the growth medium, the hydrolysis of sucrose and thus allowed the growth of a $\Delta Suc2$ yeast strain on medium containing sucrose as the sole carbon source. We used untransformed $\Delta Suc2$ yeast strain and $\Delta Suc2$ yeast strain transformed with the invertase fused to its own signal peptide as negative and positive control, respectively. The $\Delta Suc2$ yeast strain expressing SUC2 fused to full length (i.e. containing its signal peptide) was able to grow as the positive control, whereas the $\Delta Suc2$ yeast strain expressing the invertase fused to mature MiSSP8 (i.e. without its signal peptide) is not. This demonstrates MiSSP8 signal peptide is properly recognized and processed in the unicellular eukaryotic cell *Saccharomyces cerevisae* (Figure 1C), suggesting *L. bicolor* can secrete MiSSP8 into the apoplastic space during root colonization.

Prediction of the secondary structure of the mature form of MiSSP8 using PSIPRED software shows a putative alpha-helix between amino-acid 19 and 27 (Supplementary File 1). To confirm this structure, we produced the mature form of MiSSP8 in *Escherichia coli*. However, no secondary structure was identified using circular dichroism spectroscopy (**Figure 1D**).



performed on *Populus trichocarpa* ECM root tips, extraradical mycelium (ExM) and free-living mycelium (FLM) shows MiSSP8 encoding genes is up-regulated specifically in *in vitro* ECM root tips. (B) RNA-Seq analysis of *Laccaria bicolor* fruiting body, divided in cap and stipe, at three different stages (early, medium and late). Expression level in ECM root tips and FLM are also reported as reference. (C) Yeast signal trap assay shows signal peptide predicted in MiSSP8 protein sequence is functional in eukaryotic cell. (D) Circular dichroism spectra show recombinant MiSSP8 does not have any secondary structure.

RNAi-mediated knockdown of MiSSP8 impairs mycorrhization formation and development.

As MiSSP8 is induced during ECM development, we assessed whether MiSSP8 is essential for mycorrhization. Since homologous gene replacement is not available in L. bicolor (Kemppainen et al., 2009), we used gene silencing through RNAi. RNAi hairpin targeting MiSSP8 transcripts were introduced in L. bicolor through A. tumefaciens mediated transformation. The ability of four independent transgenic lines (Supplementary Table S1) to form ectomycorrhiza was tested in vitro on 717-1B4 poplar roots. Efficiency of RNA silencing was checked on the few ectomycorrizal tips formed with the respective mutants using real time quantitative PCR analysis. All tested mutants display a strong decrease of expression of their respective target gene: from a decrease of 80% in missp8-14 to 99% for missp8-03 (Figure 2A). The wild-type strain S238N of L. bicolor, together with L. bicolor strains carrying the empty transformation vector (ev7 and ev9) were able to colonize poplar roots tips and to form ECM with nearly 40-45% of the root tips, whereas this percentage dropped to 3-12% with the *missp8* silenced strains (Figure 2B). Microscopic analysis of transversal sections of 2 weeks-old ECM formed between P. tremula x P. alba and L. bicolor ev7 strain displayed a dense fungal mantle and Hartig net, two hallmarks of active ECM. Internal mantle was composed of highly structured fungal hyphae (Figure 2C). By contrast, missp8-RNAi lines displayed a loose mantle, if any. Altogether, these data suggest that MiSSP8 is required for the development of the mycorrhizal inner mantle.



MiSSP8 contains an unknown repetitive motif shared with small secreted proteins from saprotrophic fungi

To determine whether *MiSSP8* is a conserved candidate effector, we searched for MiSSP8 orthologs in the genomes of 13 *L. bicolor* strains sequenced by the JGI (Martin et al., unpublished results) and *Laccaria amethystina* (Kohler et al, 2015). These strains correspond to sib-monokaryons of the *L. bicolor* S238N progeny (e.g., S238N-H70)(Di Battista et al., 1996; Selosse et al., 1996) and geographic isolates of *L. bicolor* collected in Europe or North America. Multiple alignments of the predicted MiSSP8 sequences revealed a highly conserved protein with only 4 amino acids over 70 displaying polymorphism (**Table 1**, **Supplementary Figure S2**), suggesting a very low level of SNP (<1) and ratio of non-synonymous to synonymous substitutions (dN/dS) <1, reflecting a purifying selection.

At its C-terminus, the MiSSP8 sequence contains four repetitions of the DWRR (Asn, Trp, Arg, Arg) motif interspaced by two amino-acids (Figure 3A). This repetitive motif is novel, with no match in the PROSITE and PFAM databases. The L. amethystina orthologous gene contained 6 repetitions of the DWRR motif and proteins of L. bicolor, called MiSSP8-like proteins, also contain the DWRR motif, but interspersed by more than two residues as found in MiSSP8 (Table 1). We then queried the MycoCosm database containing all the fungal genomes available, the NCBI database containing all the bacterial genomes available, the JGI Phytozome database (11 different plant genomes) using pattern search instead of strict homology. A total of 86 proteins have been identified containing the DWRR or DWRRrelated motives (Table 1). By doing a multiple sequence alignment with the GLAM2 software of the 86 DWRR-containing proteins, a new motif was identified, confirming this novel motif is shared among the 86 SSPs identified (Figure 3B). They have been detected only in Fungi, indicating that this motif is Eumycota specific. 90.7% of the proteins (78/86) found contain less than 300 amino acids (median size of 137 AA), ranging from 68 amino-acids to 286 amino-acids (Figure 3C). 76 proteins over 86 (88.4%) are predicted as secreted according to SignalP v4.1 (Table 1) and number of repetitions varies from four repetitions to sixteen repetitions (Figure 3C). The 86 DWRR-containing proteins belong to 43 different fungi displaying different lifestyles, but with 34 of them being saprotrophic (Table 1). Eight DWRR-containing SSPs belong to other ECM fungi, namely Hebeloma cylindrosporum, L. amethystina, Cortinarius glaucopus and Paxillus ammoniavirescens (Table 1), and one DWRR-containing SSP belongs to Armillaria mellea, a root pathogen. No protein domains are detected in PFAM or PROSITE databases, except for



detected among small proteins predicted as secreted by saprotrophic fungi . (A) MiSSP8 Protein sequence is composed of a signal-peptide, a first region with no annotation and a repetitive motif. (B) Conserved motif inferred from analysis of the 86 protein sequences containing the motif using GLAM2 software. (C) Size (in amino-acids) and number of repetitions found in proteins carrying the DWRR or DWRR-like motif.

three proteins from the white-rot fungus *Schizophyllum commune* having a peptidase A01 domain in their N-terminal region. RNA-Seq analysis performed on ECM root tips from *Pinus pinaster* colonized by *Hebeloma cylindrosporum* show two DWRR-containing SSPs are up-regulated in ECM (**Supplementary Table S2**).

Discussion

MiSSP8 is required for ECM symbiosis establishment

The genome of *L. bicolor* contains a large set of MiSSPs (Martin et al., 2008). Several of these secreted proteins are known to be part of a 'core' gene regulon up-regulated during the development of both *L. bicolor/P. trichocarpa* and *L. bicolor/Pseudotsuga menziesii* ECMs (Plett et al, 2015). The up-regulated gene *MiSSP8* belong to this core gene regulon, suggesting that *MiSSP8* may act as a general genetic determinant required for symbiosis. The striking decrease in the rate of mycorrhiza formation of *L. bicolor missp8* RNAi lines, compared to wild-type strain or empty-vector controls, indicates that *MiSSP8* is a key symbiosis-related gene and suggests that MiSSP8 plays an important role in the ECM development. We showed that the signal peptide of the predicted MiSSP8 is processed in yeast cells, suggesting that MiSSP8 is secreted during ECM. However, it remains unknown whether MiSSP8 is secreted in the mycorrhizal mantle, the apoplastic space of the symbiotic interface or addressed to the root cells.

High level of expression of *MiSSP8* in ECM and fruiting body suggest its involvement in both symbiotic and non-symbiotic processes

The accumulation of MiSSP8 transcripts day-7 to day 15 post-contact with *Populus* roots indicates that MiSSP8 protein is required for mantle and Hartig net formation. Microscopic analysis of the few ectomycorrhiza formed between *L. bicolor missp8*-RNAi lines and *P. tremula* x *P. alba* support this hypothesis as these ECM displayed no Hartig net and only the formation of a lose mantle. In addition, MiSSP8 is highly expressed in young fruiting bodies, composed of aggregation of fungal hyphae. This dual expression profile suggests an involvement of MiSSP8 protein in both symbiotic and non-symbiotic processes. We can hypothesize that MiSSP8 is likely required for fungal hyphae aggregation and/ or organization. In plant pathogenic microbes, several effectors have been shown to fullfill a double role (Zhang et al, 2015; Alfano & Colmer, 2004). Unlike pathogenic microorganisms, *L. bicolor* has a presymbiotic stage during which it likely prospects soil and decomposes soil

organic matter for its host (Lindahl & Tunlid, 2015). Moreover, saprotrophic fungi contain hundreds of small proteins predicted as secreted, some of them being shared with ECM fungi (Pellegrin et al., 2015). In addition, proteomic analysis of the secretome of free-living mycelium of the ECM symbiont *Hebeloma cylindrosporum* revealed that 28 % of the predicted SSPs are secreted (Doré et al, 2015). These studies suggest that mutualistic symbionts might use SSPs to fulfill functions related to both symbiotic and non-symbiotic processes. The SSPs may actively participate to the free-living lifestyle by modulating cooperation and competition in local microbiomes (Rovenic et al., 2014).

MiSSP8 contains a novel fungal-specific motif found in several proteins from saprotrophic fungi

Characterization of the repeated DWRR motif in MiSSP8 and several other fungal proteins identified a new family of proteins sharing this common motif. This DWRR motif appears to be specific to Fungi as it was not detected in bacterial and plant proteomes. Other fungalspecific protein domains putatively involved in plant-fungal interactions have been identified. For example, the CFEM (Common in several Fungal Extracellular Membrane proteins) domain contains eight cysteine residues (Zhang et al. 2015; Kulkarni et al., 2013). CFEMcontaining proteins were originally reported as proteins involved in cell wall/membrane stability (Vaknin et al, 2014). However, CFEM proteins were also demonstrated to be involved in various other functions such as pathogenicity (De Zwaan et al; 1999; Kulkarni et al., 2003), biofilm formation (Pérez et al, 2006) and iron homeostasis (Srivastava et al, 2014). Zhang et al. proposed that sequence divergence facilitate the apparition of new function and that tandem duplication may be responsible for expansion of the CFEM domains in pathogenic fungi. In addition, genes coding for hydrophobins, another class of SSP, from Paxillus involutus evolved according to the birth-and-death model, i.e. some copies of duplicated genes are maintained and subfunctionalization and/or neofunctionalization may occur, whereas other duplicates are inactivated by mutations (Rajasheka et al, 2007). MiSSP8-like proteins identified in the present study exhibit the DWRR motif at their Ctermini. These proteins did not display similarities are their N-termini suggesting these proteins might have be involved in different function such as reported for CFEM proteins (Zhang et al, 2015) or RGD proteins (D'Souza et al, 1991). We showed that MiSSP8-like proteins containing four DWRR repetitions are restricted to Agaricales and Boletales, whereas other MiSSP8-like proteins are detected throughout the Eumycota phylla. MiSSP8-like proteins are not restricted to ECM fungi and were detected in saprotrophic fungi, including

wood decayers. This is consistent with our previous study showing that several clusters of SSPs are shared between saprotrophic and ECM fungi (Pellegrin et al, 2015). This set of candidate effectors do not belong to the set of symbiotic genes having a rapid turn-over (Kohler et al., 2015).

In summary, we showed that the gene *MiSSP8* from the ectomycorrhizal fungus *L. bicolor* is highly upregulated in ECM and fruiting body and its expression is required for ECM development, The predicted protein is likely secreted in the extracellular space and contains the novel fungal-specific (DWRR)n domain. The (DWRR)n domain is shared by both ectomycorrhizal and saprotrophic fungi. Biochemical analyses of MiSSP8 are currently underway to characterize the role of MiSSP8 in *L. bicolor* development.

Acknowledgments

This material is based on work conducted by the US Department of Energy Joint Genome Institute, a DOE Office of Science User Facility, supported under contract no. DE-AC02-05CH11231. This work was supported a grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the "Investissements d'Avenir" program through (ANR–11–LBX– 002–01 Lab of Excellence ARBRE), the Plant-Microbe Interactions Project, Genomic Science Program, of the U.S. Department of Energy, Office of Science, Biological, and Environmental Research (grant no. DE–AC05–000R22725), the Institut National de la Recherche Agronomique, the Région de Lorraine, and the European Fund for Regional Development (funding for the Functional Genomics Facilities at Institut National de la Recherche Agronomique-Nancy), the Université de Lorraine (Ph.D. scholarship to CP). We thank Dr. Igor Grigoriev (JGI) and the Mycorrhizal Genomics Initiative consortium principal investigators for access to the genome sequences before publication.

Figure 1: MiSSP8 is highly expressed in ECM root tips and fruiting body.

Figure 2: Impairment of ectomycorrhizal symbiosis by knockdown of MiSSP8 encoding gene

Figure 3: Conservation of MiSSP8 repetitive motif among proteins from saprotrophic fungi **Table 1:** Proteins containing DWRR/DWRR-like motif

Supplementary File 1: Secondary structure prediction by PSIPRED software

Supplementary File 2: Multiple alignments of the predicted MiSSP8 sequences from the Laccaria PanGenome

Supplementary Table S1: Molecular characterization of the *Laccaria bicolor missp8* RNAi mutants used in this study.

Supplementary Table S2: RNA-Seq analysis available on DWRR-containing SSPs from ECM fungi.

References

- Alfano, J. R., and Collmer, A. 2004. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. Annual Review of Phytopathology. 42:385–414
- Asai, S., and Shirasu, K. 2015. Plant cells under siege: plant immune system versus pathogen effectors. Current Opinion in Plant Biology. 28:1–8
- Averill, C., Turner, B. L., and Finzi, A. C. 2014. Mycorrhiza-mediated competition between plants and decomposers drives soil carbon storage. Nature. 505:543–545
- Boer, W. de, Folman, L. B., Summerbell, R. C., and Boddy, L. 2005. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. FEMS Microbiology Reviews. 29:795– 811
- Brundrett, M. C. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. Plant and Soil. 320:37–77
- Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R. H., Uroz, S., and Martin, F. 2009. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. New Phytologist. 184:449–456
- Burgess, T., Dell, B., and Malajczuk, N. 1996. In vitro synthesis of Pisolithus-Eucalyptus ectomycorrhizae: synchronization of lateral tip emergence and ectomycorrhizal development. Mycorrhiza. 6:189–196
- Chilvers, G. A., Douglass, P. A., and Lapeyrie, F. F. 1986. A paper-sandwich technique for rapid synthesis of ectomycorrhizas. New Phytologist. 103:397–402
- Deveau, A., Palin, B., Delaruelle, C., Peter, M., Kohler, A., Pierrat, J. C., Sarniguet, A., Garbaye, J., Martin, F., and Frey-Klett, P. 2007. The mycorrhiza helper Pseudomonas fluorescens
 BBc6R8 has a specific priming effect on the growth, morphology and gene expression of the ectomycorrhizal fungus Laccaria bicolor S238N. New Phytologist. 175:743–755
- Ditengou, F. A., Müller, A., Rosenkranz, M., Felten, J., Lasok, H., van Doorn, M. M., Legué, V., Palme, K., Schnitzler, J.-P., and Polle, A. 2015. Volatile signaling by sesquiterpenes from ectomycorrhizal fungi reprogrammes root architecture. Nature Communications. 6:6279
- Doré, J., Perraud, M., Dieryckx, C., Kohler, A., Morin, E., Henrissat, B., Lindquist, E., Zimmermann, S. D., Girard, V., Kuo, A., Grigoriev, I. V., Martin, F., Marmeisse, R., and Gay, G. 2015. Comparative genomics, proteomics and transcriptomics give new insight into the exoproteome of the basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum* and its involvement in ectomycorrhizal symbiosis. New Phytologist. 208:1169–1187
- Eastwood, D. C., Floudas, D., Binder, M., Majcherczyk, A., Schneider, P., Aerts, A., Asiegbu, F. O., Baker, S. E., Barry, K., Bendiksby, M., Blumentritt, M., Coutinho, P. M., Cullen, D., de Vries, R. P., Gathman, A., Goodell, B., Henrissat, B., Ihrmark, K., Kauserud, H., Kohler, A., LaButti, K., Lapidus, A., Lavin, J. L., Lee, Y.-H., Lindquist, E., Lilly, W., Lucas, S., Morin, E., Murat, C., Oguiza, J. A., Park, J., Pisabarro, A. G., Riley, R., Rosling, A., Salamov, A., Schmidt, O., Schmutz, J., Skrede, I., Stenlid, J., Wiebenga, A., Xie, X., Kues, U., Hibbett, D. S., Hoffmeister, D., Hogberg, N., Martin, F., Grigoriev, I. V., and Watkinson, S. C. 2011. The Plant Cell Wall-Decomposing Machinery Underlies the Functional Diversity of Forest Fungi. Science. 333:762–765

- Fierer, N., Breitbart, M., Nulton, J., Salamon, P., Lozupone, C., Jones, R., Robeson, M., Edwards, R. A., Felts, B., Rayhawk, S., Knight, R., Rohwer, F., and Jackson, R. B. 2007. Metagenomic and Small-Subunit rRNA Analyses Reveal the Genetic Diversity of Bacteria, Archaea, Fungi, and Viruses in Soil. Applied and Environmental Microbiology. 73:7059–7066
- Genre, A., and Bonfante, P. 2012. The Interface Between Plants and Mycorrhizal Fungi: Nutrient Exchange, Signaling and Cell Organization. Pages 39–49 in: Fungal Associations, B. Hock, ed. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Gietz, R. D., and Schiestl, R. H. 2007. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. Nature Protocols. 2:31–34
- Heijden, M. G. A. van der, Klironomos, J. N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A., and Sanders, I. R. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. Nature. 396:69–72
- Jacobs, K. A., Collins-Racie, L. A., Colbert, M., Duckett, M., Golden-Fleet, M., Kelleher, K., Kriz, R., LaVallie, E. R., Merberg, D., Spaulding, V., Stover, J., Williamson, M. J., and McCoy, J. M. 1997. A genetic selection for isolating cDNAs encoding secreted proteins. Gene. 198:289–296
- Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. Nature. 444:323-329
- Kemppainen, M. J., and Pardo, A. G. 2010. pHg/pSILBAγ vector system for efficient gene silencing in homobasidiomycetes: optimization of ihpRNA - triggering in the mycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. Microbial Biotechnology. 3:178–200
- Kohler, A., Kuo, A., Nagy, L. G., Morin, E., Barry, K. W., Buscot, F., Canbäck, B., Choi, C., Cichocki, N., Clum, A., Colpaert, J., Copeland, A., Costa, M. D., Doré, J., Floudas, D., Gay, G., Girlanda, M., Henrissat, B., Herrmann, S., Hess, J., Högberg, N., Johansson, T., Khouja, H.-R., LaButti, K., Lahrmann, U., Levasseur, A., Lindquist, E. A., Lipzen, A., Marmeisse, R., Martino, E., Murat, C., Ngan, C. Y., Nehls, U., Plett, J. M., Pringle, A., Ohm, R. A., Perotto, S., Peter, M., Riley, R., Rineau, F., Ruytinx, J., Salamov, A., Shah, F., Sun, H., Tarkka, M., Tritt, A., Veneault-Fourrey, C., Zuccaro, A., Tunlid, A., Grigoriev, I. V., Hibbett, D. S., and Martin, F. 2015. Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. Nature Genetics. 47:410–415
- Kulkarni R, Kelkar H, Dean R. 2003. An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. Trends in biochemical sciences 28: 118–121.
- Lindahl, B. D., and Tunlid, A. 2015. Ectomycorrhizal fungi potential organic matter decomposers, yet not saprotrophs. New Phytologist. 205:1443–1447
- Martin C. Frith, Neil F. W. Saunders, Bostjan Kobe, Timothy L. Bailey, "Discovering sequence motifs with arbitrary insertions and deletions", PLoS Computational Biology, 4(5):e1000071, 2008
- Martin, F., Aerts, A., Ahrén, D., Brun, A., Danchin, E. G. J., Duchaussoy, F., Gibon, J., Kohler, A., Lindquist, E., Pereda, V., Salamov, A., Shapiro, H. J., Wuyts, J., Blaudez, D., Buée, M., Brokstein, P., Canbäck, B., Cohen, D., Courty, P. E., Coutinho, P. M., Delaruelle, C., Detter, J. C., Deveau, A., DiFazio, S., Duplessis, S., Fraissinet-Tachet, L., Lucic, E., Frey-Klett, P., Fourrey, C., Feussner, I., Gay, G., Grimwood, J., Hoegger, P. J., Jain, P., Kilaru, S., Labbé, J., Lin, Y. C., Legué, V., Le Tacon, F., Marmeisse, R., Melayah, D., Montanini, B., Muratet, M., Nehls, U., Niculita-Hirzel, H., Secq, M. P. O.-L., Peter, M., Quesneville, H., Rajashekar, B., Reich, M., Rouhier, N., Schmutz, J., Yin, T., Chalot, M., Henrissat, B., Kües, U., Lucas, S.,
Van de Peer, Y., Podila, G. K., Polle, A., Pukkila, P. J., Richardson, P. M., Rouzé, P., Sanders, I. R., Stajich, J. E., Tunlid, A., Tuskan, G., and Grigoriev, I. V. 2008. The genome of Laccaria bicolor provides insights into mycorrhizal symbiosis. Nature. 452:88–92

- Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum. 15:473–497
- Pachlewski, R., and Pachlewska, J. 1974. Studies on Symbiotic Properties of Mycorrhizal Fungi of Pine (Pinus Silvestris L.) with the Aid of the Method of Myccorrhizal Synthesis in Pure Cultures on Agar. Forest Research Institute.
- Pellegrin, C., Morin, E., Martin, F. M., and Veneault-Fourrey, C. 2015. Comparative Analysis of Secretomes from Ectomycorrhizal Fungi with an Emphasis on Small-Secreted Proteins. Frontiers in Microbiology. 6
- Petre, B., Saunders, D. G. O., Sklenar, J., Lorrain, C., Win, J., Duplessis, S., and Kamoun, S. 2015. Candidate Effector Proteins of the Rust Pathogen *Melampsora larici-populina* Target Diverse Plant Cell Compartments. Molecular Plant-Microbe Interactions. 28:689–700
- Plett, J. M., Daguerre, Y., Wittulsky, S., Vayssieres, A., Deveau, A., Melton, S. J., Kohler, A., Morrell-Falvey, J. L., Brun, A., Veneault-Fourrey, C., and Martin, F. 2014. Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus Laccaria bicolor stabilizes the Populus JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. Proceedings of the National Academy of Sciences. 111:8299–8304
- Plettb, J. M., Kemppainen, M., Kale, S. D., Kohler, A., Legué, V., Brun, A., Tyler, B. M., Pardo, A. G., and Martin, F. 2011. A Secreted Effector Protein of Laccaria bicolor Is Required for Symbiosis Development. Current Biology. 21:1197–1203
- Plett, J. M., and Martin, F. 2015. Reconsidering mutualistic plant–fungal interactions through the lens of effector biology. Current Opinion in Plant Biology. 26:45–50
- Plett, J. M., Tisserant, E., Brun, A., Morin, E., Grigoriev, I. V., Kuo, A., Martin, F., and Kohler, A. 2015. The Mutualist Laccaria bicolor Expresses a Core Gene Regulon During the Colonization of Diverse Host Plants and a Variable Regulon to Counteract Host-Specific Defenses. Molecular Plant-Microbe Interactions. 28:261–273
- Rambaut A (2009) FigTree v1.4: Tree Figure Drawing Tool. Available from: http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/.
- Read, D. J., and Perez-Moreno, J. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems a journey towards relevance? New Phytologist. 157:475–492
- Srivastava VK, Suneetha KJ, Kaur R. 2014. A systematic analysis reveals an essential role for high-affinity iron uptake system, haemolysin and CFEM domain-containing protein in iron homoeostasis and virulence in Candida glabrata. Biochemical Journal 463: 103–114.
- Uroz, S., Buée, M., Murat, C., Frey-Klett, P., and Martin, F. 2010. Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. Environmental Microbiology Reports. 2:281–288
- Zhang Z-N, Wu Q-Y, Zhang G-Z, Zhu Y-Y, Murphy RW, Liu Z, Zou C-G. 2015. Systematic analyses reveal uniqueness and origin of the CFEM domain in fungi. Scientific Reports 5: 13032.

Conf:	3 0 00;						
Pred:		>		-0			
Pred: AA:	CCCI	EECCCCCC	CCCCC	CCHHHHH GDVEARH	IHHHHC IAADWR	CCCCC	CCCCCCC RRDSDWR
		10		20		30	40
Conf:	3 000						
Pred:							
Pred: AA:	CCC(RD <i>S</i> I	CCCCCCC CWRRDSD 50					
Leger	ndı						
		helix	Conf:	3	[nfiden	ce of prediction
	> -	strand	Pred:	predict	ed seco	ondary	structure
		coil	AA: t	arget se	quence		

Supplementary File 1: Secondary structure prediction by PSIPRED software v3.3. *In silico* analysis of secondary structure performed on the predicted MiSSP8 sequence with the PSIPRED software identify an alpha-helix from amino acid 19 to 27.



Supplementary File 2: Multiple alignments of the predicted MiSSP8 sequences from the Laccaria PanGenome. Multiple alignments of the MiSSP8 orthologs using MAFFT v7.187 shows only four amino-acids polymorphism (black arrow) over 70.

Fungal	Number of T-	T-DNA integration	T-DNA integration information
strains	DNA integration	site (on L. bicolor	
	and method used	genome v1)	
	to identify		
	integration site		
MiSSP8	1 LB TAIL-PCR	LG 6:3490282	Intronic integration within a gene model
RNAi			which encoding a predicted protein of
strain 3			unknown function (ID 3302639).
MiSSP8	1 LB TAIL-PCR	LG 4:3835819	Intergenic integration.
RNAi		_	
strain. 4			
MiSSP8	1 Plasmid rescue	LG 10:3683186	Closest gene model upstream of the
RNAi		_	integration site: 566 bp from the start
strain. 14			codon of a predicted protein of
			unknown function (ID 333201)
			Closest gene model downstream of the
			integration site: 873 bp from the start
			codon of a predicted protein of
			unknown function (ID 608644).
MiSSP8	1 Plasmid rescue	LG_10:2948908.	Closest gene model upstream of the
RNAi			integration site: 745 bp from the stop
strain. 24			codon of a predicted dehydrogenase
			protein (ID 449638).
			Closest gene model downstream of the
			integration site: 955 bp from the stop
			codon of a predicted protein of
			unknown function (ID 607195).
WT	0	N/A	N:A
(S238N)			
Empty	2	LG_9:25096	Closest gene model upstream of the
vector 7			integration site: 158 bp from the Start
			codon of a predicted BTB/POZ protein
			binding domain protein (ID 318650)
			Closest gene model downstream of the
			integration site: 127bp from the Start
			codon of a predicted ORF of unknown
			protein (ID 31851)
Empty	1	LG_12:819590	Integration within a glycoside hydrolase
vector 9			family 38 encoding genes (ID 184867)

Supplementary Table S1: Molecular characterization of the Laccaria bicolor missp8 RNAi mutants used in this study

	Protein ID	Fold Change ^a	FLM ^b	ECM ^b	Size ^c
	440029	2,117611844	636,5057869	1347,872193	85
Hebeloma auliu du aan auruu	448789	-10,18446404	17,69469231	1,737420079	156
cyunarosporum	443466	5,349736826	108,4458251	580,1566242	179
T · 1 · 1	334723	4,71	0,1	0,471	115
Laccaria dicolor	388224 (MiSSP8)	66,235	0,6	39,741	70

Supplementary Table S2: RNA-Seq data available on DWRR-containing SSPs from ECM fungi. RNA-Seq analysis performed on ECM root tips of *H. cylindrosporum / P. pinaster* or *L. bicolor / P. trichocarpa* show contrasting expression level between FLM and ECM.

^a : Experiment fold change is calculated by dividing ECM/FLM (both expressed in RPKM).

Negative fold change is obtained by calculating (ECM/FLM)⁻¹

^b : Expression level, expressed in RPKM, corresponding to a mean of three biological replicates.

^c: Size is given in amino acids.

Species		Lifestyle ^a	ProtID ^b	Rep.	Size ^c	Sequence ^d
Laccaria b	oicolor	ECM	703645	4	68	<u>MYFHTLFACATLMLITTAHA</u> SPTVINSLDSRKADLNRDVEARHAA DWRR DS DWRR DS DWRR DS DWRR DS*
Laccaria b	oicolor	ECM	388224	4	70	<u>MYFHTLFACATLMLITTAHA</u> SPTVINSLDSRKADLNGDVEARHAA DWRR DS DWRR DS DWRR DS DWRR DSD*
Laccaria b	oicolor	ECM	723803	4	70	<u>MYFHTLFACATLMLITTAHA</u> SPTVINSLDSRKADLNRDVEARHAA DWRR DS DWRR DS DWRR DS DWRR DSD*
Laccaria b	oicolor	ECM	771099	4	70	<u>MYFHTLFACATLMLITTAHA</u> SPTVINSLDSRKADLSGDVEARHAA DWRR DS DWRR ES DWRR DS DWRR DSD*
Laccaria	bicolor	ECM	427122	4	70	<u>MYFHTLFACATLMLITTAHA</u> SPTVINSLDSRKADLNGDVEARHAA DWRR DS DWRR DS DWRR DS DWRR DSD*
H53						
Laccaria	bicolor	ECM	465715	4	70	<u>MYFHTLFACATLMLITTAHA</u> SPTVINSLDSRKADLNGDVEARHAA DWRR DS DWRR DS DWRR DS DWRR DSD*
H70						
Laccaria	bicolor	ECM	231734	4	70	<u>MYFHTLFACATLMLITTAHA</u> SPTVINSLDSRKADLNGDVEARHAA DWRR DS DWRR DS DWRR DS DWRR DSD*
H82xH70						
Laccaria	bicolor	ECM	169408	4	70	<u>MYFHTLFACATLMLITTAHA</u> SPTVINSLDSRKADLNGDVEARHAA DWRR DS DWRR DS DWRR DS DWRR DSD*
S238N						
Botryobas	sidium	Wood decayers	36113	4	72	<u>MRSVFFIAASLFFAQSALA</u> AAVPRPIQDLA PWKR VENDRP GWKR EEVGGA DWKR EEVGGA DWKR GDAAVGQL*
botryosum	n	(BR)				
Aporpium	caryae	Wood decayers	771601	4	73	<u>MRLSTLLVLALSSVALA</u> APAVGIDARAKAVTP GWKR KEAVTP GWKR ESPVTP GWKR KEAGTP DWKR AEDGTPE*
Exidia glaı	ndulosa	Wood decayers	774536	6	85	MFFQNLLAIISLTLAIAVSAQASYPALKRDPAQ DWKR DPSQ DWRR EPAQDWRLEPAQ DWRR EPDQ DWKR EAAQ
						DWKREAAQDWRR*
Hebeloma	1	ECM	440029	4	85	MLFTPRYLAVISLFFLSSMVAAAPVAEADGPDWRRENSLARASADWRRAEVVGRDAASADWRRSEKGARATVD
cylindrosp	orum					WRSENEARGRI
Gymnopus	S	Wood decayers	1690366	5	86	MLFSSRYLAVISLFLLTSTVAAAPVSNPSDP DWRR TDSVARADP DWRR TEA DWRR AEA DWRR TENAARGDP DW
androsace	eus	(WR)				RESENSARSNPDW
Artolenzit	es	White rot	806214	5	87	MQFRTMLVFVALALANVGYGAPTPQGIDNSDLPRGVPTS DWRR GVPTS DWRR GVPTS DWRR GVPTS DWRR GV
elegans						PISDWRREPEAEAGL
Auriscalpi	um	Wood decayers	1564130	4	91	MRFIAAFVTLALTAAFVPAYAAPAALPADLSLRQESPAAGNWRRGEASPDIIPAGNWRRGEASPDIIPAGNWRRGE
vulgare						VSPDIIPAGNWRRDV
Bjerkande adusta	era	Wood decayers	38578	4	91	<u>MSARSIPSLAVLLAFFFVLLAVVSA</u> APVPELEERGGLGYSNA SWKR GLGYNNA SWKR GLGYNNA SWKR GSLSYGA GSA DWKR EPEPETNDA*
Schizophyl commune	llum	Wood decayers (WR)	256147	5	94	<u>MHFTRAIAAAALLLAATVAA</u> APVPGDELPELKRAGAGVVSS DWKR EAGVPTS DWKR EAGVPTF DWRR DVPTS D WRRGVPTS DWRK RQGIRNSDW*

Schizophyl	llum	Wood decayers	324408	5	94	MHFTRAIAAAALLLAATVAAAPVPGDELPELKRAGAGVVSS DWKR EAGVPTS DWKR EAGVPTS DWRR DVPTS D WRR GVPTS DWRK RQGIRNSDW*
Schizophyllum Wood		Wood decayers (WR)	2611276	5	94	<u>MHFTRAIAAAALLLAATVAA</u> APVPGDELPELKRADAGVVSS DWKR EAGVPTS DWKR EAGVPTS DWRR DVPTS D WRRGVPTS DWRK RQGIRNSDW*
Gymnopus Iuxurians	;	Litter decayers	98464	4	96	MARKEQSEMARSIQLEDVAMRGDMHRLA DWKR EISGAPTA DWKR DVSGAPTA DWKR DPEPQPGMRTA DWR R EPQSNDDSGASHFESKRMDQRIPSW*
Gymnopus androsace	s us	Wood decayers (WR)	921359	5	98	<u>MRTTFSVAFAFAIFSMLASA</u> APIESNVVVRGPP DWRR EGAEVARGPP DWRR DEVARGPP DWRR EGTEVARGPP D WRREGAGVARGPP DWKR QEADSAI*
Laccaria amethystir	na	ECM	676588	6	102	<u>MYFHNLFACVTLMLITTAYA</u> SPTVRNSLDSRNGDFNGDVEARHAFEGAGQRNQ DWRR GT DWRR GT DWRR GT D WRRGTDWRRDSDRDWRRDRHSLNELEREGS*
Gymnopus Iuxurians	5	Litter decayers	239794	5	104	<u>MRYFSLASAMVVFSILLSYCSA</u> VPLDSRSGTGEAGAA DWRR SGTGEAGAA DWRR SGTGEAGAA DWRR SGTGEA GAA DWRR SGTGEAGAA DWRR SGTGEAGAADW*
Laccaria amethvstir	na	ECM	99136	6	105	<u>MRIASTILIIASIAIAIFA</u> APINDGVVARGVKVVRAAEAQSQH DWRR EAEAGQ DWRR EAEAGQ DWRR EAEAGQ D WRREAEAGQ DWRR EAEASQ DWRR DAEAQMDW*
Laccaria bi	icolor	ECM	658069	6	105	<u>MRIASTILIIASIASAVCA</u> APINDEVVARGIEVVRAAEPEAQR DWRR EAEPQR DWRR EAEAQR DWRR DAEAQR DW RR DADAQR DWKR DAEAQR DWRR DAEAQRDW*
Schizopora paradoxa	1	Wood decayers	936356	9	105	<u>MQLSRTLFFVLGVVAMAAA</u> APINADGGVVAREPGQ DWRR EPGQ DWKR VDQ DWRR EPGQ DWKR VDQ DWKR VDQ DWRR EPGQ DWKR VDQ DWKR EPGQ DWRR EPGQDW*
Macrolepio fuliginosa	ota	Litter decayers	788375	5	107	<u>MRVSFLFVASIIGAALA</u> APLPVDGDAAPIARANAGPPP PWKR EAEAAPNPSSPS DWRR DAAAGNPS DWRR NAEA ANPSS DWRR NAEAQPHAAVA DWRR APIIPEDQV*
Paxillus ammoniav	virescens	ECM	1012017	4	108	<u>MQLSRLALLVAFVCSAVA</u> LPVAPAAELLDRSPVQDRSTSGFGGDVTPEMKRGSGGISSP GWKR GSGGISSP GWKR GSGGISSP GWKR GSGGISSP GWRR ETADFDVPA*
Amanita th	hiersii	Litter decayers	5213	5	112	<u>MRILILAILLTAALA</u> APISSDADTTTPDTTNVPNADLPAAAHVGLSAP DWKR GNIGPP DWRR SVRLPP DWRR ANIG AP DWRR DDESEIEVQGIEGGAVPP DWRR AIRPPPWK*
Laccaria bi	icolor	ECM	334723	7	115	<u>MRIASTILIIASIVSAVCA</u> APINDEVVARGIEVVRAAEPEAQR DWRR EAEPQR DWRR DAEAQR DWKR EAEAQR DW RR DAEAQR DWRR DAEAQR DWRR DAEAQRDW*
Laccaria H70	bicolor	ECM	244601	7	115	<u>MRIASTILIIASIVSAVCA</u> APINDEVVARGIEVVRAAEPEAQR DWRR EAEPQR DWRR DAEAQR DWKR EAEAQR DW RRDAEAQRDWRRDAEAQRDWRRDAEAQRDWRRDAEAQRDW*
Laccaria H82	bicolor	ECM	435739	7	115	<u>MRIASTILIIASIVSAVCA</u> APINDEVVARGIEVVRAAEPEAQR DWRR EAEPQR DWRR DAEAQR DWKR EAEAQR DW RR DAEAQR DWRR DAEAQR DWRR DAEAQR DWRR DAEAQRDW*
Laccaria	bicolor	ECM	446561	7	115	<u>MRIASTILIIASIVSAVCA</u> APINDEVVARGIEVVRAAEPEAQR DWRR EAEPQR DWRR DAEAQR DWKR EAEAQR DW RRDAEAQR DWRR DAEAQR DWRR DAEAQR DWRR DAEAQRDW*

H82xH70					
Fistulina hepatica	Wood decayers (WR)	75093	10	117	<u>MFFNRILTVVAAVLVVSVAA</u> APAPVPIAADSVERNV DWKR QQNV DWKR EANV DWKR NV DWKR EAEANV DWK RNV DWKR NV DWKR GNV DWKR EAEANV DWKR EAEANV DWKR EANVDW*
Rhizodiscina lignyota	Wood decayers	58893	6	118	<u>MRFIIASVVVAFFVTAANG</u> VPVSELDSLSMGTRKVEFPSFNNHAAELVERGQT DWKR NPETDVKRGQT DWKR GQ T DWRR GQT DWRR EVEDEKRGQT DWKR EVEEKRGQT DWRR GQTDW*
Trematosphaeria pertusa	Wood decayers	507338	5	119	MRFILPVLAALVAVTIAAPTPDPKKPGDIYKRHENKRAEDTERGDI PWKR GEATTETERGGI PWKR EEASTDTERGGI PWKR EEASTETERGGI PWKR EDATTDTERGGI PWKR SRGGY*
Hypholoma sublateritium	Wood decayers (WR)	40934	6	121	<u>MRVVSFTLLVVSALSAVFA</u> APINDALIVRDALLVREAGPTPP GWKR EALPTPP GWKR EAEPQPTPP GWKR EAAPLP TPP GWKR EAAAAPTPP GWKR EAVPQPGPP GWKR EAAPRPTPPGWK*
Auriscalpium vulgare	ECM	1678228	4	124	<u>MRLTVTFVTLALAAAFDPVFA</u> APVAAPAGQTLRQESPDLALPD NWRR GEVSPDLALPD NWRR GEVSPDLALPD N WRRGEIGPDLALPDNWRRPDLALTTGVAVRSAPTSLFPTTGVATLSRAEW*
Laccaria bicolor D101	ECM	833330	6	125	<u>MRIASTILVIASIASAVCA</u> APINDEVVARGIEVVVGPAIFPISNQPNVFDPPFQRAAEAEAQR DWRR EAEPQR DWRR DAGAQR DWRR DAEAQR DWRR DAEAQR DWKR DAEAQR DWRR DAEAQRDW*
Gymnopus androsaceus	Wood decayers (WR)	876936	9	126	<u>MRANGILAAVALLFSMLAVVTA</u> HPIELREDGVPP DWKR EDGLPP DWKR EDGLPP DWKR EDGLPP DWKR EDGLPP P DWKR EDGLPP DWKR EDGLPP DWKR EDGFPP DWKR EDGLPPDW*
Gloeophyllum trabeum	Wood decayers (BR)	109288	11	130	<u>MFSKFYLAILLLIGAVLSTA</u> LPTPEAAPAAAIDVKRGGS DWKR EPEPGS DWKR GS DWKR EPEPGT DWRR EPQRGS DWKR GS DWKR EPEPGS DWKR GGS DWKR GS DWKR EAEPGS DWKR GS DWKR EPGSDW*
Cortinarius alaucopus	ECM	7098042	7	131	<u>MLFSIRYLTAFSLFLLTTRVAA</u> APVAEASSPEWRQNIAREAA DWRR SEIDARGSP DWRR SENYARGSP DWRR SEND ARGSP DWRR SENDARGSP DWRR SEIDARGSV DWRR SEIDARGSV DWRR SENDVRG*
Bjerkandera adusta	Wood decayers	187723	9	137	<u>MVFSSTLRALSILALALALA</u> SPTPPLSGREADTPSPP PWRR EVDTEVNTPAPP PWRR DEAAPP PWRR DELSPP PW RR DELAPP PWRR DEQFPP PWRR EESSPP PWRR DEPAPP PWRR DDLAPP PWRR DEATLDQLK*
Ceratobasidium sp	Plant associated	609397	6	137	<u>MRFSITFVMAVCAPLLALA</u> APISLNPPKPGSAEAQGFPNL GWKR EDAHVEAYTGQ EWKR DGTDPAAYRGQ GWKR DDASTDAYTGQ GWKR DPPKEDYPNH GWKR DEPKEDYPNQ GWKR QGGSIGIASGPGGFNKGWKA*
Neolentinus Iepideus	Wood decayers (BR)	1095641	11	137	<u>MFLSKSYLAIFILLFAVLASG</u> LPTPEADPSLVERTAIEDAKRGNT DWRR GT DWKR EPGSGS DWKR EPEPGT DWKR G T DWKR GT DWRR EPEPGT DWKR GT DWKR EAEPGT DWRR GT DWRR EPEPGT DWKR EAAPGTDW*
Agaricus bisporus	Litter decayers	1171138	8	138	<u>MRSLTFFALIASVLAATVTA</u> VPLENSNLPGRDVDLETSATPGAP GWKR SEQGPGAP GWKR SEQGPGAP GWKR KE QGPGAP GWKR EEQGPGAP GWKR KEQGPGAP GWKR SEQGPGAP GWKR KEQGPGAP GWKR TEDTPA*
Macroventuria anomochaeta	Saprotrophs	451518	6	138	<u>MRVTILSLALTMSVIVMA</u> LPTPLAPTSTTINIREPHALGTWP SWKR NAEPSTP GWKR EAEDEAEAGTWP SWKR EA EDEAEAGTWP SWKR EAEDEAEAGTWP SWKR EAEDEAEAGTWP SWKR DAVKPAKPGRNGVEGTE*
Aporpium caryae	Wood decayers	735414	8	139	MLFTKVVLAVAACAIATVQAAPNPQIKSPNWRREPAAAKPVADVSYWRREAEPEAEPATPNWRRNPEAATPNW

						RR EPEAGTP NWRR EPEAATP NWRR EAEAATP NWRR EADAEPATP NWRR EAEAEPATP NWRR EAKPE*
Stereum h	irsutum	Wood decayers	107311	8	140	<u>MKFSYTPLLLVLFAAFVAA</u> LPAVPRMSGEGGDQ DWKR VAVPDVVERMSGEGGDQ DWKR LSGKGGDQ DWKR M SGEGGDQ DWKR MSGEGGDQ DWKR MSGEGGDQ DWRR FSGEGGDQ DWKR MSGEGGDQ DWRR MSGEGGD QDW*
Laccaria H53	bicolor	ECM	375680	10	145	<u>MRIASTILIIASIASAVCA</u> APINDEVVARGIEVVRAAEPEAQR DWRR EAEPQR DWRR DAEAQR DWKR EAEAQR DW RRDAEAQRDWRRDAEAQRDWRRDAEAQRDWRRDAEAQRDWRRDAEAQRDWKRDAEAQRDWRRDAEAQR DW*
Laccaria S238N	bicolor	ECM	437780	10	145	MRIASTILIIASIASAVCAAPINDEVVARGIEVVRAAEPEAQR DWRR EAEPQR DWRR DAEAQR DWKR EAEAQR DW RRDAEAQR DWRR DAEAQR DWRR DAEAQR DWRR DAEAQR DWRR DAEAQR DWKR DAEAQR DWRR DAEAQR DW*
Macrolepi fuliginosa	ota	Litter decayers	735395	11	148	MSLADTSVLLQKRGDATAP GWRR DNAGAP GWRR GVEGAP GWRR GEEGAP GWKR SENSAP GWRR AEDGAP G WRR AEASAP GWKR AEDGAP GWRR GENGAP GWRR GSDEAASSPTWKRELEDVAAP PWKR TEEGAAAL PWKR GADAEIVD*
Amanita t	hiersii	Litter decayers	46935	7	151	<u>MRSIPFALAILSFLSLATA</u> APILNDDLALRSDFEAREPGVVAVPILEREPEELPTRNWQRAATPP DWRR TAEAEAYAP D WRRDAEPEAGAPVQ SWKR EPEPGAPTR PWKR EPEAGAPVQ DWRR EPEAGAPTR SWRR DAPQPP SWRR DAPP S*
Dendrothe bispora	ele	Unknown	800387	7	151	<u>MRTSTLFATLLVSLLSSSVYG</u> SPIPVASDSNDSIQLARDLQSLEGRSPTFRQA SWKR EEELDERWYRNA SWKR DEEAK RFSA DWKR DEEEAKRFNA DWKR DEEAKRFSA DWKR DESEAKRFKA DWKR EEEVEEKRVYRQV DWKR EAANAD W*
Galerina marginata	1	White rot	204523	9	151	MLFNSRYLAVISLFLLTSTVAAAPVPEAGTAP DWRR SEIDARGNA DWRR TEIDARGNA DWRR SENNARGNA DWR RSENTARGNA DWRR SEIDTRGNA DWRR SENDARGNA DWRR SENSARGNA DWRR TENNARGNA DWRR SEND ARGNADW*
Dendrothe bispora	ele	Unknown	807090	7	152	<u>MRTSTLFATLLVSLLSSSVYG</u> SPIPVASDSNDSIQLARDVQSLEERSPTFRQA SWKR EEEELDERWYRNA SWKR DEEA KRFSA DWKR DEEEAKRFNA DWKR DEEAKRFSA DWKR DESEAKRFKA DWKR EEEVEEKRVYRQV DWKR EAANA DW*
Dendrothe bispora	ele	Unknown	836685	7	152	<u>MRTSTLFATLLVSLLSSSVYG</u> SPIPVASVHSNDSIQLAQDLQSLEERSPTFRQA SWKR EEELDERWYRNA SWKR DEEA KRFSA DWKR DEEEAKRFNA DWKR DEEAKRFSA DWKR DESEAKRFKA DWKR EEKLEEKRVYRQV DWKR EAANAD W*
Exidia glaı	ndulosa	Wood decayers	642657	10	155	MQLTLSFVLLSIFSAVIVIAAPAAAPIDPAPNWKREPEVHPPDWRREAAVHNPDWKREPEVHPPDWRREAAVHNP DWKREPEVHPPDWRREAAVHNPDWKREPEVHPPDWRREAAVHNPDWKRGPEVHPPDWRREAAVHNPDWK REPAVASEPLI*
Hebeloma cylindrosp	orum	ECM	448789	7	156	<u>MHFASLIAFVALTFFTSTQA</u> LPVSVEVLNDSSPTDAVAHAVDRLLSLTEAKGQGSP GWKR SALEPNTPVPP PWKR EA DSEGSPAWKRKESSISSP PWRR TTTTTPPPPTP DWKR QMDSSVPPGSP DWRR EAEESVPP PWKR TSEQSASP PW KR SYA*
Macroleni	ota	Litter decavers	801330	10	158	MRI SEELSI ELVASATAL PVAEPAAAPAPAAVAGNSDWRRGNSDWRRGNSDWRRGNSDWRRAEVDERGNSDW

fuliginosa					KRSEAEARGSGNSDWRRSDVNARAEARGNSDWRRDTALPERAAVDSRGNSDWRRTEVDVRGNSDWKRAGSEA RGNSDWRREESEQA*
Ramaric rubella	Saprotrophs	1624630	5	158	MALRSPSPVPVSVIEISSGEEAAAEMKELDWKKEILEEKLWKKAKAKRERQEKEAKRERQEKEAVERHEEAWKQREE
			-		E DWKR REKE DWKR REKE DWKR REKEDE DWKR QEDTDQKKWWEDAERWKNESTWSIREEPELRK TSVSGSEIFE*
Coprinopsis	Litter decavers	490115	7	160	<u>MRIASAALFFVSVLSVVSA</u> LPTPEVDPVAPVAGVVAREPQMRPP SWRR DPEPQSRPP SWRR EPEPEPEPQYKAP S
cinerea					WRREPEPQSRPPAWRREPEPEPQYKAP SWRR EPEPEPQYKAP SWRR EPEPEPQYKAP SWRR DPEPQYKAP SWR REPEPQMRPPSW*
Auricularia	Wood decavers	1302180	10	162	<u>MKLHAVALVLSVALAYA</u> APLAPAQDETVARRVS DWRR SDEARRSSPELDARVSYWKRDDVEAREAQPVS DWKR E
subalabra	(\\/R)				PEPVS DWKR EPEPVS DWKR MPVSYWKRVS DWKR VS DWKR VS DWKR DDVAAREPVS DWKR TPVS DWKR VS D
Subgrubru					WKRSESAVEVRSSVRKRQ*
Hypholoma	Wood decayers	49943	9	165	<u>MRFSNIVAVASFMFIASTQA</u> APAPTPLRLYKRAELGTDGSPVQ GWRR EADAAPGSPVQ GWKR EAEANPGSPVQ G
suhlateritium	(\\/R)				WKRDAEAAPGSPVQ GWKR DADAAPGSPVQ GWRR EPEAAPGSPTQ GWKR EAEAGSPVQ GWKR EAEAGSPVQ
Sublateritiani					GWKREAESAPGSPVQGWKRED*
Exidia qlandulosa	Wood decayers	759788	10	166	<u>MKLTLLALVASLAVAYA</u> APVVPAAEGIERRVS DWRR AEADAAAQARSTPEQLDARDDVEARDAKPVS DWKR VS D
0	,				WKRVSDWKRADVDAREPKPVSDWKRDDVEARDAKPVSDWKRVSDWKRVSDWKRDDVAARAAKPVSDWRKR
					VS DWKR VS DWKR GDAAVQARDV*
Auriscalpium	ECM	1681064	9	167	<u>MRFTVQFVTLALAAAFAPAFA</u> APAAAPADLSLRKESTDIDVAG PWRR GEGSDIDVAG PWRR GESSTDIDVAG PWR
vulaare					RGESSTGIDVAGPWRRSEGGTDIDVAGPWRRSESSTDIDVAGPWRRGDGSDIDVAGPWRRGEGSTDIDVAGPW
valgare					RRGESSTEIDVAGPWRRDV*
Hypholoma	Wood decayers	36958	10	173	<u>MPTDPDEEGIPLPRVANTRDSELMLTMLFPSRYLTVISLFLLTSTVAA</u> APIPEAGGVGSGTT DWKR GSGTT DWKR GS
suhlateritium	(W/R)				GTT DWKR GSGTT DWKR GSGSS DWKR SDDVEVRGSSTE DWRR EEAEIDARGSSTE DWRR GSSTE DWRR GSSTE D
5467470777	(*****)				WRRGSSTEDWRREAENDERASDW*
Punctularia	Wood decayers	115989	10	173	<u>MQVRTILIALAALVSATAA</u> APIESTDALRRDPGGVA DWRR EPGGVA DWRR EPGGVADWKKREAAPAPGGVP DW
striaosozonata	(W/R)				RR EPGGVP DWKR EELEEARRDPGGVA DWKR GGVA DWRR EPGGVP DWRR EPGGVA DWKR AEEEAEERRRHPG
strigosozonata	(0010)				GVA DWRR GGVA DWRR GGVADWEPESAPES*
Hebeloma	ECM	443466	9	179	<u>MRLSSTALFFVSLLTVALS</u> APINDAMIEARGGEEVAREPATLVNREAEAGTPVWRRDAEPGPP GWRR DAEPGPP G
cylindrosporum					WRRDAEPGPPGWRREADADPAPPGWRREAEAYPGPPGWRREAEPAPTPPGWRREAEPAPTPPGWRREAEAA
eynnañ esperann					PTPP GWRR EAEAAPTPP GWRR EAEPAPTPPGWR*
Gymnopus	Litter decayers	242026	11	181	<u>MRTYSLLAGAMVLLFAVHSQA</u> APIEARAGTSEAGAA DWRR AGTSEAGAA DWRR AGTSEAGAA DWRR AGTSEAG
luxurians	,				TA DWRR AGTSEAGTA DWRR AGTSEAGAA DWRR AGTSEAGAA DWRR AGTSEAGTA DWRR AGTSEAGTA DWR
					RAGTSEAGAADWRRAGTSEAGAADWRRAGTSEAGAADW*
Gloeophvllum	Wood decavers	141070	17	183	<u>MRVQALLAVFASALAVARA</u> APVETRDLVARSPVVEARADVVARAS DWKR EPEPEPEPAS DWKR AS DWKR AS DW
traheum	(BR)				KRASDWKREPEPASDWKREPEPASDWKRASDWKRASDWKRASDWKREPEPASDWKREPEPASDWKREPEPA
ti unculli					SDWKRASDWKRASDWKRASDWKREPEPEPASDWKRASDW*

Plicaturopsis crispa	Wood decayers (BR)	180022	15	185	MRVQSLVLALSALAAAVAGLPLGGAEVVVARAPVADARAVEARIGPDWRREPGEPGSDWKRGDPGADWRRGES GADWKRGEGGPDWKREPGESGSDWRREPHTPDWKREPHTPDWKREPHTPDWKRATPDWRRGEGGPDWKR
Auriscalpium vulgare	ECM	1681041	4	203	EPGEAGPDWKRGEGGPDWRREPGTPDWRREPATPDWRRATPDW MATKTSRYSSFCGASVEVPSAADLQGVVEEQSEALADLGMAVGGVEASLKENTKVVKGNVVGLNERIMEPVKWLR LKQALLVLISFSLAKAASDTDRCSLVVISIKDFHLLVFQGVYCLQARPPSMKFSTAFFALVLATVVSAGPLEEKRVGSDW FRGVGTDWKRGVGTDWKRGI GTDWKREVGPDSERGI GTDWKRDEGVQA*
Microstromatales sp	Saprotrophs	278564	8	211	MKFITAATALALCAALGVAAAPVSEAPLAERAVVEERTVRNNPWKRTVRNNPWKRDEDLEERTVRNNPWKREED LEERTVRNNPWKRTVRNNPWKRDEDVEERTVRNAPWKREEQSLEERTVRNAPWKRDEDVEERTVRNAPWKRD EDVEERTIAAIMTVLSKRFPTRASGRAKSITILVYARIRSSSATSLFDESRASPTYFPSLLWTRT*
Schizophyllum commune	Wood decayers (WR)	2705922	12	223	<u>MRLDHILALAAALLASAAVG</u> SPVPAPEAAPAADVDARGFRTN DWRR APEEEARGFRTN DWRR EPGFRTN DWRR DPQVKSP SWKR APEEEARGFRTN DWKR EAGFRTN DWKR EEDIDERGFRTN DWKR AADVEARAEAVEAREAHVE ERQYRTN DWKR DEARGFRTN DWRR EPGFRAN DWKR EPGFRTN DWRR SPEEVVEARSPEEAVEERQYRTN DWR R EVEA*
Pycnoporus coccineus	Wood decayers (WR)	1438311	10	226	MISIRGSAFFIILLHALSAAVDMASARPAVGLAAPPPVPTEQVWRREVAAVVPVPSEPGWRREDPVPTEPGWRRDE AVAPVPTEPGWKREEGVVVLVPSEPGWRREDPVPTEPVWRRKEDVVAPVPTEPGWRREDDAADPVPTEPGWRR EDAAAVPVPTEPGWRRDEDAANPVPTEPVWRREEAVAAPVPTEPGWRREAPVPTEPGWRRADAAAAPVPTEPG WKRA*
Schizophyllum commune	Wood decayers (WR)	285556	14	230	MRLDHIFALAAALLASAAVGSPVPAPEAAPAAEVDARGFRTNDWRRSPSPEPQVKSPSWKREPEEEARGFRTNDW KREAGFRTNDWKREAGFRTSDWKREAGFRTSDWKREEEVEERQYRTNDWKREAGFRTNDWKREEDVEARAED VEELAEDVEERQYRTNDWRRSPEEEARGFRTNDWKREAGFRTNDWKREAGFRTNDWKRDPQSPSWKRAPEEE ARGFRTNDWRRE
Armillaria gallica	Wood decayers (WR)	1016168	13	240	<u>MRFHNLLVVLASAMAFVGA</u> APAGELSEVELREAEPANGGGGQSGQ SWRR DAEEIHVAREPANQASA AWRR GPA NQASA AWRR DPANQASA AWRR EPANQASA AWRR DPANQASA AWRR EPANQASA AWRR EAEPMNGGSAGA AWRR QPEAEPMNGGATGQ SWRR EAEPMNQPAA GWRR EAEPMNQPAA GWRR EAEPMNGGATGQ SWRR EA EAEAEPINGNGP SWRR EAKAEPYNQPVAGW*
Aporpium caryae	Wood decayers	356713	12	247	MANCTRSAVRNVSTAERFIKTSSGPGPLPRHPISPGSSHRPAVAMKLSIFALVASLVVAAVAAPVAPSHDMLERRTS DWRRSEAVNARTSDWKRTSDWKRTSDWKRTSDWKRTSDWKRSDRKRADVDARDAHAQPTSDWKREAEPEP VPVAEEKRTSDWKRTSDWKREGDVAAREPTSDWKRTSDWKRESVDVETSRLVSPRTRVALVRLFTTLPS TRPRSLPIILYLLARLRAWRPCVP*
Pycnoporus coccineus	Wood decayers (WR)	880174	15	258	MVSIRGYAFFVILVHALSAAVDMASARPAVGVAAPPPVPTEPGWRRDIAAVVPVPSEPGWRREDPVPTEPGWRR DEAVAPVPTEPGWKREEGVVIPVPSEPGWRREDPVPTEPGWRREEDVLAPVPTEPGWRREDDAADPVPTEPGW RRDEAAVVPVPTEPGWRREEDAAAPVPTEPGWRRNEAVANPVPTEPGWRRDEAAAAPVPTEPGWRRADDAVV PVPSEPGWRREAPVPTEPGWRRADAVAAPVPTEPGWKRA*
Schizophyllum commune	Wood decayers (WR)	248517	14	263	<u>MRLDHIFALAAALLASAAVGS</u> PVPAPEAAPAAEVDARGFRTN DWRR SPEEARGFRTN DWRR SPSPEPQVKSP SW KR GPEEEARGFRTN DWKR EAGFRTN DWKR EPGFRTS DWKR EEDVEERQYRTN DWKR EAGFRTN DWKR EEDVE ERAEGVQERAEDVESRAEAVESRAEAVESRAEAVGERQYRTN DWRR SPEEEARGFRTN GWKR EAGFRTN DWKR

					DPQVKRP SWKR DPQVKRP SWKR APEEEARGFRTN DWRR EEVGA*
Armillaria mellea	Root pathogen	13461	7	286	<u>MRFHNVLVVLASAMAFVGA</u> APAGERSEVELREPEPANGGGGQSGQ SWRR DAEDIHVAREDIHVAREPANQASA
					AWRRDPANQASAAWRREPANQASAAWRREPANQASAAWRRSPANQASAAWRREPEPANQASAAWRREPEP
					MNGGSAGAAWRRQPEAEPMNGGGGASGQ SWRR EAEPMNQPAA GWRR EAEPMNQPAA GWRR EAEPMNQ
					PAA GWRR EAEPMNQPAA GWRR EAEPVDGQSLRREAEAEAESLRREAEAEAEPINGNGP SWRR EAKAEPYNQPV
					AGW*
Sarcoscypha	Wood decayers	460438	5	325	<u>MQLSTLLPLAILSLASA</u> SLLIDYTGGDPANVLGNVELEGSSLGDHVDESDDCFIKPGEDPDTGKQSLHYHRSSDFRRAE
coccinea					VKTLANKIQEDKTYYIGYNLRLTQEHESLVIFQWKKYDKTASPVQNIPFHLEFKSSQLTLAYTVPDEARKAVAWSDFSI
					GEEHHIGLAINTADDGSGWLEYYIDGEQQKFDGADRLEGARLFTGPTGPKFGIYRGEGSGEASEFDSYVYRVMISDE
					SFDEVEEAAGISGSGSGSGSGSSGNSTESATGKKEDEEKRQVQNP DWKR QVQNP DWKR QVQNP DWKR QVQNP D WKRQVENP DWKR QVKNPDW*
Schizophvllum	Wood decavers	2745165	4	504	MANMRMDAMSIRDSGNEYLVEMSTLQNGNYDVSYMVPLKVGTPPQTVYVQVDTGSSDLWLASPSCQTSACKSS
commune	(\M/R)				GHTYDPSSSSSAQTTSADFSISYLQGQVSGDVVKDTVRIGPASINAQALAAASNVTNEPLGDEFNGVLGLALPDNSLI
commune					ASKDGGDAVTKGLFGADGAPGNKFIGMLLGRPGSDRYPSLLGLGTHPSSEQLRLPDGKDVESSLSYLGLSSDESGELL
					FKVQLAGIDAHPSTVQGPDAGTNQNNLTADTALLGAPLRAVFDSGVPLILTTSTIANAVYGAVGVGPGSDGVYYLPC
					ATPLNLTFTLAESGSNDSPRIAVPLHPSDMVIDGGGGGGGGGGGGGGAGTGSCMGAIQAVADLDSSSSNGAGVDIVLGTPFMR
					NVYSVLAYENPDAWHGQRKRAGPS DWRR DVPMS DWRR DVPTS DWRR DVPTS DWRR GGPSAKEGRQHEHSTF
					VERELRREDEREKLVARHARHNSTRCFSREHDFEEGRSGGVGLRISRLARR*
Schizophyllum	Wood decavers	112143	9	694	MANMRTDAMSIRDSGNEYLVEMSTLQNGNYDVSYMVPLKVGTPPQTVYVQVDTGSSDLWLASPSCQTTACKSSG
commune	(\M/R)	-	-		HTYDPSSSSSAQMTSADFSISYLQGQVSGDVVKDTVRIGPASINAQALAAASNVTNEPLGDEFNGVLGLALPDNSLIA
commune	(WK)				SKDGGDAVTKGLFGADGAPTNKFIGMLLERPGSDRYPSLLGLGTHPSPEQLRLPDGKDVESSLSYLGLSADESGELLF
					KVQLAGIDTHPSTIQAPDAGTNQNNLTSDTALLGAPLRAVFDSGIPLILTTSTIANAVYGAVGVGPGSDGVYYLPCAT
					PLNLTFTLAESGSNDSPRIPVPVHPSDMVINGGGGGGGGGGGGGGGGAGTGSCMGAIQAVADLDSSSSNGAGVDIVLGTPFMRN
					VYSVLAYENPDAWHGQRKRAGPS DWRR DVPTS DWRR DVPTS DWRR DVPTS DWRR GVPTSDFRRSVPVSDFRR
					GVPVSDFRRGVPTSDFRRGVPVSDFRRDVPTS DWRR GGSS DWRR TEAGERLA DWRR GGPS DWRR GGPS DWRR
					AGDEGDLRLRRRHRRADQPERSSPHPRSSPNFARASSDTPFLGIIPLTDPSWAAVEFEAVNVKGTAYPDPDVADSGD
					LSAVGAASGDGGGLALGVKIFLGILGFFILCALLLGGRFFYMRRKAQKATPAEKAAEEAKETQRIESWRSSAELIKDKQ
					QFQDINGVRLD*
Schizophyllum	Wood decavers	2613917	7	738	MIKGRARSLLPHDGRASARSFPLTAAGPSTPEVPLKVAAAIVVLHLHSLPALSPLHIPLPCPARPRTIVIMANMRMDA
commune	/\//R)				MSIRDSGNEYLVEMSTLQNGNYDVSYMVPLKVGTPPQTVYVQVDTGSSDLWLASPSCQTSACKSSGHTYDPSSSSS
commune					AQTTSADFSISYLQGQVSGDVVKDTVRIGPASINAQALAAASNVTNEPLGDEFNGVLGLALPDNSLIASKDGGGDAV
					TKGLFGADGAPGNKFIGMLLGRPGSDRYPSLLGLGTHPSPEQLRLPDGKDVESSLSYLGLSSDESGELLFKVQLAGIDA
					HPSTVQGPDAGTNQNNLTADTALLGAPLRAVFDSGVPLILTTSTIANAVYGAVGVGPGSDGVYYLPCATPLNLTFTL
					AESGSNDSPRIAVPLHPSDMVIDGGGGGRGAGTGSCMGAIQAVADLDSSSSNGAGVDIVLGTPFMRNVYSVLAYE
					NPDAWHGQRKRAGPS DWRR DVPTS DWRR GVPTSDFRRGVPTSDFRRGVPVSDFRRGVPVSDFRRDVPTS DWR
					RGGPSDWRRTEAGERLADWRRGGPSDWRRGGPSDWRRAGDEGDLRLRRRHRRADOHERSSPHPRSSPNLARA

Table 1. Proteins sharing DWRR/DWRR-like motif. List of proteins containing at least four repetitions of the DWRR motif found in MiSSP8 protein sequence as identified by pattern search with PS-SCAN software on 354 fungal genomes from the Mycocosm databases.

^a : ECM = Ectomycorrhizal, Unknown = lifestyle not yet determined

^b: Protein ID

^c : Size of the full length protein is given in amino-acids

^d: DWRR motif are highlighted in bold. Signal peptide when detected by SignalPv4.1 is underlined.

Partie II. A la recherche de l'interactant de MiSSP8

1. Introduction

Des analyses antérieures à ma thèse ont permis de mettre en évidence que MiSSP8 est un gène requis pour l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne (Daguerre, 2014). Ces études ont également permis de montrer que le signal-peptide prédit est fonctionnel dans la levure, suggérant que cet effecteur est effectivement sécrété lors de la symbiose ectomycorhizienne. Pour identifier des interactants de nature protéique de MiSSP8, Yohann Daguerre avait réalisé un crible double-hybride en levure en utilisant une banque d'ADNc issus d'ectomycorhizes matures de L. bicolor / P. trichocarpa avec la protéine MiSSP8 comme appât. A l'issue de l'analyse de 3000 diploïdes de levure, quatre interactants putatifs ont pu être mis en évidence, dont trois protéines de P. trichocarpa et une protéine de L. bicolor. Les trois protéines végétales identifiées sont une protéine transmembranaire annotée comme une aquaporine, une protéine homologue d'un peptide RALF (Rapid Alkanisation Factor) impliqué dans des processus de signalisation et de différenciation cellulaire (Murphy & De Smet, 2014) et une protéine de type "Universal stress protein" impliqué dans les réactions aux stress abiotiques (Gonzali et al, 2015). La protéine fongique détectée est homologue à la protéine Cap64 impliquée dans la formation de la capsule chez le champignon pathogène d'animaux Cryptococcus neoformans (Chang et al, 1996). Afin de confirmer que ces protéines interagissent avec MiSSP8, j'ai mis en oeuvre une approche basée sur la complémentation bimoléculaire de fluorescence rBiFC (ratiometric Bimolecular Fluorescence Complementation, Fiche technique 2) (Grefen&Blatt, 2012). Des résultats préliminaires de localisation in planta de MiSSP8 montre une localisation pariétale et/ou membranaire de la protéine (Figure 11). Afin de préciser la localisation subcellulaire de MiSSP8 in planta, deux protéines fusions MiSSP8 (avec ou sans peptide signal)::eGFP ont été exprimées dans des feuilles de tabacs. Les résultats de l'observation au microscope confocal à balayage laser seront présentés. La localisation pariétale et/ou dans des microdomaines membranaires permet de poser l'hypothèse que MiSSP8 puisse interagir avec un/des interactant(s) de nature non protéique. En effet, de part cette localisation, nous pouvons envisager que MiSSP8 puisse être en contact avec des protéines membranaires et/ou



Figure 11 : Localisation de MiSSP8 synthétique couplée au FAM après incubation avec des racines de peuplier *P. tremula x P. alba*. Des racines de *P. tremula x P. alba* ont été incubées avec 3.6 uM de protéine MiSSP8 synthétique couplée à la carboxyfluorescéine (5,6 FAM). Une coloration au DAPI permet de mettre en évidence les noyaux des cellules végétales. MiSSP8-FAM ne pénètre pas dans le cytoplasme des cellules racinaires et localise dans la paroi et/ou la membrane plasmique. (Daguerre, 2014)



Figure 12 : Composition de la paroi des cellules végétales (A) et fongiques (B). La paroi végétale est composée d'un maillage de cellulose, d'hémicellulose et de pectine réparti en deux couches successives, la paroi primaire et la lamelle moyenne. La paroi fongique se compose de plusieurs couches de polysaccharides, notamment de beta (1-3)(1-6) glucane entremêlés de chaine de chitine. Sur cette couche de base se rajoute des glycoprotéines ainsi que des alpha (1-4)(1-6) glucane Tiré de Smith, 2001 ; Miedes et al, 2014.

apoplastiques, des sucres composant les parois (Figure 12) ou des lipides membranaires. J'ai donc testé ces différentes hypothèses au cours de ma thèse. J'ai d'abord produit la protéine recombinante MiSSP8 en système hétérologue bactérien *Escherichia coli* (Fiche technique 1, collaboration avec Arnaud Hecker, Université de Lorraine). J'ai ensuite testé sa capacité d'interaction avec des polysaccharides (fongiques et végétaux) ou des lipides soit par microcalorimétrie de titration isotherme (ITC : isothermal titration calorimetry) (Fiche technique 3), soit par puces à glycanes et puces à lipides. Le pouvoir antimicrobien (antifongique et antibactérien) de la protéine MiSSP8 a aussi été évalué par spectrométrie et néphélométrie.

2. Résultats

1. Absence d'interactions entre MiSSP8 et les protéines candidates détectées par le crible double-hybride en levure

Le principe de la technique du rBiFC et le protocole utilisé est présenté en annexe (Fiche technique 2). L'avantage du système utilisé (Grefen & Blatt, 2012) est de pouvoir visualiser les cellules végétales effectivement transformées car elles expriment la protéine fluorescente rouge RFP utilisé comme contrôle de transformation. Les fusions N-terminale (Figure 13A) et C-terminale (Figure 13B) sont réalisées afin de contrôler que la position de la fusion n'a pas d'effet sur l'interaction. Le signal RFP nucléocytoplasmique est observé pour toutes les constructions, à l'exception de cYFP::MiSSP8 / nYFP::LbCap64, (Figure 13A). L'interaction démontrée entre l'effecteur de L. bicolor MiSSP7 et la protéine de peuplier PtJAZ6 (Plett et al., 2014) est utilisée comme contrôle positif et l'interaction MiSSP8-PtJAZ6 comme contrôle négatif afin de valider le système de rBiFC utilisé (Annexe 4). Un signal YFP nucléaire, correspondant à l'interaction entre MiSSP7 et PtJAZ6 est détecté et aucun avec l'interaction MiSSP8-JAZ6 (Annexe 4). Un signal YFP est détecté pour les interactions MiSSP8-PtAquaporine et MiSSP8-PtUSP en fusion N-terminale (Figure 13A). En revanche, un signal YFP est présent pour les interactions MiSSP8-PtRalf et MiSSP8-LbCap64 en fusion C-terminale (Figure 13B, Annexe 6). Les analyses en western blot confirment les résultats obtenus pour les interactions MiSSP8/PtRalf (en fusion C-terminale) et MiSSP8/PtAquaporine (en fusion N-terminale).



Figure 13 : Vérification des interactants de MiSSP8 par la technique du rBiFC. Les interactants identifiés par double hyride en levure ont été vérifiés par rBiFC soit avec des fusions N-terminal (A) ou C-terminal (B) aux fragments nYFP et cYFP constitutif de la YFP. Les résultats obtenus ne permettent pas de confirmer un interactant spécifique à MiSSP8. L'image est éclaircie de 20% pour les besoins de l'impression.

Ces résultats ne permettent donc pas de confirmer que la protéine MiSSP8 interagit avec l'un des différents interactants identifiés précédemment par double hybride en levure, un signal d'interaction étant obtenu pour deux interactants différents, suggérant leur caractère artefactuelle (l'interaction de MiSSP8 avec à la fois une aquaporine et un peptide de type RALF étant considéré comme improbable).

Localisation subcellulaire de MiSSP8 en feuilles de tabacs

Les premières localisations subcellulaires de MiSSP8 ont été obtenues en incubant la protéine MiSSP8 mature avec des racines de Peuplier et ont permis de mettre en évidence une localisation pariétale et/ou membrane plasmique (Figure 11). Afin de préciser la localisation subcellulaire MiSSP8, j'ai exprimé dans les cellules de tabac une protéine fusion MiSSP8 complète (i.e. contenant son peptide-signal) avec la GFP, en faisant le postulat que la présence du peptide-signal permet la sécrétion de MiSSP8 dans l'apoplasme. MiSSP8::GFP montre une fluorescence non-uniforme avec des amas plus ou moins denses (Figure 14A). Certains de ces amas de fluorescence co-localisent avec les plasmodesmes révélés par la coloration au bleu d'aniline (Figure 14B, flèches blanches). Néanmoins, des amas de fluorescence ne se trouvent pas dans les plasmodesmes mais plutôt dans la membrane plasmique ou la paroi des cellules végétales (Figure 14B, flèches noires). Ces résultats indiquent que MiSSP8 semblent cibler non pas un compartiment subcellulaire distinct mais s'accumule de manière ponctuée au niveau des parois et/ou membrane plasmique.



Figure 14 : Localisation subcellulaire *in planta* **de la protéine MiSSP8**. (A) Expression transitoire en feuilles de tabac d'une protéine fusion SP-MiSSP8:eGFP par agroinfiltration. (B) Co-localisation de MiSSP8:eGFP au niveau des plasmodesmes marqués au bleu d'aniline (flèches blanches) et localisation sous forme de "patch" au niveau de la membrane plasmique (flèches noires). Grossissement x400.

MiSSP8 interagit-il avec des polysaccharides pariétaux ?

Afin de tester une affinité possible de MiSSP8 avec des polysaccharides et d'identifier les éventuels sucres cibles, un crible sur puces à glucanes (glycanarrays) contenant plus de 600 substrats différents a été effectué par le centre de recherche sur la Glycomique fonctionnelle (Functional Glycomics http://www.functionalglycomics.org/). L'hybridation de la protéine recombinante MiSSP8 sur la puce engendre deux pics dont l'intensité du signal se démarque du bruit de fond (Figure 16). Le pic le plus élevé (atteignant 430 unités de fluorescence relative) correspond à un sucre à longue chaine ramifiée et constituée de galactose, mannose, glucose et de N-acétyl-glucosamine. Le second pic (atteignant 210 unités de fluorescence relative) correspond à un sucre plus court contenant uniquement du galactose, du N-acétyle-glucosamine et du glucose. Néanmoins, l'intensité faible de fluorescence par rapport au bruit de fond (de 0 à 100 unités de fluorescence) indique que ces interactions sont relativement faibles et doivent donc être vérifiées par d'autres méthodes.

L'approche par crible de puces à glucanes indique que MiSSP8 pourrait se fixer sur des glucanes contenant de la N-acétyle-glucosamine. J'ai donc testé l'interaction de MiSSP8 avec différents glucanes d'abord d'origine fongique puis d'origine végétale et ce par microcalorimétrie de titration isotherme afin de déterminer les paramètres thermodynamiques d'interaction (s'il y lieu). Le principe de la technique et les conditions expérimentales sont précisés dans la Fiche technique 3. Pour utiliser cette technique, il est d'abord nécessaire d'éliminer toute présence de sel dans la protéine et le ligand à tester afin d'éviter des chaleurs de dilution relarguées par le ligand lui-même, ce qui pourrait engendrer des faux-positifs.



Plusieurs sucres ont été testés : cellulose et alpha-polygalacturonate spécifiques des parois des cellules végétales, différents oligomères de chitine relargués par la paroi fongique et des beta (1-3)-(1-6) glucanes retrouvés à la fois dans les parois végétales et fongiques. L'ajout de la protéine MiSSP8 ne provoque pas de variation de signal par rapport au contrôle c'est à dire qu'il n'y a pas de dégagement de chaleur, quelque soit le sucre testé (Figure 15). Ces résultats montrent que, dans ces conditions expérimentales, aucune interaction n'est détectée entre la protéine MiSSP8 et les glucanes de parois fongiques ou végétales utilisés.

MiSSP8 a-t-elle une activité antimicrobienne ?

MiSSP8::GFP localisant dans des amas de la membrane plasmique, j'ai émis l'hypothèse que MiSSP8 puisse interagir avec des lipides de la membrane plasmique. Pour tester cette hypothèse, j'ai criblé une puce contenant huit lipides membranaires différents (Fiche technique 4). L'incubation de la membrane avec la protéine recombinante MiSSP8 étiquetée avec la streptavidine n'a permis de révéler aucune interaction entre MiSSP8 et l'un des lipides présents sur la membrane (Annexe 5).

En parallèle de cette expérience, j'ai testé une possible activité antibactérienne de MiSSP8. En effet, MiSSP8 contient un motif riche en arginine (R) et tryptophane (W), propriétés partagées par certains peptides antimicrobiens. La présence de tryptophane et d'arginine permettant l'interaction avec les membranes plasmiques (Wenzel et al., 2014 ; Guilhelmelli et al., 2013). L'activité antimicrobienne de MiSSP8 a été testée sur cellule bactérienne et sur cellule fongique. La croissance d'une culture bactérienne d'*Escherichia coli* en présence ou en absence d'une quantité croissante de la protéine MiSSP8 recombinante native (i.e, sans étiquette streptavidine) a été suivie sur 24h en mesurant l'absorbance à 600 nM. Les courbes de croissance obtenues en présence ou en absence de MiSSP8 sont identiques (Figure 17A). La présence de MiSSP8, y compris à des concentrations fortes (100uM), n'a donc pas d'impact sur la croissance bactérienne de la souche d'*E. coli* testée. La possible activité antifongique de MiSSP8 a été testée en suivant par néphélométrie la croissance fongique à partir d'une suspension de spores du champignon saprotrophe *Phanerochaete chrysosporium* (Figure 17B). La présence de MiSSP8 n'a pas d'impact sur la croissance fongique de *P. chrysosporium*.



Figure 16 : Recherche d'interactants polysaccharidiques de MiSSP8 par crible d'une puce à glucanes. La protéine recombinante MiSSP8 avec une étiquette streptavidine a été hybridée sur une puce à glucanes réalisée par le consortium de glycomique fonctionnelle (CFG, Etats-Unis). L'interaction entre MiSSP8 et les sucres testés engendre un signal fluorescent proportionnel à la force de l'interaction.



Figure 17 : Mesure du pouvoir antimicrobien de MiSSP8. (A) Mesure de la croissance d'une culture liquide d'*Escherichia coli* en présence de la protéine MiSSP8 recombinante. La culture bactérienne est ajustée initialement à une D.O de 0,1. (B) Mesure de la croissance d'une solution de spores de *Phanerochaete chrysosporium* concentrée à 1.10⁶ spores.mL⁻¹ en présence de concentration croissante de protéine MiSSP8 recombinante.

3. Conclusion et discussion

1. L'utilisation du rBiFC n'a pas permis de confirmer les interactants protéiques de MiSSP8

L'utilisation de la complémentation bi-moléculaire de fluorescence (BiFC) est courante pour confirmer l'interaction entre un effecteur et un partenaire protéique putatif (Kerppola et al, 2006). Cette méthode possède néanmoins un certain nombre de limitations.

Notamment, un système de BiFC classique utilise deux vecteurs différents portant respectivement l'appât et la proie, tous deux fusionnés à un fragment de la YFP. Les deux vecteurs sont alors co-transformés dans la cellule avant observation. Il est difficile de s'assurer que la cellule est transformée avec la même efficacité par les deux vecteurs. Une plus forte proportion d'un des vecteurs par rapport à l'autre pourrait avoir des conséquences sur la capacité du système à mettre en évidence une interaction (Grefen & Blatt, 2012). De plus, il n'est pas possible de vérifier que chaque cellule observée est réellement transformée et exprime les protéines fusion d'intérêt, l'extraction de protéines pour une analyse en Western blot étant réalisée sur un ensemble de cellules. Le système de rBiFC utilisé ici prend en compte ces limitations en permettant de vérifier la transformation effective de la cellule observée via un contrôle interne (RFP) et la production des différentes protéines fusions avec une stoechiométrie 1:1 (Grefen & Blatt, 2012).

Néanmoins, le système ne peut pas éviter certaines limitations inhérentes au principe même de la technique. Les deux fragments de la protéine fluorescente YFP peuvent en effet s'associer indépendamment de l'interaction entre les protéines candidats testées s'ils se retrouvent fortement surexprimés, résultant en un faux positif (Kerppola, 2006). A l'inverse, la fusion de protéines à des fragments de la protéine fluorescente YFP peut gêner par encombrement stérique l'interaction entre les deux protéines candidates (Horstman et al, 2014). Dans notre étude, il a été choisi de tester à la fois les fusions NN (chaque fragment de la YFP fusionné au N-terminale de nos protéines candidates) ou CC (chaque fragment de la YFP fusionné au C-terminale de nos protéines candidates), afin de tenir compte de cette éventualité. Dans les deux cas, des interactions différentes sont identifiés, faisant douter de la véracité de ces interactions (Figure 13). Ces

interactions pourraient être à nouveau vérifiées en utilisant une autre méthode telle que la co-immunoprécipitation *in planta* qui permet de co-exprimer les deux partenaires putatifs associés soit à des protéines fluorescentes, soit à des étiquettes plus petites. La non-confirmation de l'interaction entre MiSSP8 et les protéines identifiées par crible double-hybride ne permet néanmoins pas d'éliminer l'hypothèse que MiSSP8 puisse interagir avec une protéine membranaire. En effet, le système double-hydride utilisé ne permet pas de détecter des interactions faisant intervenir des protéines transmembranaires, un système adapté devant alors être mis en oeuvre (Snider et al, 2010).

MiSSP8::GFP est présent dans des amas de la membrane plasmique et co-localise partiellement avec les plasmodesmes.

L'expression transitoire d'une fusion MiSSP8 mature (i.e contenant son signalpeptide)::eGFP dans des feuilles de Tabac a permis de préciser la localisation apoplastique observée en traitant des racines de peuplier avec une protéine MiSSP8 synthétique (Daguerre, 2014). Certains amas de fluorescence colocalisent avec les plasmodesmes marqués au bleu d'aniline (colorant de la présente au niveau des plasmodesmes). Cette callose localisation plasmodesmatale a déjà été rapportée chez la famille de protéine végétale PDLP impliquées notamment dans le passage de cellule à cellule des particules virales (Amari et al, 2010) et la déposition de callose en réponse à un agent phytopathogène (Caillaud et al, 2014). Néanmoins, l'expression transitoire de la protéine PDLP1 fusionnée à une GFP montre une localisation elle aussi ponctuée mais très spécifique des plasmodesmes. Or la fusion MiSSP8::eGFP n'est pas unique aux plasmodesmes car d'autres zones de membrane plasmique son marquées. Ce type de localisation ponctuée au niveau des plasmodesmes et d'ilots plasmalemmique a été rapporté pour les rémorines, protéines végétales localisées à la fois dans les plasmodesmes et dans des domaines membranaires appelés radeau lipidique impliqués notamment dans les réponses de défense des plantes (Raffaele et al, 2009). De plus, certains auteurs ont émis l'hypothèse que les microdomaines de la membrane plasmique tels que les radeaux lipidiques pouvaient créer des plateformes de signalisation requises pour la réponse des cellules végétales aux agents pathogènes et à la synthèse de callose (Faulkner et al. 2013, 2015 ; Tilsner et al, 2011).

L'immunolocalisation de la protéine MiSSP8 pourrait permettre d'obtenir une plus grande précision dans sa localisation subcellulaire et l'identification des cibles végétales. De ces expériences, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse que MiSSP8 interagisse avec des protéines membranaires localisant dans des domaines membranaires tels que les radeaux lipidiques et dans les plasmodesmes. MiSSP8 n'interagit pas avec les principaux sucres des parois fongiques

et végétales.

La recherche de potentiel interactants polysaccharidiques avec MiSSP8 a été menée par crible d'une puce à glucanes et par microcalorimétrie de titration isotherme. Elles n'ont pas mises en évidence une interaction entre la protéine MiSSP8 et des polysaccharides de la paroi végétale ou fongique.

La technique d'ITC n'est pas une expérimentation autorisant un crible à hautdébit de différents glucanes et différentes conditions expérimentales car elle nécessite de travailler avec des sucres solubles et des quantités importantes de protéines. Cette méthode est donc intéressante dans le cadre d'une interaction déjà établie mais se révèle trop coûteuse en temps et en matériel biologique pour un crible à haut-débit.

L'utilisation d'une puce sur laquelle sont déposés plusieurs centaines de sucres de natures différentes permet un réel crible à haut débit concernant les interactions protéines-sucres (Oyelaran & Gildersleeve, 2009). La puce proposée par le Consortium for Functionnal Glycomics est une puce contenant essentiellement des sucres présents chez les mammifères. Cette puce a néanmoins été utilisé avec succès pour mettre en évidence l'interaction entre l'effecteur Ecp6 du champignon phytopathogène *Cladosporium fulvum* avec la chitine (De Jonge et al, 2010). Dans notre cas, la fluorescence relative ne permet pas de conclure avec certitude sur une interaction avec une nature précise de glucanes. Néanmoins, une collaboration est en cours avec le laboratoire de Glycosciences de l'Imperial College de Londres. En effet, cette équipe a récemment mis au point une puce à glucanes contenant 150 glucanes spécifiques des parois végétales et de champignons (Palma et al., 2015). Cette approche paraît la plus pertinente en ce qui concerne l'étude des capacités lectiniques de l'effecteur MiSSP8.

MiSSP8 ne possède pas d'activité antimicrobienne

La richesse en arginine et tryptophane est une caractéristique partagée chez les peptides antimicrobiens, ces deux acides aminés étant impliqués dans l'interaction avec les bicouches lipidiques et la structuration du peptide (Chan et al, 2006). La présence dans la séquence protéique de MiSSP8 d'un motif répété riche en arginine et tryptophane ainsi que la faible taille de MiSSP8 sous sa forme mature (50 acides aminés) nous a amené à poser l'hypothèse que MiSSP8 (ou son motif) pourrait avoir une activité antimicrobienne (antibactérienne ou antifongique). Cette hypothèse est aussi cohérente avec la découverte de petites protéines sécrétées contenant un motif similaire à MiSSP8 chez des champignons saprotrophes. En effet, ces champignons saprotrophes sont souvent des champignons du sol en compétition avec l'ensemble des microorganismes présents dans leur environnement, entrainant la production de peptides antimicrobiens (Essig et al, 2014 ; Mygind et al, 2005). Néanmoins, les résultats obtenus sur la culture d'E. coli et la suspension de spores de P. chrysosporium ne montrent aucun effet antibactérien ou antifongique de MiSSP8, y compris à de fortes concentrations (100uM), pour laquelle un effet antimicrobien a été démontré pour des peptides précédemment caractérisés (Petre et al, 2016 ; Wang et al, 2016). Cela suggère que le motif répété de MiSSP8, bien que riche en arginine et tryptophane, ne possèdent pas d'activité antimicrobienne mais peut remplir une autre fonction. L'absence d'interaction observée entre MiSSP8 et les différents lipides testés tend à confirmer que MiSSP8 n'est pas un peptide antimicrobien.

L'ensemble des expériences menées n'a permis d'identifier un interactant à MiSSP8. Néanmoins, à l'analyse de ces résultats, nous pouvons émettre les hypothèses que MiSSP8 interagisse avec (i) des protéines membranaires localisant dans des domaines membranaires tels que les radeaux lipidiques et dans les plasmodesmes ou (ii) avec des lipides spécifiques et/ou enrichis dans les microdomaines membranaires.

Perspectives sur MiSSP8

Les analyses menées sur la protéine MiSSP8 n'ont pas permis de mettre en évidence un interactant mais la localisation subcellulaire effectuée sur feuille de tabacs suggère que MiSSP8 interagit soit avec des protéines membranaires, soit avec des microdomaines membranaires. En premier, l'expression en racine de Peuplier de la protéine fusion MiSSP8::GFP doit être réalisée et permettra de valider la localisation subcellulaire obtenue avec les feuilles de tabacs. Cette validation justifierait (ou non) de rechercher des interactants membranaires. L'identification d'interactions avec des protéines membranaires nécessite d'utiliser des approches adaptées. Le double hybride en levure de type « split-ubiquitin » est ainsi utilisé pour identifier des partenaires protéiques membranaires (Snider et al, 2010). Il est aussi possible d'identifier des partenaires d'interactions membranaires via la Co-IP in planta en rajoutant une étape de fractionnement et sous fractionnement cellulaire par ultracentrifugation (Avila et al, 2015). Cette dernière approche à l'avantage de pouvoir être réalisée directement dans la plante hôte et le tissu hôte. L'expression de la protéine MiSSP8 fusionnée à une GFP dans des racines de Peuplier associée à cette dernière méthode permettra potentiellement d'identifier un interactant protéique capable d'expliquer la localisation ponctuée de MiSSP8 dans l'apoplaste cellulaire. Dans le cas où l'interactant ne serait pas de nature protéique, l'utilisation d'étape de fractionnement/sous fractionnement peut être aussi associée à la microcalorimétrie de titration isotherme afin d'identifier le composé interagissant avec MiSSP8 (Zhou et al, 2011).

L'utilisation de souches de *L. bicolor missp8* ARNi a permis de mettre en évidence que MiSSP8 est nécessaire à la mise en place de la symbiose et potentiellement impliqué dans la formation du manteau fongique entourant la racine. L'obtention de racines chevelues exprimant MiSSP8 native ou tronquée pourra être utilisée pour réaliser une complémentation fonctionnelle des souches à ARNi de *missp8* de *L. bicolor* sous-exprimant le gène codant MiSSP8. Cette approche permettra aussi de confirmer l'implication de MiSSP8 dans la formation du manteau fongique, potentiellement en favorisant l'agrégation des hyphes. La mise en évidence de cette fonction impliquerait que MiSSP8 ne serait pas un effecteur de symbiose, celui-ci ne ciblant pas la plante hôte mais le symbiote.

L'étude du motif répété a mis en évidence qu'il n'est pas spécifique à *L. bicolor* mais se retrouve dans des petites protéines d'autres champignons. La localisation du motif répété et de la partie non répétée de MiSSP8 permettra d'étudier l'implication du motif dans la localisation de MiSSP8.



Figure 18 : Perspectives dans l'analyse fonctionelle de MiSSP8. Plusieurs démarches paraissent nécessaire de manière à déterminer la fonction remplie par MiSSP8 dans la symbiose ectomycorhizienne. (1) Etudier l'implication du motif répété dans la localisation de MiSSP8. (2) Identifier quelle(s) séquence(s) de MiSSP8 sont indispensables à la mise en place de la fonction. (3) Déterminer si les protéines partageant le motif répété de MiSSP8 possèdent une homologie structurale. (4) Rechercher un interactant protéique de nature membranaire pour démontrer que MiSSP8 est un effecteur de symbiose. Ces différentes étapes peuvent permettre d'élucider la fonction et l'émergence de la protéine MiSSP8 en tant qu'effecteur de

Il peut être intéressant d'étudier les autres petites protéines sécrétées présentes chez des champignons saprotrophes et ectomycorhiziens. Leur homologie de séquence primaire ne se retrouvant qu'au niveau du motif, ces protéines pourraient avoir une homologie au niveau structural. Leur production en système hétérologue et l'analyse comparative de leurs structures permettraient de mieux comprendre l'apport du motif dans la structure de la protéine et pourquoi des protéines provenant de champignons aux styles de vies différents partagent ce même motif. Cette approche vise à aborder la question de l'émergence des effecteurs de symbiose en testant l'hypothèse qu'un champignon ectomycorhizien ait pu développer une protéine effectrice à partir de la néofonctionnalisation de séquences préexistantes. L'ensemble des ces approches devraient permettre d'obtenir une analyse fonctionnelle en profondeur de l'effecteur MiSSP8.

Références

- Amari, K., Boutant, E., Hofmann, C., Schmitt-Keichinger, C., Fernandez-Calvino, L., Didier, P., Lerich, A., Mutterer, J., Thomas, C. L., Heinlein, M., M??ly, Y., Maule, A. J., and Ritzenthaler, C. 2010. A family of plasmodesmal proteins with receptor-like properties for plant viral movement proteins. PLoS Pathog. 6
- Avila, J. R., Lee, J. S., and Toriia, K. U. 2015. Co-Immunoprecipitation of Membrane-Bound Receptors. Arab. B. 13:e0180
- Caillaud, M.-C., Wirthmueller, L., Sklenar, J., Findlay, K., Piquerez, S. J. M., Jones, A. M.
 E., Robatzek, S., Jones, J. D. G., and Faulkner, C. 2014. The Plasmodesmal Protein
 PDLP1 Localises to Haustoria-Associated Membranes during Downy Mildew Infection
 and Regulates Callose Deposition. PLoS Pathog. 10:e1004496
- Chan, D. I., Prenner, E. J., and Vogel, H. J. 2006. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1758:1184–1202
- Chang, Y. C., Penoyer, L. a, and Kwon-Chung, K. J. 1996. The second capsule gene of cryptococcus neoformans, CAP64, is essential for virulence. Infect. Immun. 64:1977–83
- Essig, A., Hofmann, D., Münch, D., Gayathri, S., Künzler, M., Kallio, P. T., Sahl, H. G., Wider, G., Schneider, T., and Aebi, M. 2014. Copsin, a novel peptide-based fungal antibiotic interfering with the peptidoglycan synthesis. J. Biol. Chem. 289:34953–34964
- Faulkner, C. 2015. A cellular backline: Specialization of host membranes for defence. J. Exp. Bot. 66:1565–1571
- Faulkner, C. 2013. Receptor-mediated signaling at plasmodesmata. Front. Plant Sci. 4:521
- Gonzali, S., Loreti, E., Cardarelli, F., Novi, G., Parlanti, S., Pucciariello, C., Bassolino, L., Banti, V., Licausi, F., and Perata, P. 2015. Universal stress protein HRU1 mediates ROS homeostasis under anoxia. Nat. Plants. 1:15151
- Grefen, C., and Blatt, M. R. 2012. A 2in1 cloning system enables ratiometric bimolecular fluorescence complementation (rBiFC). Biotechniques. 53:311–14
- Guilhelmelli, F., Vilela, N., Albuquerque, P., Derengowski, L. da S., Silva-Pereira, I., and Kyaw, C. M. 2013. Antibiotic development challenges: The various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. Front. Microbiol. 4
- Horstman, A., Tonaco, I. A. N., Boutilier, K., and Immink, R. G. H. 2014. A Cautionary note on the use of split-YFP/BiFC in plant protein-protein interaction studies. Int. J. Mol. Sci. 15:9628–9643
- de Jonge, R., van Esse, H. P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M. H. a J., and Thomma, B. P. H. J. 2010. Conserved fungal LvsM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. Science. 329:953–955
- Kerppola, T. K. 2008. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. Annu Rev Biophys. 37:465–87
- Murphy, E., and De Smet, I. 2014. Understanding the RALF family: A tale of many species. Trends Plant Sci. 19:664–671
- Mygind, P. H., Fischer, R. L., Schnorr, K. M., Hansen, M. T., Sönksen, C. P., Ludvigsen, S., Raventós, D., Buskov, S., Christensen, B. B. E., De Maria, L., Taboureau, O., Yaver, D., Elvig-Jørgensen, S. G., Sørensen, M. V, Christensen, B. B. E., Kjaerulff, S., Frimodt-Moller, N., Lehrer, R. I., Zasloff, M., and Kristensen, H.-H. 2005. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. Nature. 437:975–80
- Oyelaran, O., and Gildersleeve, J. C. 2009. Glycan arrays: recent advances and future challenges. Curr. Opin. Chem. Biol. 13:406–413
- Palma, A. S., Liu, Y., Zhang, H., Zhang, Y., McCleary, B. V, Yu, G., Huang, Q., Guidolin, L. S., Ciocchini, A. E., Torosantucci, A., Wang, D., Luísa Carvalho, A., MGA Fontes, C.,

Mulloy, B., Childs, R. a, Feizi, T., and Chai, W. 2015. Unravelling glucan recognition systems by glycome microarrays using the "designer" approach and mass spectrometry. MCP Pap. Press. Publ.

- Petre, B., Hecker, A., Germain, H., Tsan, P., Sklenar, J., Pelletier, G., Séguin, A., Duplessis, S., and Rouhier, N. 2016. The Poplar Rust-Induced Secreted Protein (RISP) Inhibits the Growth of the Leaf Rust Pathogen Melampsora larici-populina and Triggers Cell Culture Alkalinisation. Front. Plant Sci. 7:1–15
- Plett, J. M., Daguerre, Y., Wittulsky, S., Vayssières, A., Deveau, A., Melton, S. J., Kohler, A., Morrell-Falvey, J. L., Brun, A., Veneault-Fourrey, C., and Martin, F. 2014. Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus Laccaria bicolor stabilizes the Populus JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111:8299–304
- Raffaele, S., Bayer, E., Lafarge, D., Cluzet, S., German Retana, S., Boubekeur, T., Leborgne-Castel, N., Carde, J.-P., Lherminier, J., Noirot, E., Satiat-Jeunemaître, B., Laroche-Traineau, J., Moreau, P., Ott, T., Maule, A. J., Reymond, P., Simon-Plas, F., Farmer, E. E., Bessoule, J.-J., and Mongrand, S. 2009. Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. Plant Cell. 21:1541–1555
- Snider, J., Kittanakom, S., Damjanovic, D., Curak, J., Wong, V., and Stagljar, I. 2010. Detecting interactions with membrane proteins using a membrane two-hybrid assay in yeast. Nat. Protoc. 5:1281–93
- Wang, Z., and Wang, G. 2004. APD: the Antimicrobial Peptide Database. Nucleic Acids Res. 32:D590–D592
- Wenzel, M., Chiriac, A. I., Otto, A., Zweytick, D., May, C., Schumacher, C., Gust, R., Albada, H. B., Penkova, M., Krämer, U., Erdmann, R., Metzler-Nolte, N., Straus, S. K., Bremer, E., Becher, D., Brötz-Oesterhelt, H., Sahl, H.-G., and Bandow, J. E. 2014. Small cationic antimicrobial peptides delocalize peripheral membrane proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111:E1409–18
- Zhou, X., Kini, R. M., and Sivaraman, J. 2011. Application of isothermal titration calorimetry and column chromatography for identification of biomolecular targets. Nat. Protoc. 6:158–165

Chapitre VI

Discussion générale et perspectives



Figure 19 : Bilan des informations obtenues sur les MiSSPs de *L. bicolor* au cours de cette thèse.

Mes travaux de thèse ont permis de réaliser une analyse comparative des sécrétomes de champignons possédant des modes de vie variés. Je me suis particulièrement intéressé aux petites protéines sécrétées (SSP) présentes dans ces sécrétomes. J'ai mis en évidence notamment (i) que certains champignons ectomycorhiziens partagent des SSPs fortement conservé avec les champignons saprotrophes (ii) des familles de SSPs partagées et spécifiques aux champignons ectomycorhiziens. Ces travaux démontrent les que champignons ectomycorhiziens possèdent des SSPs en commun avec leurs ancêtres saprotrophes et dont certaines ont potentiellement évolué pour se spécialiser dans la symbiose ectomycorhizienne, identifiant parmi ces SSPs des effecteurs de symbiose candidats, sous réserve que ces SSPs soient induits spécifiquement par la mycorhize et ciblent la plante (Pellegrin et al, 2015).

Je me suis ensuite intéressé à un jeu de 11 effecteurs candidats MiSSPs de L. bicolor, en déterminant leur localisation subcellulaire *in planta* afin d'évaluer leur capacité à cibler des compartiments subcellulaires de la cellule végétale de manière similaire aux effecteurs connus chez les agents pathogènes de plante. Cette étude a mise en évidence que trois MiSSPs sont capables d'être adressés dans des compartiments subcellulaires spécifiques de la cellule végétale, suggérant l'utilisation de ces MiSSPs par *L. bicolor* comme effecteur de symbiose.

Je me suis enfin focalisé sur l'étude de MiSSP8 requise pour l'établissement de la symbiose entre *L. bicolor* et *P. trichocarpa*. L'analyse cytologique des mutants *missp8* suggère que cette protéine puisse être impliqué dans l'agrégation des hyphes et que MiSSP8 ne serait pas un effecteur de symbiose. La séquence primaire de MiSSP8 contient un motif DWRR répété quatre fois. Ce motif est spécifique au règne fongique et présent majoritairement dans des protéines de champignons saprotrophes et ectomycorhiziens, suggérant qu'une petite protéine sécrétée, nécessaire à l'établissement de la symbiose, a pu évoluer à partir de SSPs présentes chez des champignons saprotrophes. J'ai ensuite cherché à identifier l'interactant de MiSSP8 en associant des approches de biologie moléculaire, de biochimie ou de biophysique.

Je propose ici une discussion plus globale sur le concept d'effecteur dans la symbiose ectomycorhizienne qui intègre les résultats acquis dans ces trois
parties. Je discute enfin de perspectives concernant l'analyse des MiSSPs de L. bicolor.

1. Les effecteurs: une stratégie de communication partagée par tous les champignons ?

1. Les effecteurs de symbiose : quelle origine ?

De récentes approches de génomique comparative (Köhler et al., 2015) ont permis de montrer que la symbiose ectomycorhizienne est apparue plusieurs fois au cours de l'évolution, confirmant des études phylogénétiques plus anciennes (Hibbett et al, 2000). Ces études montrent que la symbiose ectomycorhizienne a évolué à partir de champignons saprotrophes (Köhler et al., 2015). Les génomes de champignons ECM ont perdu certaines capacités de dégradation enzymatique de la lignocellulose tout en conservant des capacités de décompositions basées sur la réaction de Fenton (Köhler et al, 2015). L'analyse comparative des sécrétomes de champignons confirme que les sécrétomes de champignons ectomycorhiziens et saprotrophes sont très similaires au niveau de leur répertoire génétique de dégradation lipasiques et protéasiques (Pellegrin et al, 2015), confirmant la conservation de certains mécanismes de décomposition de la matière organique du sol hérités de leurs ancêtres saprotrophes (Shah et al, 2016).

Les génomes de champignons ectomycorhiziens ont acquis aussi des gènes spécifiques au style de vie ectomycorhizien (Köhler et al, 2015). Parmi ces gènes spécifiques de la lignée et surexprimées dans les tissus symbiotiques, une partie codent des MiSSPs (jusqu'à 16% chez *L. bicolor*), suggérant que chaque champignon ectomycorhizien possède son propre jeu d'effecteurs. Ceci est en accord avec la définition des effecteurs d'agent phytopathogènes typiquement espèces ou lignée-spécifiques et surexprimés lors de l'infection ou de la colonisation (pour revue Win et al., 2012 ; LoPresti et al., 2015). Toutefois, l'analyse comparative des sécrétomes fongiques réalisée au cours de ma thèse a mis en évidence à la fois des SSPs fortement conservées entre champignons ECM et saprotrophes mais aussi des SSPs uniquement partagées par des champignons ectomycorhiziens (Pellegrin et al, 2015). Ceci suggère que parmi les SSP de champignons ectomycorhiziens se trouvent des SSPs probablement impliquées dans des processus génériques liés à l'environnement, et non moins importants,

dans la biologie du champignon. Cette hypothèse est soutenue par la récente analyse de l'exoprotéome du champignon basidiomycète ectomycorhizien *Hebeloma cylindroporum* (Doré et al, 2015). Cette étude montre que 17% des protéines sécrétées par le mycélium sont des SSPs, situant les SSPs parmi les protéines les plus abondantes dans l'exoprotéome du mycélium d'*Hebeloma cylindrosporum* (Doré et al, 2015). Parmi ces SSPs les plus abondantes, cinq ont des homologues chez des champignons avec d'autre modes de vie (pathogènes, saprotrophes). De plus, les SSPs de cet exoprotéome de mycélium d'*H. cylindrosporum* peuvent être sur-régulées dans les ectomycorrhizes et présentent des patrons d'expressions différents entre des ECM développées *in vitro* et celles développées en serre (*i.e.* en présence de matière organique). Ces résultats indiquent que les gènes codants les SSPs répondent à des changements environnementaux en plus de signaux venant de la plante. La forte expression de MiSSP8 de *L. bicolor* dans les tissus symbiotiques et dans les carpophores soutient ces deux hypothèses.

Bien que les effecteurs d'agents phytopathogènes soient typiquement espèces ou lignées spécifiques, il existe des effecteurs conservés comme par exemple les protéines NLPs (necrosis and ethylene-inducing like proteins) identifiées chez les bactéries, champignons et oomycètes (de Jonge et al., 2011 ; Gizen & Nürnberger, 2006) et les effecteurs contenant un motif LysM (de Jonge & Thomma, 2009). Ces derniers sont retrouvés chez des champignons pathogènes, saprotrophes et ectomycorhiziens (Kombrink et Thomma, 2013; Martin, 2008 ; 2010). Les effecteurs fongiques de type LysM caractérisés ont tous la capacité à fixer la chitine et d'interférer avec l'immunité déclenchée par la détection de la chitine (Bolton et al., 2008 ; de Jonge et al., 2010 ; Marshall et al., 2011; Mentlak et al., 2012). Néanmoins, ceux de Mycosphaerella graminicola possèdent d'autres fonctions comme par exemple l'inhibition de chitinases végétales (Marshall et al., 2011). Ceci suggère que ces effecteurs conservés de microorganismes phytopathogènes se sont diversifiés fonctionnellement et ont subit une néofonctionnalisation indispensable pour la virulence. L'acquisition de nouvelles fonctions à également été rapportée chez les effecteurs AVRK1 et AVRK10 du champignon pathogène Blumeria graminis ayant évolué à partir de séquences de rétrotransposons de type LINE (Long Interspaced Nuclear Elements) (Amselem et al, 2015). Ainsi, la question de l'origine évolutive des effecteurs chez les champignons ectomycorhiziens (et plus spécifiquement *L. bicolor*) mérite d'être posée.

La forte divergence des séquences de SSPs des champignons mycorhiziens, à l'instar des effecteurs d'agent phytopathogènes, aboutit à de nombreuses SSPs espèces et lignées-spécifiques. Le motif répété DWRR présent dans la séquence protéique de l'effecteur de symbiose MiSSP8 de *L. bicolor* n'est quant à lui pas spécifique de *L. bicolor* et fait partie d'une famille de protéines essentiellement restreintes aux champignons ectomycorhiziens et saprotrophes. Cela suggère qu'il y aurait eu une néofonctionnalisation d'un motif protéique dans un mécanisme lié à la symbiose ectomycorhizienne à partir d'ancêtres saprotrophes. L'ubiquité des effecteurs LysM (i.e. la présence d'effecteurs de type LysM chez des champignons pathogènes et saprotrophes du sol) a conduit à proposer que les effecteurs LysM puissent être impliqués dans la protection des hyphes contre des compétiteurs (Kombrink et Thomma, 2013 ; Rovenich et al., 2014).

Ainsi, nous pouvons proposer que certaines SSPs de champignons mycorhiziens pourraient avoir évolué à partir d'ancêtres saprotrophes et pourraient médier non-seulement les interactions potentielles avec leur plante hôte (comme démontré pour MiSSP8) mais aussi des interactions avec leur environnement biotique et abiotique. Il reste néanmoins à démontrer que l'utilisation d'effecteurs est une caractéristique répandue parmi les champignons ectomycorhiziens et n'est pas spécifique à certaines espèces seulement.

Les MiSSPs sont-elles toutes des effecteurs de symbiose ?

La mise en évidence de l'effecteur MiSSP7 et son analyse fonctionnelle ont permis de démontrer qu'un champignon ectomycorhizien était capable via un effecteur d'interférer avec la voie de signalisation médiée par l'hormone acide jasmonique, à l'instar d'effecteurs de microorganismes phytopathogènes (Plett, Daguerre, Wittulsky et al, 2014). Les travaux de thèse de Yohan Daguerre ont aussi mis en évidence que l'atténuation de l'expression de gènes codant trois autres MiSSPs (MiSSP8, MiSSP13, MiSSP17) entrainait une baisse significative du taux de mycorhization. Par la suite, des effecteurs candidats MiSSPs (dont MiSSP8, MiSSP17 et MiSSP31) ont été mis en évidence comme faisant partie d'un « core régulon » exprimé indépendamment de l'hôte *(Populus trichocarpa,* un angiosperme et *Pseudotsuga menziesii,* un gymnosperme) et tout au long de la mise en place de la symbiose

ectomycorhizienne (Plett et al, 2015a). Ces données suggèrent qu'un jeu d'effecteurs de *L. bicolor* induits quelque soit l'hôte est probablement requis lors de l'ontogenèse de l'ectomycorhize. Les résultats de mes travaux de thèse sont cohérents avec cette hypothèse et indiquent que MiSSP31, MiSSP11.3 et MiSSP25.6 parviennent à cibler différents compartiments subcellulaires de la cellule végétale. On peut donc penser que la protéine MiSSP7 n'est pas utilisée de manière isolée par *L. bicolor* mais prend part, au côté d'autres effecteurs MiSSPs, à la modulation des réponses de l'hôte végétal.

Existe-t-il des effecteurs chez d'autres champignons ectomycorhiziens?

La présence de MiSSPs ayant soit une fonction effectrice démontrée (Plett et al, 2014) ou une localisation subcellulaire suggérant un rôle d'effecteur (Chapitre IV) chez L. bicolor pose la question du caractère répandu de cette stratégie au sein du style de vie ectomycorhizien. L'analyse du génome de Tuber melanosporum avait identifié un répertoire limité de MiSSPs similaire à celui de L. bicolor (Martin et al, 2010). Plus récemment, l'analyse du sécrétome et du transcriptome d'Hebeloma cylindrosporum met en lumière une vision contrastée de l'usage des petites protéines sécrétées par un champignon ectomycorhizien (cf paragraphe précédent). Des analyses transcriptomiques réalisées in situ chez des ectomycorhizes de Piloderma croceum avec Pinus taeda ont permis de mettre en évidence quatre MiSSPs (Liao et al, 2014) ayant une forte similarité de séquence avec les protéines BAS (Biotrophy associated protein) du champignon pathogène *Magnaporthe oryzae* (Mosquera et al. 2009). La détection de transcrits codant des protéines similaires aux effecteurs d'agents phytopathogènes dans des ECMs en conditions naturelles permet de soutenir l'hypothèse que certaines de ces MiSSPs sont des effecteurs de symbiose. Les travaux d'analyse comparative de sécrétomes que j'ai réalisé durant ma thèse mettent en évidence quatre clusters de SSPs partagées par plusieurs champignons ectomycorhizien phylogénétiquement proches et sans annotation (Pellegrin et al, 2015). Si ces protéines sont exprimées et régulées au cours de la symbiose, elles pourraient être des effecteurs potentiels communs à plusieurs champignons ectomycorhiziens. Un autre critère fort pour confirmer qu'une MiSSPs est un effecteur est la chute du taux de mycorhization induite par l'atténuation de l'expression du gène codant la MiSSPs. Cette démarche nécessite de maitriser la transformation du champignon ce qui n'est pas le cas pour la plupart des modèles de champignons ectomycorhiziens concernés. La transformation étant possible chez H. cylindrosporum, il serait intéressant d'évaluer dans le futur des effecteurs potentiels chez ce modèle.

2. De l'identification de candidats à la fonction biologique

L'analyse fonctionnelle des effecteurs est une approche en plusieurs étapes, allant de l'identification *in silico* de candidats à la mise en évidence de la fonction biologique. Bien que les bases de données disponibles aujourd'hui permettent l'identification de fonction putative pour une protéine inconnue, les effecteurs sont fortement divergents au niveau de leur séquence, n'autorisant pas d'inférence fonctionnelle par recherche d'homologie *in silico*. Cette diversité de fonctions n'empêchent pas des convergences fonctionnelles concernant les cibles des protéines effecteurs (Weßling et al, 2014 ; Muktar et al, 2011) entre effecteurs d'agents phytopathogènes ou effecteurs d'agents phytopathogènes et ectomycorhiziens (Plett et al., 2014).

Cette forte divergence de séquences se retrouve aussi chez le genre *Laccaria*, où seulement 30% des MiSSPs de *L. bicolor* sont retrouvés chez *Laccaria amethystina*, les deux espèces ayant divergé il y a seulement 20 Millions d'années (Köhler et al, 2015). L'approche fonctionnelle apparait donc nécessaire afin de caractériser les stratégies d'interactions utilisées par le symbionte vis-à-vis de son hôte. Il n'existe néanmoins pas de consensus quant à la démarche à mettre en œuvre pour avancer dans l'analyse des protéines effectrices (Alfano, 2009). Les premières recherches effectuées sur l'analyse des MiSSPs ont menées au démarrage de l'analyse fonctionnelle de plusieurs MiSSPs en parallèle (MiSSP7, MiSSP8, MiSSP13, MiSSP17, MiSSP22) par la recherche d'interactants protéiques via le double hybride en levure ainsi que la réalisation de plusieurs souches de *L. bicolor* à ARNi permettant de vérifier l'implication de ces différentes MiSSPs dans l'établissement de la symbiose. Cette démarche a permis la mise en évidence de l'interaction entre MiSSP7 et PtJAZ6 mais s'est révélée plus délicate à mener à bien dans le cas des autres MiSSPs, notamment MiSSP8.

1. Contraintes actuelles dans l'étude des MiSSPs chez L. bicolor

L'étude des MiSSPs est une thématique récente (Martin et al, 2008) en comparaison avec les recherches effectuées sur les protéines effectrices des agents phytopathogènes, démarrées dans les années 80 (Staskawicz et al, 1984 ; De Wit et al, 2009). Chez ces derniers, l'identification et l'analyse fonctionnelle des effecteurs ont été facilitées par le fait que les effecteurs appartiennent à des familles multigéniques, certains motifs conservés permettant la détection de candidats et l'utilisation de plante modèle facilite leur analyse fonctionnelle (Sperschneider et al, 2015). De plus, la possibilité de transformer le microorganisme offrent

des possibilités en terme de localisation et d'élucidation de la fonction (Saitoh et al, 2012 ; Khang et al, 2010). *L. bicolor* et *H. cylindrosporum* sont les deux champignons ectomycorhiziens pouvant être transformé (Kemppainnen et al, 2009 ; Marmeisse et al, 1992 ; Combier et al, 2003). La possibilité de transformer (Filatti et al, 1987) et d'éditer le génome du Peuplier est aujourd'hui disponible (Fan et al, 2015), augmentant les possibilités d'études des protéines de l'hôte ciblées par les effecteurs MiSSPs. L'acquisition de ces outils sera une étape importante dans l'analyse des protéines MiSSPs et de leurs cibles biologiques chez l'hôte.

L'effectoromique comme approche moyen débit pour l'analyse des effecteurs ?

Le choix des candidats effecteurs à analyser s'appuie sur un certain nombre de données préliminaires permettant de définir les candidats d'intérêts (expression induite spécifiquement en présence de l'hôte, sélection positive, présence de motifs conservés, homologie avec des effecteurs déjà caractérisés). La démarche d'effectoromique vise à proposer un processus standardisé dans le choix des candidats effecteurs (Oh et al, 2009 ; Caillaud et al, 2012 ; Petre et al, 2015a). Ce pipeline propose de rajouter la localisation subcellulaire in planta des candidats effecteurs à la sélection in silico des effecteurs candidats. La recherche systématique d'interactants protéiques par co-immunoprécipitation in planta de l'effecteur candidat suivi d'une identification par chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse (Co-IP/MS) est ensuite mise en oeuvre. L'application de ce pipeline permet l'obtention de données de localisation et d'une liste d'interactants potentiels (Caillaud et al, 2012 ; Petre et al, 2015a ; Petre et al, 2015b). De plus, la probabilité des interactants d'être spécifiques de l'effecteur candidat est estimée par une méthode de « scoring » (Miteva et al, 2013, Mellacheruvu et al, 2013). Cet ensemble d'information permet de valider la sélection in silico et d'identifier les effecteurs candidats les plus intéressants à étudier sur le plan fonctionnel. Néanmoins, cette stratégie de recherche possède aussi plusieurs limites. La première est que l'expression de chacun des effecteurs candidats sans leur signal peptide se base sur le postulat que (i) les effecteurs sont transférés dans les cellules végétales après sécrétion par les cellules fongiques et (ii) que les cibles des effecteurs étudiés sont cytoplasmiques. Ainsi, les effecteurs apoplastiques ne peuvent pas être identifiés. Or dans le cadre de la symbiose ectomycorhizienne, ces effecteurs peuvent être cruciaux. En effet, les champignons ectomycorhiziens colonisent l'espace apoplastique entre les cellules corticales et ne forment jamais de structure à l'intérieur des cellules végétales. Ainsi l'apoplaste est une zone privilégiée d'échanges lors de la symbiose ectomycorhizienne. Par ailleurs, ce sont pour les effecteurs fongiques apoplastiques que nous disposons aujourd'hui du plus d'information fonctionnelle (voir LoPresti et al, 2015 pour une revue), mettant en lumière l'importance de l'immunité végétale apoplastique (Doehlemann, 2013 ; Stotz et al., 2014).

La deuxième limite provient de l'utilisation d'un système hétérologue, impliquant que les cibles végétales de l'effecteur soient conservées avec celles de la plante hôte. Le pipeline d'effectoromique ne permet donc d'identifier que des effecteurs qualifiés de cytoplasmiques (en opposition avec les effecteurs apoplastiques) et dont les cibles sont conservées chez *N. benthamiana*. De plus ce pipeline considère les localisations des protéines fusions effecteurs::GFP nucléo-cytoplasmiques comme « non informative » alors que le trafic nucléocytoplasmique participe activement aux processus de signalisation des réactions de défenses (Wiermer et al, 2007). Cette approche permet donc de sélectionner des MiSSPs ciblant des organelles de cellules végétales et potentiellement capable d'interférer avec la physiologie de l'hôte en ciblant une protéine végétale conservée, ce qui est intéressant dans la recherche de MiSSPs modifiant la physiologie de l'hôte végétal d'une manière similaire aux effecteurs d'agents phytopathogènes. En revanche, il ne permet pas d'isoler des MiSSPs interagissant spécifiquement avec des protéines du Peuplier.

3. Perspectives dans l'analyse fonctionnelle des MiSSPs de L. bicolor

Les analyses fonctionnelles entreprises au cours de cette thèse ont permis de mettre en évidence plusieurs effecteurs candidats ayant une localisation subcellulaire spécifique *in planta* (Chapitre IV) mais aussi la difficulté à trouver un interactant à l'effecteur MiSSP8. La démarche mise en oeuvre dans le chapitre IV peut être utilisée de manière plus globale dans l'élaboration d'une stratégie d'analyse fonctionnelle des MiSSPs de *L. bicolor* (Figure 21).

1. Multiples nuances de MiSSPs

Sur la base des résultats obtenus, au moins trois catégories de MiSSPs peuvent être envisagées (Figure 20). La première contient les MiSSPs à localisation intracellulaire, dont les partenaires d'interactions sont protéiques et potentiellement impliqués dans la régulation des réactions de défenses et des processus de différenciation cellulaire. Cette catégorie contient à l'heure actuelle MiSSP7 interagissant avec la protéine PtJAZ6 impliquée dans la régulation de la voie de l'acide jasmonique. On peut aussi y inclure MiSSP31 dont la localisation dans le nucléole suggère un rôle dans la régulation génique. L'association de la localisation subcellulaire et la recherche d'interactant protéique peut potentiellement mettre en évidence d'autres effecteurs candidats liés à la modulation de la physiologie de l'hôte.

La seconde catégorie contient les MiSSPs à localisation extracellulaire, interagissant avec des interactants protéiques ou non protéiques. Ces MiSSPs peuvent jouer un rôle à la fois au niveau des réactions de défenses, en séquestrant des polysaccharides fongiques ou végétaux, mais aussi dans le remodelage des parois végétales nécessaire à la construction de l'interface symbiotique. MiSSP8 peut d'insérer dans cette catégorie car, bien que son interactant n'ait pas été encore identifié, sa localisation en peuplier et en tabacs laisse penser que MiSSP8 est actif dans la zone située entre la membrane plasmique et la paroi végétale. Dans le cas où son interactant se révélerait être de nature non protéique, l'utilisation d'une approche telle que le fractionnement cellulaire associé à des outils de détection biophysique pourrait aboutir l'identification de l'interactant (Zhou et al, 2011).



Figure 20 : Localisations potentielles des MiSSPs de *L. bicolor*. Les MiSSPs de *L. bicolor* peuvent contenir des effecteurs cytoplasmiques tel MiSSP7 ou MiSSP31, ciblant un compartiment subcellulaire précis (tel le nucléole ou le noyau), ou être restreinte au cytoplasme tel MiSSP12.6 et MiSSP25.3. D'autres MiSSPs peuvent être des effecteurs apoplastiques, agissant soit dans la zone entre la membrane plasmique et la paroi végétale comme MiSSP8, ou dans l'espace intercellulaire comme la protéine GH5.



Figure 21 : **Perspectives dans l'analyse des MiSSPs**. Proposition de stratégie d'analyse fonctionnelle des MiSSPs de *L. bicolor*. Le schéma intègre les différents compartiments subcellulaires cibles potentiels des MiSSPs et propose des approches pour déterminer l'interactant etudié.

La dernière catégorie de MiSSPs constitue les MiSSPs sécrétés par *L. bicolor* au niveau de l'espace intercellulaire et ayant un rôle à jouer dans le remodelage des parois végétales. Cette catégorie de MiSSPs est suspectée d'être nécessaire à la progression de l'hyphe du champignon dans la racine par l'intermédiaire d'une action enzymatique. Dans cette hypothèse, une enzyme de type glycoside hydrolase à localisation apoplastique possédant un domaine GH5 (Glycoside hydrolase 5) est en cours de caractérisation au laboratoire. La mise en oeuvre de ces trois catégories de MiSSPs parait nécessaire pour mettre en place une interface symbiotique fonctionnelle entre la plante et le symbionte.

Certaines MiSSPs peuvent aussi ne pas avoir d'impact sur l'établissement de la symbiose mais sur son fonctionnement, soit la mise en place d'un échange bidirectionnel de nutriments entre le champignon et l'hôte. Ce pourrait être le cas de MiSSP22, dont l'atténuation de l'expression par ARNi n'entraine pas de perte de capacité à mycorhizer chez *L. bicolor* (Daguerre, 2014). Chez les agents phytopathogènes, des transporteurs de sucrose de type SWEET de l'hôte sont utiliser (notamment via des effecteurs de type TALE, Cohn et al, 2014) de manière à rediriger les ressources de l'hôte végétal vers le microorganisme (Chen et al, 2010; Chen et al, 2012). Cette stratégie peut être envisagé dans le cadre de la symbiose ECM compte tenu du flux de carbone venant de la plante hôte en direction du symbiote (Nehls et al, 2007).

2. Quelles MiSSPs analyser à court terme ?

Le choix des MiSSPs peut dans un premier temps se focaliser sur les MiSSP31, MiSSP12.6 et MiSSP25.3 (Chapitre IV). Ces MiSSPs correspondent à des effecteurs candidats potentiellement impliqués dans la régulation des réponses de défenses ou des processus de croissance/différenciation cellulaire de part leur localisation spécifique dans la cellule végétale et leur induction par les mycorhizes *P. trichocarpa/L. bicolor* et *P. menziesii / L. bicolor*. La mise au point de l'expression en racines chevelues de Peuplier associée à la coimmunoprécipitation *in planta* peut améliorer l'identification d'interactant spécifique, la MiSSP se trouvant dans l'organe hôte en présence des protéines hôtes. Ce crible peut aboutir à l'identification de nouvelles MiSSPs ciblant la physiologie de la plante hôte. L'atténuation de l'expression du candidat effecteur MiSSP31 mise en évidence dans cette thèse permettra de vérifier son impact sur la symbiose.

3. Vers une approche intégrative dans l'analyse des MiSSPs ?

Les différentes catégories de MiSSPs énoncées incitent à développer une stratégie d'analyse plus globale des MiSSPs (Figure 21). La démarche proposée s'inspire du pipeline d'effectoromique et est adapté de manière à fournir un crible efficace des différents MiSSPs en tant qu'effecteur cytoplasmique ou apoplastique (Figure 20). L'utilisation de racine de Peuplier au lieu d'un système hétérologue parait plus pertinent car permettant de travailler sur des effecteurs exprimés dans la plante hôte et l'organe hôte. L'utilisation d'un système hétérologue peut néanmoins être conservé à des fins de criblage, les effecteurs identifiés de cette manière étant potentiellement des effecteurs interagissant avec des interactants conservés entre le Peuplier et le tabacs.

Bien que la recherche d'interactant non protéique se révèle plus délicate à mettre en oeuvre, elle reste néanmoins pertinente dans le cadre de l'étude des effecteurs apoplastiques, notamment ceux susceptibles d'interagir avec les parois végétales ou les microdomaines membranaires. Une limite à cette démarche est notamment que l'étude d'effecteurs candidats présents dans l'apoplaste repose sur le postulat que le signal peptide fongique est correctement reconnu par les cellules végétales. La mise au point d'un test permettant de vérifier la fonctionnalité du signal peptide des effecteurs fongiques dans les cellules de plantes serait utile pour valider la démarche proposée. L'ensemble de ces approches permettra d'obtenir une vue plus globale concernant l'implication des MiSSPs dans la modulation des réponses de l'hôte, leurs fonctions biologiques, les similarités ou différences existant entre les MiSSPs et les effecteurs d'agents phytopathogènes et, plus généralement, le fonctionnement à l'échelle moléculaire de la symbiose ectomycorhizienne.

References

- Alfano, J. R. 2009. Roadmap for future research on plant pathogen effectors: Micro-Review. Molecular Plant Pathology. 10:805–813
- Amselem, J., Lebrun, M.-H., and Quesneville, H. 2015. Whole genome comparative analysis of transposable elements provides new insight into mechanisms of their inactivation in fungal genomes. BMC genomics. 16:141
- Bolton, M. D., Van Esse, H. P., Vossen, J. H., De Jonge, R., Stergiopoulos, I., Stulemeijer, I. J. E., Van Den Berg, G. C. M., Borrás-Hidalgo, O., Dekker, H. L., De Koster, C. G., De Wit, P. J. G. M., Joosten, M. H. A. J., and Thomma, B. P. H. J. 2008. The novel Cladosporium fulvum lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. Molecular Microbiology. 69:119–136
- Caillaud, M. C., Piquerez, S. J. M., Fabro, G., Steinbrenner, J., Ishaque, N., Beynon, J., and Jones, J. D. G. 2012. Subcellular localization of the Hpa RxLR effector repertoire identifies a tonoplast-associated protein HaRxL17 that confers enhanced plant susceptibility. Plant Journal. 69:252–265
- Combier, J.-P., Melayah, D., Raffier, C., Gay, G., and Marmeisse, R. 2003. Agrobacterium tumefaciens -mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus Hebeloma cylindrosporum. FEMS Microbiology Letters. 220:141–148
- Cseke, L. J., Cseke, S. B., and Podila, G. K. 2007. High efficiency poplar transformation. Plant Cell Reports. 26:1529– 1538
- Doehlemann, G., and Hemetsberger, C. 2013. *Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens.*
- Dong, S., Raffaele, S., and Kamoun, S. 2015. The two-speed genomes of filamentous pathogens: Waltz with plants. Current Opinion in Genetics and Development. 35:57–65
- Doré, J., Perraud, M., Dieryckx, C., Kohler, A., Morin, E., Henrissat, B., Lindquist, E., Zimmermann, S. D., Girard, V., Kuo, A., Grigoriev, I. V., Martin, F., Marmeisse, R., and Gay, G. 2015. Comparative genomics , proteomics and transcriptomics give new insight into the exoproteome of the basidiomycete Hebeloma cylindrosporum and its involvement in ectomycorrhizal symbiosis. New Phytologist.
- Duplessis, S., Hacquard, S., Delaruelle, C., Tisserant, E., Frey, P., Martin, F., and Kohler, A. 2011. Melampsora laricipopulina transcript profiling during germination and timecourse infection of poplar leaves reveals dynamic expression patterns associated with virulence and biotrophy. Mol. Plant. Microbe. Interact. 24:808–818
- Fan, D., Liu, T., Li, C., Jiao, B., Li, S., Hou, Y., and Luo, K. 2015. Efficient CRISPR/Cas9-mediated Targeted Mutagenesis in Populus in the First Generation. Scientific reports. 5:12217
- Fillatti, J. J., Sellmer, J., McCown, B., Haissig, B., and Comai, L. 1987. Agrobacterium mediated transformation and regeneration of Populus. MGG Molecular & General Genetics. 206:192–199
- Friesen, T. L., Zhang, Z., Solomon, P. S., Oliver, R. P., and Faris, J. D. 2007. Characterization of the Interaction of a Novel Stagonospora nodorum Host-Selective Toxin with a Wheat Susceptibility Gene. Plant Physiology. 146:682–693
- Gijzen, M., and Nurnberger, T. 2006. Nep1-like proteins from plant pathogens: Recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. Phytochemistry. 67:1800–1807
- Han, X., Ma, S., Kong, X., Takano, T., and Liu, S. 2013. Efficient Agrobacterium-mediated transformation of hybrid poplar Populus davidiana Dode ?? Populus bollena lauche. International Journal of Molecular Sciences. 14:2515–2528
- Hibbett, D. S., Gilbert, L. B., and Donoghue, M. J. 2000. Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. Nature. 407:506-8
- Jonge, D. 2013. Genomic and transcriptomic insights into lifestyle transitions of a hemibiotrophic fungal pathogen. New Phytologist. 197:1032–1034
- de Jonge, R. 2010. Conserved Fungal LysM Effector Ecp6 Prevents Chitin-Triggered Immunity in Plants. Science (New York, N.Y.). 329:1085–8
- de Jonge, R., Bolton, M. D., and Thomma, B. P. H. J. 2011. How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. Current opinion in plant biology. 14:400–6
- de Jonge, R., and Thomma, B. P. H. J. 2009. Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? Trends in microbiology. 17:151–7
- guk Kang, B., Osburn, L., Kopsell, D., Tuskan, G. A., and Cheng, Z. M. 2009. Micropropagation of Populus trichocarpa "Nisqually-1": The genotype deriving the Populus reference genome. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 99:251–257
- Kemppainen, M. J., and Pardo, A. G. 2010. Gene knockdown by ihpRNA-triggering in the ectomycorrhizal basidiomycete fungus Laccaria bicolor. Bioengineered bugs. 1:354–8
- Kemppainen, M. J., and Pardo, A. G. 2009. pHg / pSILBAg vector system for efficient gene silencing in homobasidiomycetes : optimization of ihpRNA triggering in the mycorrhizal fungus Laccaria bicolor.

- Khang, C. H., Berruyer, R., Giraldo, M. C., Kankanala, P., Park, S.-Y., Czymmek, K., Kang, S., and Valent, B. 2010. Translocation of Magnaporthe oryzae effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell movement. The Plant cell. 22:1388–403
- Kleemann, J., Rincon-Rivera, L. J., Takahara, H., Neumann, U., Ver Loren van Themaat, E., van Themaat, E. V. L., van der Does, H. C., Hacquard, S., Stüber, K., Will, I., Schmalenbach, W., Schmelzer, E., and O'Connell, R. J. 2012. Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen Colletotrichum higginsianum. PLoS pathogens. 8:e1002643
- Kohler, A., Kuo, A., Nagy, L. G., Morin, E., Barry, K. W., Buscot, F., Canbäck, B., Choi, C., Cichocki, N., Clum, A., Colpaert, J., Copeland, A., Costa, M. D., Doré, J., Floudas, D., Gay, G., Girlanda, M., Henrissat, B., Herrmann, S., Hess, J., Högberg, N., Johansson, T., Khouja, H., Labutti, K., Lahrmann, U., Levasseur, A., Lindquist, E. a, Lipzen, A., Marmeisse, R., Martino, E., Murat, C., Ngan, C. Y., Nehls, U., Plett, J. M., Pringle, A., Ohm, R. a, Perotto, S., Peter, M., Riley, R., Rineau, F., Ruytinx, J., Salamov, A., Shah, F., Sun, H., Tarkka, M., Tritt, A., Veneault-fourrey, C., Zuccaro, A., Genomics, M., Consortium, I., and Tunlid, A. 2015. Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. Nature genetics. 47:410–415
- Kombrink, A., and Thomma, B. P. H. J. 2013. LysM Effectors: Secreted Proteins Supporting Fungal Life. PLoS Pathogens. 9:1–4
- Liao, H.-L., Chen, Y., Bruns, T. D., Peay, K. G., Taylor, J. W., Branco, S., Talbot, J. M., and Vilgalys, R. 2014. Metatranscriptomic analysis of ectomycorrhizal roots reveals genes associated with Piloderma-Pinus symbiosis: improved methodologies for assessing gene expression in situ. Environmental Microbiology. 16:3730–3742
- Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., Zuccaro, A., Reissmann, S., and Kahmann, R. 2015. Fungal Effectors and Plant Susceptibility. Annual Review of Plant Biology. 66:513–545
- Mao, Y., Zhang, H., Xu, N., Zhang, B., Gou, F., and Zhu, J. K. 2013. Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants. Molecular Plant. 6:2008–2011
- Marmeisse, R., Gay, G., Debaud, J. C., and Casselton, L. A. 1992. Genetic transformation of the symbiotic basidiomycete fungus Hebeloma cylindrosporum. Current genetics. 22:41–45
- Marshall, R., Kombrink, A., Motteram, J., Loza-Reyes, E., Lucas, J., Hammond-Kosack, K. E., Thomma, B. P. H. J., and Rudd, J. J. 2011. Analysis of two in planta expressed LysM effector homologs from the fungus Mycosphaerella graminicola reveals novel functional properties and varying contributions to virulence on wheat. Plant physiology. 156:756–69
- Martin, F., Aerts, A., Ahren, D., and Brun, A. 2008. The genome of Laccaria bicolor provides insights into mycorrhizal symbiosis. Nature. 452:88–93
- Martin, F., Kohler, A., Murat, C., Balestrini, R., Coutinho, P. M., Jaillon, O., Montanini, B., Morin, E., Noel, B., Percudani, R., Porcel, B., Rubini, A., Amicucci, A., Amselem, J., Anthouard, V., Arcioni, S., Artiguenave, F., Aury, J.-M., Ballario, P., Bolchi, A., Brenna, A., Brun, A., Buée, M., Cantarel, B., Chevalier, G., Couloux, A., Da Silva, C., Denoeud, F., Duplessis, S., Ghignone, S., Hilselberger, B., Iotti, M., Marçais, B., Mello, A., Miranda, M., Pacioni, G., Quesneville, H., Riccioni, C., Ruotolo, R., Splivallo, R., Stocchi, V., Tisserant, E., Viscomi, A. R., Zambonelli, A., Zampieri, E., Henrissat, B., Lebrun, M.-H., Paolocci, F., Bonfante, P., Ottonello, S., and Wincker, P. 2010a. Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. Nature. 464:1033–8
- Martin, F., Kohler, A., Murat, C., Balestrini, R., Coutinho, P. M., Jaillon, O., Montanini, B., Morin, E., Noel, B., Percudani, R., Porcel, B., Rubini, A., Amicucci, A., Amselem, J., Anthouard, V., Arcioni, S., Artiguenave, F., Aury, J.-M. M., Ballario, P., Bolchi, A., Brenna, A., Brun, A., Buée, M., Cantarel, B., Chevalier, G., Couloux, A., Da Silva, C., Denoeud, F., Duplessis, S., Ghignone, S., Hilselberger, B., Iotti, M., Marçais, B., Mello, A., Miranda, M., Pacioni, G., Quesneville, H., Riccioni, C., Ruotolo, R., Splivallo, R., Stocchi, V., Tisserant, E., Viscomi, A. R., Zambonelli, A., Zampieri, E., Henrissat, B., Lebrun, M.-H. H., Paolocci, F., Bonfante, P., Ottonello, S., and Wincker, P. 2010b. Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. Nature. 464:1033–1038
- Mellacheruvu, D., Wright, Z., Couzens, A. L., Lambert, J., St-denis, N., Li, T., Miteva, Y. V., Hauri, S., Sardiu, M. E., Yew, T., Halim, V. A., Bagshaw, R. D., Hubner, N. C., Bouchard, A., Faubert, D., Fermin, D., Dunham, W. H., Heck, A. J. R., Choi, H., and Gstaiger, M. 2014. The CRAPome: a Contaminant Repository for Affinity Purification Mass Spectrometry Data. 10:730–736
- Mentlak, T., Kombrink, A., and Shinya, T. 2012. Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by Magnaporthe oryzae is necessary for rice blast disease. The Plant Cell \ldots. :1-15
- Miteva, Y. V., Budayeva, H., and Ileana, C. 2008. Proteomics-based methods for discovery, quantification, and validation of protein-protein interactions. Analytical chemistry. 141:520–529
- Mosquera, G., Giraldo, M. C., Khang, C. H., Coughlan, S., and Valent, B. 2009. Interaction transcriptome analysis identifies Magnaporthe oryzae BAS1-4 as Biotrophy-associated secreted proteins in rice blast disease. The Plant cell. 21:1273–1290

- Mukhtar, M. S., Carvunis, A., Dreze, M., Epple, P., Steinbrenner, J., Moore, J., Tasan, M., Galli, M., Hao, T., Nishimura, M. T., Pevzner, S. J., Donovan, S. E., Ghamsari, L., Santhanam, B., Romero, V., Poulin, M. M., Gebreab, F., Gutierrez, B. J., Tam, S., Monachello, D., Boxem, M., Harbort, C. J., Mcdonald, N., Gai, L., Chen, H., He, Y., Union, E., Consortium, E., Vandenhaute, J., Roth, F. P., Hill, D. E., Ecker, J. R., Vidal, M., and Beynon, J. 2011a. Independently Evolved Virulence Effectors Converge onto Hubs in a Plant Immune System Network. Science. 333:596–601
- Mukhtar, M. S., Carvunis, A.-R., Dreze, M., Epple, P., Steinbrenner, J., Moore, J., Tasan, M., Galli, M., Hao, T., Nishimura, M. T., Pevzner, S. J., Donovan, S. E., Ghamsari, L., Santhanam, B., Romero, V., Poulin, M. M., Gebreab, F., Gutierrez, B. J., Tam, S., Monachello, D., Boxem, M., Harbort, C. J., McDonald, N., Gai, L., Chen, H., He, Y., Vandenhaute, J., Roth, F. P., Hill, D. E., Ecker, J. R., Vidal, M., Beynon, J., Braun, P., and Dangl, J. L. 2011b. Independently evolved virulence effectors converge onto hubs in a plant immune system network. Science (New York, N.Y.). 333:596–601
- Oh, S.-K., Young, C., Lee, M., Oliva, R., Bozkurt, T. O., Cano, L. M., Win, J., Bos, J. I. B., Liu, H.-Y., van Damme, M., Morgan, W., Choi, D., Van der Vossen, E. a G., Vleeshouwers, V. G. a a, and Kamoun, S. 2009. In planta expression screens of Phytophthora infestans RXLR effectors reveal diverse phenotypes, including activation of the Solanum bulbocastanum disease resistance protein Rpi-blb2. The Plant cell. 21:2928–2947
- Pellegrin, C., Morin, E., Martin, F. M., and Veneault-Fourrey, C. 2015. Comparative analysis of secretomes from ectomycorrhizal fungi with an emphasis on small-secreted proteins.
- Petre, B., Saunders, D. G. O., and Sklenar, J. 2015a. Candidate Effector Proteins of the Rust Pathogen Melampsora larici-populina Target Diverse Plant Cell Compartments. Molecular Plant-Microbe Interactions. 28:689–700
- Petre, B., Saunders, D. G. O., Sklenar, J., Lorrain, C., Krasileva, K. V., Win, J., Duplessis, S., and Kamoun, S. 2015b. In planta expression screens of candidate effector proteins from the wheat yellow rust fungus reveal processing bodies as a pathogen-targeted plant cell compartment. bioRxiv.
- Plett, J. M., Daguerre, Y., Wittulsky, S., Vayssières, A., Deveau, A., Melton, S. J., Kohler, A., Morrell-Falvey, J. L., Brun, A., Veneault-Fourrey, C., and Martin, F. 2014a. Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus Laccaria bicolor stabilizes the Populus JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 111:8299–304
- Plett, J. M., Kemppainen, M., Kale, S. D., Kohler, A., Legué, V., Brun, A., Tyler, B. M., Pardo, A. G., and Martin, F. 2011. A secreted effector protein of Laccaria bicolor is required for symbiosis development. Current biology : {CB}. 21:1197–1203
- Plett, J. M., Tisserant, E., Brun, A., Morin, E., Grigoriev, I. V., Kuo, A., Martin, F. M., and Kohler, A. 2014b. The mutualist Laccaria bicolor expresses a core gene regulon during the colonization of diverse host plants and a variable regulon to counteract host-specific defenses. Molecular plant-microbe interactions : {MPMI}. 28:261– 273
- Rovenich, H., Boshoven, J. C., and Thomma, B. P. 2014. Filamentous pathogen effector functions: of pathogens, hosts and microbiomes. Current opinion in plant biology. 20C:96–103
- Saitoh, H., Fujisawa, S., Mitsuoka, C., Ito, A., Hirabuchi, A., Ikeda, K., Irieda, H., Yoshino, K., Yoshida, K., Matsumura, H., Tosa, Y., Win, J., Kamoun, S., Takano, Y., and Terauchi, R. 2012. Large-scale gene disruption in Magnaporthe oryzae identifies MC69, a secreted protein required for infection by monocot and dicot fungal pathogens. PLoS Pathogens. 8
- Shah, F., Nicolàs, C., Bentzer, J., Ellstr, M., Floudas, D., Carleer, R., Lackner, G., Braesel, J., Hoffmeister, D., Henrissat, B., Johansson, T., Hibbett, D. S., Martin, F., Persson, P., and Tunlid, A. 2016. Ectomycorrhizal fungi decompose soil organic matter using oxidative mechanisms adapted from saprotrophic ancestors. New Phytologist. 209:1705–1719
- Sperschneider, J., Dodds, P. N., Gardiner, D. M., Manners, J. M., Singh, K. B., and Taylor, J. M. 2015. Advances and Challenges in Computational Prediction of Effectors from Plant Pathogenic Fungi. PLOS Pathogens. 11:e1004806
- Stergiopoulos, I., and de Wit, P. J. G. M. 2009. Fungal effector proteins. Annual review of phytopathology. 47:233-63
- Stotz, H. U., Mitrousia, G. K., de Wit, P. J. G. M., and Fitt, B. D. L. 2014. Effector-triggered defence against apoplastic fungal pathogens. Trends in Plant Science. :1–10
- Veneault-Fourrey, C., Barooah, M., Egan, M., Wakley, G., and Talbot, N. J. 2006. Autophagic fungal cell death is necessary for infection by the rice blast fungus. Science (New York, N.Y.). 312:580–583
- Victor, B., Strauss, S., and Gilles, P. 2010. Transformation as a Tool for Genetic Analysis in Populus. Genetics. :349–368
- We\s sling, R., Epple, P., and Altmann, S. 2014. Convergent targeting of a common host protein-network by pathogen effectors from three kingdoms of life. Cell Host & Microbe. 16:364–375
- Wiermer, M., Palma, K., Zhang, Y., and Li, X. 2007. Should I stay or should I go? Nucleocytoplasmic trafficking in plant innate immunity. Cellular Microbiology. 9:1880–1890
- Win, J., and Chaparro-Garcia, A. 2012. Effector Biology of Plant Associated Organisms : Concepts and Perspectives. \ldots quantitative biology. :235–247

- Xu, H., Kemppainen, M., El Kayal, W., Lee, S. H., Pardo, A. G., Cooke, J. E. K., and Zwiazek, J. J. 2015. Overexpression of Laccaria bicolor aquaporin JQ585595 alters root water transport properties in ectomycorrhizal white spruce (Picea glauca) seedlings. New Phytologist. 205:757–770
- Zhou, X., Kini, R. M., and Sivaraman, J. 2011. Application of isothermal titration calorimetry and column chromatography for identification of biomolecular targets. Nature protocols. 6:158–165

Annexe

Liste des annexes :

Annexe 1 : Wittulsky S, <u>Pellegrin C</u>, Giannakopoulou A, Böni R. 2015. A snapshot of molecular plant-microbe interaction research. *New Phytologist* 205: 468–71. Acte du congrès IS-MPMI XVI, Rhodes, Grèce paru dans la revue New Phytologist.

Annexe 2 : Localisation subcellulaire *in planta* de MiSSP8 sous forme mature (*i.e.*, sans signal peptide).

Annexe 3 : Bilan des activités (communications orales, posters, formations)

Annexe 4 : Validation du système de rBiFC

Annexe 5 : Western Blot rBiFC

Annexe 6 : Recherche d'interactants lipidiques par puces à lipides

Fiche technique 1 : Production et purification de protéine recombinante en Escherichia coli via le système inductible et auto processif de l'étiquette protéase CPD.

Fiche technique 2 : Vérification d'interaction protéine-protéine par complémentation bi-moléculaire de fluorescence (BiFC)

Fiche technique 3 : Recherche d'interactions protéines-sucres par titration calorimétrique isotherme

Fiche technique 4 : Recherche d'interactions protéines-lipides par puces à lipides.





Annexe 1

Meetings

A snapshot of molecular plantmicrobe interaction research

XVI International Congress on Molecular Plant– Microbe Interactions, Rhodes, Greece, July 2014

Plants and microbes are in a continuous arms race to maintain their predominance within their particular niche. Understanding the complexity of these plant-microbe interactions is of utmost importance as it can provide new insights into the mechanisms mediating disease processes and in turn inspire new plant breeding strategies. The International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions (IS-MPMI) invited scientists from around the world to share their findings during the XVI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, which was held on the beautiful island of Rhodes in Greece (Fig. 1). The congress was organized by the Agricultural University of Athens, the Hellenic Phytopathology Society, and the Hellenic Society of Phytiatry and provided over 1100 participants from 55 countries with the opportunity to present and discuss their current and future research. A great number of talks and posters were presented, however our aim within this report is to provide a snapshot of the discipline by focusing on just some of the exciting research and discussions which took place. The key topics discussed were virulence factors, epigenetic regulation, hormones, symbiosis factors, toxins, signaling pathways, microbe recognition, immunity, and pathogen diagnostics. Effector biology was also a recurrent theme in many plenary and concurrent sessions, indicating the importance of a topic that was also highlighted recently by a Virtual Special Issue in New Phytologist (see Kuhn & Panstruga, 2014). In addition to this, throughout the meeting next generation sequencing (NGS) techniques were described and shown to be shedding new light on long-standing issues in microbial ecology.

"... several plant viruses have the potential to infect and replicate in Collectrichum or Phytophthora species."

Rethinking the plant microbiome

The microbiome, defined as the community of microbes associated with and living in plant tissues, is now under intensive investigation to improve our understanding of its well-known strong effects on plant development, health and resistance to parasites. NGS methods are being applied by different research groups to help understand how the microbiome is colonizing the rhizosphere, the phyllosphere and the root and leaf intercellular compartment, that is, the endosphere. Soil microbial diversity has often been considered to be critical to the integrity, function and long-term sustainability of soil ecosystems and plants, and it has been shown that plants are the main factor responsible for determining soil microbial community structure (Broughton & Gross, 2000; Smalla et al., 2001). However, a series of large-scale NGS-based projects are providing a new perspective to the field by deciphering the mechanisms regulating the spatial and temporal dynamics of microbial communities in planta (e.g. Links et al., 2014). Accordingly, microbiome screening results of wild-type Arabidopsis thaliana plants were described by Jeffrey Dangl (Carolina Center for Genome Sciences, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA) and Paul Schulze-Lefert, Stephane Hacquard, and Yang Bai (Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Köln, Germany; e.g. Lundberg et al., 2012; Bulgarelli et al., 2012; Schlaeppi et al., 2013). The main goal of this research is to identify microbes that help plants by improving growth, resistance to drought, and the ability to fend off pests and diseases for agricultural applications. Comparable analyses were performed by Gerald Tuskan's team (Oak Ridge National Laboratory, TN, USA) using poplar as a model (Shakya et al., 2013).

Thinking outside the effector's box

Exciting new findings on several microbial effectors were discussed in a number of different sessions. HopAO1 from Pseudomonas syringae has the potential to block the signaling activity of pattern recognition receptors (PRR) by targeting the downstream tyrosine phosphorylation mechanism (Macho et al., 2014). Further, P. syringae effector HopX1 promotes activation of jasmonate signaling by targeting JAZ proteins to facilitate infection (Gimenez-Ibanez et al., 2014). This conference also provided an opportunity for researchers to broaden their understanding of the new models and concepts in this field (Doehlemann & Hemetsberger, 2013; Doehlemann & Requena, 2014). For example, Timothy Friesen (USDA-AR, Bismarck, ND, USA) talked about the Stagonospora nodorum-wheat pathosystem and the SnTox1 effector, a 117 amino acid cysteine-rich protein interacting with the wheat sensitivity/susceptibility protein Snn1. This lightdependent interaction triggers classical defense responses (e.g. oxidative burst, up-regulation of pathogenesis-related proteins) but, interestingly, the recognition of SnTox1 by Snn1 led to susceptibility rather than resistance. They finally showed that this effector is involved in protection against host chitinases (Liu et al., 2012). Natalia Requena (Karlsruhe Institute of Technology, Germany) reported some recent advances on the mechanisms

driving the early steps of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Natalia Requena's team first identified and analyzed a 7 kDa small secreted protein, named SP7 (Secreted Protein 7), required for arbuscular mycorrhiza symbiosis (Kloppholz et al., 2011) which interacts with the pathogenesis-related transcription factor ERF19. Thanks to the recently released Rhizophagus irregularis genome (Tisserant et al., 2013), her group has now identified several other effector candidates, some of which share similarities with Crinkler's effectors, such as the ability to induce cell-death on infiltrated leaves. Francis Martin (INRA, Nancy, France) described the most recent results obtained on the mycorrhiza-induced small secreted protein MiSSP7, secreted by the ectomycorrhizal fungus Laccaria bicolor. MiSSP7 was found to enter host cells and to localize to the nucleus where it altered host cell transcription. MiSSP7 interacts with the transcriptional repressor protein PtJAZ6 in the nuclei of the host plant Populus trichocarpa, where it protects PtJAZ6 from JA-induced degradation (Plett et al., 2014). Furthermore, MiSSP7 is able to counter the negative impacts of JA on fungal colonization of host tissues by repression of JA-induced gene transcription, likely through its interaction with JAZ proteins. These results on the arbuscular and ectomycorrhizal symbioses further the concept that, like pathogenic organisms, mutualistic fungi use effectors to target plant host hormone pathways to foster fungal colonization. Another highlight regarding ectomycorrhizal symbiosis was again the work of Gerald Tuskan's team (Oak Ridge National Laboratory). Using genomics techniques they identified a single gene of poplar (encoding a manno-protein receptor) which functions as a determinant between mycorrhizal and nonmycorrhizal lifestyle/ behavior. Moreover, transformation of A. thaliana with the respective poplar gene was sufficient to induce a Hartig net-like structure in this nonectomycorrhizal plant.

The IS-MPMI meeting was also a perfect platform to share new results on effectors from unusual models. Saskia Hogenhout (John Innes Centre, Norwich, UK) presented research on the SAP54 effector secreted by the insect transmitted bacteria Phytoplasma (Weintraub & Beanland, 2006; Hogenhout et al., 2008). Her team demonstrated that the SAP54 effector destabilizes MADS domain transcription factors (MTF) through interaction with RAD23C and RAD23D proteins in A. thaliana. The effects are the formation of leaf-like flowers and increased attractiveness to the Phytoplasma vector, a leafhopper. Markus Albert (Centre for Plant Molecular Biology, University of Tübingen, Germany) presented his work on the holoparasitic plant Cuscuta reflexa (Fig. 2). This plant infects a broad range of dicotyledonous plant species, except Solanum lycopersicum. His group has identified a 2 kDa glycopeptide of C. reflexa that triggers defense responses in S. lycopersicum but not in susceptible plants. This ParAMP (parasite associated molecular pattern) is detected in nonhost plants through a leucine rich repeat (LRR)-like receptor protein, termed Cuscuta Receptor 1 (CuRe1), inducing defense responses that prevent successful colonization.

Function and engineering of plant recognition receptors

Plant innate immunity is based on the recognition of microbeassociated molecular patterns (MAMPs) by PRR. Identification of new PRRs at the protein level is relatively ineffective due to their low abundance and hydrophobicity. Patrick Boyle (Boyce Thompson Institute for Plant Research, Ithaca, NY, USA) presented a new method to solve this problem called the 5C strategy. First the MAMP-probe is cross-linked to its cognate PRR by UV irradiation and both are then dissolved from the membrane.



Fig. 1 *Hibiscus rosa-sinensis* (Malvaceae) on the island of Rhodes; photographed by Sebastian Wittulsky during the IS-MPMI Congress.

Fig. 2 *Cuscuta reflexa* (Convolvulaceae) during infection of *Solenostemon scutellarioides* (Lamiaceae); photograph kindly provided by Markus Albert, Center for Plant Molecular Biology of Tübingen, Germany.

New Phytologist (2015) 205: 468–471 www.newphytologist.com

© 2014 The Authors New Phytologist © 2014 New Phytologist Trust Click chemistry is applied to add a cleavable isotope-coded affinity purification tag (ICAT). Afterwards the tagged complex is captured and enriched before chemical cleavage. The purified material retains a portion of the ICAT, which facilitates characterization by MS. To demonstrate the effectiveness of the strategy he cross-linked the MAMP flg22 (a peptide derived from the bacterial flagellum protein flagellin) to its PRR FLS2 and purified. This approach promises to help advance the identification of new PRRs and may also provide a system for detecting unknown interacting molecules of proteins of interest.

Georg Felix (Centre for Plant Molecular Biology, University of Tübingen, Germany) described the LRR-receptor kinases FLS2 and EFR of *Arabidopsis* that detect the bacterial proteins flagellin and EF-Tu. He discussed a method based on chimeric variants of such receptors as tool for functional studies (Albert & Felix, 2010; Albert *et al.*, 2010). If the cytoplasmic domains and the SERK coreceptors were reciprocally swapped, the artificial receptors displayed somewhat predictable activities. This research raises the question if this 'two-hybrid-receptor' approach would allow us to trigger a 'chosen' cell response in the future. An artificial triggering system for cell responses such as this could act as a screening tool to select molecules or a desired cell answer in the presence of the cognate ligand.

Manipulation of fungi by plant viruses

Virus-induced gene silencing (VIGS) is a common tool in plant biology used to study the function of genes through transient silencing (Lu *et al.*, 2003). Peter Palukaitis (Seoul Women's University, South Korea) and Donato Gallitelli (Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Italy) demonstrated the potential of VIGS in filamentous fungi by showing that several plant viruses have the potential to infect and replicate in *Colletotrichum* or *Phytophthora* species. Further, genetically modified viruses can be used for strong expression of foreign genes (e.g. encoding Green Fluorescent Protein; GFP) or for gene silencing (Mascia *et al.*, 2014). This technique could be utilized in the future to manipulate untransformable fungi such as biotrophic fungi (e.g. rusts or endosymbionts), as the technique is fast and very powerful.

Diagnosis and diagnostics of plant-microbe interactions

A major component within the field of plant-microbe interactions is diagnostics. Maria Lopez (Institut Valencia d'Investigacions Agraries, Spain) explained how diagnosticians are asked to answer the major question 'Who is out there?' She considered the tools available to address this question and provided examples of the use of high throughput technologies for diagnosis such as genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics – so called 'omics era' technology. In a related talk Rick Mumford (The Food & Environment Research Agency, York, UK) emphasized the necessity for the emergence of new and effective tools for fast and accurate field diagnosis. Several speakers described diagnostic approaches which are being developed and utilized by their groups. Georgios Vidalakis (University of California, USA) presented a novel and rapid method to distinguish between infected and noninfected tissue, even in the absence of symptoms. Andrew Armitage (East Malling Research, UK) set the frame for NGS as yet another important tool that could help in the prediction of host specificity. Another diagnostic approach was proposed by Richard Cooper (University of Bath, UK) who described how pathogen-specific effectors can be used as probes for the diagnosis. Diagnosis is an important factor of practice; however, in the words of Martin H. Fischer, as paraphrased by Rick Mumford, 'we should not forget that it is not the end but the beginning of the practice'.

For a long time the translation of basic science into applied practice has been *the* missing link in the study of plant-microbe interactions. At this meeting, the importance of translational research was represented in many talks; for example, Andrew Bent (University of Wisconsin, Madison, WI, USA) proposed that variation in gene copy number could be involved in resistance. The increased focus was exemplified by Cyril Zipfel from The Sainsbury Laboratory (Norwich, UK) who introduced the TSL+ program, which aims to expand on fundamental research from the laboratory and use it with the aim of reducing worldwide losses to crop diseases. It was clear from many of the talks given that in order to engineer broad-spectrum disease resistance both basic and translational research should be followed in parallel.

RNA silencing and epigenetics in plants

David Baulcombe (University of Cambridge, UK) discussed how heritable genetics might be influenced by small interfering RNAmediated gene silencing. He showed that progenies of Arabidopsis plants infected with Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 (PstDC3000) exhibit enhanced resistance to the pathogens Hyaloperonospora arabidopsidis and PstDC3000. This mechanism was presented as a result of hypomethylated SA-dependent genes. The hypomethylation led to lower gene expression and therefore enhanced resistance (Luna et al., 2012). A similar effect was shown for tissue-culture regenerated rice plants where demethylation of promoters led to decreased expression levels which were stable across generations (Stroud et al., 2013). These results underlie the possible influence of heritable epigenetics in heritable variation within species. Furthermore, this effect could be used for agricultural purposes. Could seed producers infect their plants to get more resistant progenies? If yes, it would contribute to an improved pathogen resistance strategy without the application of chemical agents in the field.

Conclusion

Undoubtedly, many unanswered questions remain within the field of plant-microbe interactions. This congress highlighted some of the exciting research which is being carried out around the world; however, these are only pieces of a puzzle named microbiome, symbiotic countertrade, or plant-pathogen arms race. In nature the distinction between virulence and avirulence often depends on a few genes or, as aptly surmised by Libo Shan (Texas A & M University, College Station, TX, USA), 'Resistance is the rule and disease is the exception'. The MPMI community will continue to

> © 2014 The Authors New Phytologist © 2014 New Phytologist Trust

New Phytologist

Forum 471

reveal many such mechanisms in the future and we are glad to be part of it.

Acknowledgements

The authors would like to thank Francis Martin, who invited them to write this report and extensively edited earlier drafts of this report. The authors also thank the whole editorial team of *New Phytologist* for all their corrections and comments, Markus Albert for providing the photograph of his model plant *Cuscuta;* the IS-MPMI for the 2014 IS-MPMI travel award of A. G. and the Lab of Excellence ARBRE (ANR-11-LABX-0002-01) for the travel grant of S. W., a postdoctoral fellow of the Lab of Excellence ARBRE.

Sebastian Wittulsky¹*, Clement Pellegrin¹, Artemis Giannakopoulou² and Rainer Böni³

¹Lab of Excellence ARBRE, Tree–Microbe Interactions Department, INRA – Nancy, Nancy, Champenoux, France;
 ²The Sainsbury Laboratory, Norwich, NR4 7UH, UK;
 ³Molecular Plant Biology/Phytopathology Department, Institute of Plant Biology, University of Zurich, Zurich, Switzerland (*Author for correspondence: tel +333 54 40 33 00; email sebastian.wittulsky@nancy.inra.fr)

References

- Albert M, Felix G. 2010. Chimeric receptors of the Arabidopsis thaliana pattern recognition receptors EFR and FLS2. Plant Signaling & Behavior 5: 1430–1432.
- Albert M, Jehle AK, Mueller K, Eisele C, Lipschis M, Felix G. 2010. Arabidopsis thaliana pattern recognition receptors for bacterial elongation factor Tu and flagellin can be combined to form functional chimeric receptors. Journal of Biological Chemistry 285: 19035–19042.
- Broughton LC, Gross KL. 2000. Patterns of diversity in plant and soil microbial communities along a productivity gradient in a Michigan old-field. *Oecologia* 125: 420–427.
- Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, Ver Loren van Themaat E, Ahmadinejad N, Assenza F, Rauf P, Huettel B, Reinhardt R, Schmelzer E et al. 2012. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* 488: 91–95.
- Doehlemann G, Hemetsberger C. 2013. Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. *New Phytologist* 198: 1001–1016.
- Doehlemann G, Requena N, Schaefer P, Brunner F, O'Connell R, Parker JE. 2014. Reprogramming of plant cells by filamentous plant-colonizing microbes. *New Phytologist* 204: 803–814
- Gimenez-Ibanez S, Boter M, Fernández-Barbero G, Chini A, Rathjen JP, Solano R. 2014. The bacterial effector HopX1 targets JAZ transcriptional repressors to activate jasmonate signaling and promote infection in *Arabidopsis. PLoS Biology* 12: e1001792.
- Hogenhout SA, Oshima K, Ammar e-D, Kakizawa S, Kingdom HN, Namba S. 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology* 9: 403–423.

- Kloppholz S, Kuhn H, Requena N. 2011. A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Current Biology* 21: 1204–1209.
 Kuhn H, Panstruga R. 2014. Introduction to a Virtual Special Issue on
- phytopathogen effector proteins. *New Phytologist* **202**: 727–730. **Links MG, Demeke T, Gräfenhan T, Hill JE, Hemmingsen SM, Dumonceaux TJ. 2014.** Simultaneous profiling of seed-associated bacteria and fungi reveals

antagonistic interactions between microorganisms within a shared epiphytic microbiome on *Triticum* and *Brassica* seeds. *New Phytologist* 202: 542–553. Liu Z, Zhang Z, Faris JD, Oliver RP, Syme R, McDonald MC, McDonald BA,

- **Solomon PS, Lu S, Shelver WL** *et al.* **2012.** The cysteine rich necrotrophic effector SnTox1 produced by *Stagonospora nodorum* triggers susceptibility of wheat lines harboring *Snn1. PLoS Pathogens* **8**: e1002467.
- Lu R, Martin-Hernandez AM, Peart JR, Malcuit I, Baulcombe DC. 2003. Virus-induced gene silencing in plants. *Methods* **30**: 296–303.
- Luna E, Bruce TJA, Roberts MR, Flors V, Ton J. 2012. Next-generation systemic acquired resistance. *Plant Physiology* 158: 844–853.
- Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, Yourstone S, Gehring J, Malfatti S, Tremblay J, Engelbrektson A, Kunin V, del Rio TG *et al.* 2012. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* 488: 86–90.
- Macho AP, Schwessinger B, Ntoukakis V, Brutus A, Segonzac C, Roy S, Kadota Y, Oh M-H, Sklenar J, Derbyshire P *et al.* 2014. A bacterial tyrosine phosphatase inhibits plant pattern recognition receptor activation. *Science* 343: 1509–1512.
- Mascia T, Nigro F, Abdallah A, Ferrara M, De Stradis A, Faedda R, Palukaitis P, Gallitelli D. 2014. Gene silencing and gene expression in phytopathogenic fungi using a plant virus vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 111: 4291–4296.
- Plett JM, Daguerre Y, Wittulsky S, Vayssières A, Deveau A, Melton SJ, Kohler A, Morrell-Falvey JL, Brun A, Veneault-Fourrey C et al. 2014. Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus Laccaria bicolor stabilizes the Populus JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 111: 8299–8304.
- Schlaeppi K, Dombrowski N, Oter RG, Ver Loren van Themaat E, Schulze-Lefert P. 2013. Quantitative divergence of the bacterial root microbiota in *Arabidopsis* thaliana relatives. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 111: 585– 592.
- Shakya M, Gottel N, Castro H, Yang ZK, Gunter L, Labbé J, Muchero W, Bonito G, Vilgalys R, Tuskan G *et al.* 2013. A multifactor analysis of fungal and bacterial community structure in the root microbiome of mature *Populus deltoides* trees. *PLoS ONE* 8: e76382.
- Smalla K, Wieland G, Buchner A, Zock A, Parzy J, Kaiser S, Roskot N, Heuer H, Berg G. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturating gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied Environmental Microbiology* 67: 4742–4751.
- Stroud H, Ding B, Simon SA, Feng S, Bellizzi M, Pellegrini M, Wang G-L, Meyers BC, Jacobsen SE. 2013. Plants regenerated from tissue culture contain stable epigenome changes in rice. *eLife* 2: e00354.
- Tisseranta E, Malbreil M, Kuo A, Kohlera A, Symeonidi A, Balestrini R, Charron P, Duensing N, Frei dit Frey N, Gianinazzi-Pearson V *et al.* 2013. Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 110: 20117–20122.
- Weintraub PG, Beanland L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology* 51: 91–111.

Key words: diagnosis, effector, mycorrhizal fungi, plant-pathogen interaction, receptor, resistance, symbiosis, translational research.

Annexe 2 - Localisation subcellulaire *in planta* de MiSSP8 sous forme mature (i.e, sans signal peptide)



Expression transitoire d'une construction MiSSP8::GFP dans une feuille de tabacs agés de 4 semaines par agroinfiltration. D.O = 0.1. Observation au microscope confocal à balayage laser 24 heures après infiltration.

Annexe 3 - Bilan des activités (communications orales, posters, formations)

2015, 15 Septembre. Présentation orale. Effectome Meeting, Lauret, France
2014, 6 Juillet. Poster. IS-MPMI XVI, Rhodes, Greece
2013, 2 Octobre. Poster. XI Fungal Biology Conference, Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Germany
2013, 27 Septembre. Présentation orale. Effectome Meeting, Lauret, France
2013. 20 Février. Poster. Séminaire du département EFPA. Dourdan, France
2012, 29 Octobre. Poster. Effectome Meeting, Lauret, France

Formations

AcT/MedCom.1-Experimentarium(session automne 2013)

Objectif : Il ne s'agit pas d'un cours mais d'une formation-action pour laquelle la participation active et l'adhésion des participants et de leurs encadrants (directeur de thèse ou personne de l'équipe) est nécessaire. Il est nécessaire de faire preuve d'ouverture aux autres et d'avoir envie de parler de son activité.

Programme : Ce module vise, du 2 septembre au 7 novembre 2013, à former les doctorants : - à parler de leur activité - à dialoguer avec un public de non-spécialistes - à partager leur passion de la recherche - à montrer que la science n'est pas un monde mystérieux mais avant tout une activité humaine. Le but n'est pas de faire de la vulgarisation scientifique au sens classique du terme, mais bien de replacer la science dans la société. La formation aide les doctorants à réfléchir sur le sens de leur recherche, à se sentir à l'aise avec leur sujet, leur position, leur activité de jeunes chercheurs ; elle apprend à être disponible face au questionnement de non-spécialistes et peut être en cela un atout dans une recherche d'emploi ultérieur. La démarche des ateliers part d'expériences et d'objets choisis par le doctorant pour entraîner le public au cœur de sa recherche.

Methodes de l'etude in situ de la cellule

Objectif : Initier les étudiants aux nouvelles méthodes de cytologie utilisées dans l'étude des processus fondamentaux de biologie cellulaire. Développer chez l'étudiant une appréciation de ces méthodes afin de pouvoir les intégrer en complémentarité avec les méthodes de la biochimie et de la biologie moléculaire.

Programme : L'enseignement comprendra une partie théorique et une partie pratique sous forme d'ateliers et de démonstrations à partir d'exemples précis. 1. Base de la microscopie photonique: - la microscopie à contraste de phase, interférentielle - la microscopie à fluorescence, confocale - la vidéo microscopie 2. Analyse au niveau structural et ultrastructural : - microscopies électroniques à transmission et à balayage - techniques de microdétection par perte d'énergie et analyse X. 3. Localisation de composés (protéines, techniques d'immunocytochimies hormones.) par des : immunofluorescence, immunoperoxydase, immunogold 4. Localisation de marqueurs sur ADN, étude de l'expression de gènes - hybridation in situ - FISH 5. Utilisation de sondes fluorescentes 6. Traitement, analyse d'images en cytologie (18 mars 2013) Faculté des Sciences Vandoeuvre les Nancy et INRA Champenoux

Séminaire annuel 2014 école doctorale RP2E : 'ressources végétales et animales ... Quelles perspectives ?

Programme : Matin et après-midi : conférences effectuées par des intervenants extérieurs en relation avec le thème du séminaire et par des doctorants en relation avec leur sujet de thèse. Vont présenter chacun une conférence : Mesdames Nathalie CAYOT - Professeur AgroSup Dijon et Dr Danièle WERCK - Directeur de Recherche Université de Strasbourg Dr Frédéric GAYMARD - Directeur de Recherche SupAgro Montpellier et Dr Guillaume TCHERKEZ - Professeur Université Paris Sud

Développer ses capacités à communiquer et à manager

Objectifs

Savoir maîtriser tous les vecteurs de la communication: écoute verbale et non verbale, posture et énergie comme éléments majeurs de la communication. Savoir écouter, entendre et maîtriser tous les signaux langagiers émis pour mieux interagir avec l'autre. Savoir maîtriser toutes les formes de prise de parole : maîtrise de la voix, du regard, de la gestuelle relativement à un espace donné. Savoir développer son assertivité : savoir être confiant et créatif en situation inconnue, mieux cerner ses potentiels, développer la confiance en soi et apprendre à s'affirmer. Savoir mener des hommes et des équipes : prendre conscience de l'efficacité d'une démarche collective qui respecte les individualités et les différences. Savoir diriger et être dirigé.

Programme

Exposer sa thèse, défendre des projets de recherche, transmettre des savoirs lors de conférences ou de cours réguliers, dynamiser une équipe de recherche, demandent des savoirs faire et savoir être peu abordés dans les cursus universitaire. Il s'agit de développer les capacités à communiquer, à manager et à mettre en acte la transmission des savoirs. Certaines techniques théâtrales, utilisées habituellement par le comédien ou le metteur en scène, sont mises au service du développement personnel de l'individu pour une meilleure maîtrise professionnelle des situations de communication des chercheurs. Ainsi on traite de problématiques professionnelles par le biais de transpositions dans des exercices et mises en situation diverses, permettant d'en cerner certains enjeux fondamentaux. La distance ainsi créée, va permettre la mise en jeu (je), nécessaire d'une part à toute prise de conscience et remise en cause personnelle, d'autre part à l'expression de la créativité indispensable pour la recherche de solutions nouvelles aux problèmes rencontrés.

Annexe 4 - Validation du système rBiFC



Photographies en microscopie confocale à balayage laser (x35) de feuilles de tabac exprimant transitoirement les différentes constructions. (A) : Contrôle positif d'interaction : nYFP ::MiSSP7 interagit avec cYFP ::JAZ6 dans le noyau de cellules épidermiques de tabac et la YFP est reconstituée. (B) : Contrôle négatif de transformation : Le signal rouge retrouvé est du à l'autofluorescence des chloroplastes. (C) : Contrôle négatif d'interaction : Les cellules sont bien transformées (signal rouge nucléo-cytoplasmique dans les cellules épidermiques) mais nous n'observons pas de signal jaune, la YFP n'étant pas reconstituée par l'interaction des deux protéines dans ce cas. N : noyau. Tiré du rapport de stage de Master 2 de François Jobert.

Annexe 5 – Western Blot du rBiFC



Annexe 6 – Recherche d'interactants lipidiques par puces à lipides



été incubé avec la puce avant d'ajouter le substrat de l'enzyme HRP.

Fiche technique 1

Production et purification de protéine recombinante en *Escherichia coli* via le système inductible et auto processif de l'étiquette protéase CPD



Principe

L'étiquette CPD consiste à la fusion du domaine protéase à Cystéine (CPD) de la toxine MARTX Vibrio cholerea de et de l'étiquette hexahistidine. Le CPD est une protéase sitespécifique clivant exclusivement après les résidues Leucine après activation par la petite molécule eucaryote spécifique Inositol hexakisphosphate $(InsP_6)$. Puisque cette molécule est absente des cellules bactériennes, des protéines de fusion pleine longueur CPD-His6 sont purifiées en utilisant la chromatographie d'affinité imidazole (IMAC), à partir de lysats bactériens sous une forme de protéase inactive. L'ajout d'InsP6 sur les protéines fusion immobilisées sur les colones Ni2+-NTA induit l'autoclivage après un résidu Leu au niveau de la jonction entre protéine d'intérêt et CPD. Tiré de Shen et al, 2008.

Production de MiSSP8 recombinante

- 1. La séquence d'ADNc correspondante à la protéine MiSSP8 mature (sans signal peptide), avec ou sans étiquette streptavidine, a été optimisée pour l'usage des codons de *E. coli* et clonée dans le plasmide pET-28a-CPD (Shen et al, 2008).
- 2. Transformation de souches de *E.coli* chimiocompétentes Rosetta pLysS (Novagen). Cette souche permet de réduire les « fuites » d'expression avant induction de l'expression.
- 3. A partir d'une préculture sur la journée de 5 mL en milieu Luria-Bertani (Bertani, 1951), une solution de 200mL de milieu LB est inoculée et cultivée sur la nuit (37°C, 200 rpm). Le lendemain, une solution de 2000mL est inoculée et ajustée à une $D.O_{600}$ de 0.1. L'induction de l'expression du plasmide pET-28a-CPD s'effectue à l'entrée en phase exponentielle de croissance ($DO_{600} = 0.4$) par ajout de 0.5mM d'IPTG dans le milieu(**Figure, A**).
- 4. Cultiver les bactéries pendant 4h à 37°C et 200 rpm.
- 5. Centrifuger les cellules à 8000 rpm pendant 10 mn.
- 6. Resuspendre le culot dans 5mL de tampon (50mM Tris, 200mM NaCl pH8)
- Lyser les cellules bactériennes par sonication 2x1 min à une puissance de 100W. Effectuer la lyse dans la glace.
- 8. Centrifuger le lysat cellulaire à 10000 rpm, 15 min.



Figure : Production et purification des protéines MiSSP8 et MiSSP8-Streptag recombinante en *E.coli*. (A) Le gène codant la protéine MiSSP8 avec ou sans étiquette streptavidine est synthétisé dans le vecteur d'expression pET-28a-CPD avec optimisation des codons pour une expression en *E.coli*. Une culture bactérienne de 2L est inoculée à partir d'une préculture de 200mL. (B) La protéine MiSSP8-CPD-His soluble est d'abord purifiée sur une résine Ni-NTA avant (C) induction du clivage de l'étiquette CPD par ajout d'inositol-6-phosphate. (D) La protéine MiSSP8 et MiSSP8-Streptavidine est finalement séparée de son étiquette CPD par chromatographie d'exclusion de taille.

- 9. Le surnageant (correspondant à la fraction soluble) est prélevé et passé sur colonne Ni-NTA (Qiagen).
- 10. Le culot correspondant à la fraction insoluble et repris dans du tampon Tris-NaCl dans un volume équivalent au volume de fraction soluble.
- 11. Déposer entre 10mL de résine Ni-NTA (Qiagen, Allemagne) dans une colonne de purification (Qiagen, Allemagne).
- 12. Equilibrer la colonne avec 15mL de tampon Tris NaCl
- 13.Laver la colonne avec un volume de 40mL de tampon de lavage (50mM Tris, 200mM NaCl, 15mM imidazole pH8). Controler que la D.O_{280 est} proche de 0 après avoir fait le blanc sur le tampon de lavage.
- 14. Eluer la protéine recombinante avec 15mL avec du tampon d'élution (50mM Tris, 200mM NaCl, 150mM imidazole pH8) (Figure, B).
- 15.L'imidazole est ensuite retiré du milieu d'élution par diafiltration contre du tampon 50mM Tris, 200mM NaCl pH8 à l'aide du colonne Vivaspin 15mL Turbo (Sartorius) à 4000g. Remplir la colonne Vivaspin avec l'éluat. Centrifuger (4000g/30min) jusqu'à descendre le volume à 1mL. Vider le « flow-through » puis compléter à 15mL avec du tampon Tris-NaCl. Centrifuger (4000g/60min). Recommencer. Au moins 5 cycles de centrifugation sont nécessaires pour abaisser la concentration d'imidazole à une valeur suffisamment faible (1.5uM) pour ne pas interférer avec la suite de la purification

Purification de MiSSP8

- 1. Autoclivage de la protéine et de son étiquette induit par l'ajout de 0.20 M d'inositol-6-phosphate (Sigma) dans un tampon 100mM Tris, 200mM NaCl pH 8 sur la nuit à température ambiante (si la protéine est stable à cette température, sinon possibilité d'incuber sur la nuit à 4°C) (**Figure, C**).
- 2. Au moins trois cycles de diafiltration avec les colonnes Vivaspin 15 Turbo permettent d'éliminer l'inositol-6-phosphate.
- La protéine clivée est finalement purifiée sur une colonne d'exclusion de taille et éluée par fraction de 1.5mL (Akata Prime Plus, GeHealthcare). Les fractions contenant la protéine MiSSP8 purifiée ont été controlées sur gel Tris-Glycine 12% et celles contenant la protéine MiSSP8 seules ont été regroupées. (Figure, D).

Fiche technique 2

Interaction protéine-protéine par complémentation bi-moléculaire de fluorescence (BiFC)

Principe

La technique de complémentation bi-moléculaire de fluorescence (BiFC) se base sur l'expression simultanée de deux protéines fusions dans la même cellule. La protéine fluorescente jaune YFP (Yellow Fluorescent Protein) est clivée en deux peptides Nt et Ct non fluorescents. Chaque partie est fusionnée respectivement à deux protéines d'intérêt pour lesquelles une interaction est supposée (Figure 1). L'expression des deux fusions in planta permet d'évaluer la capacité des deux protéines à interagir ensemble, l'interaction permettant la reconstitution d'une protéine YFP complète, entrainant l'apparition de fluorescence dans la cellule (Figure 1). Les avantages de cette approche in vivo est qu'elle permet de visualiser des interactions protéines-protéines dans des cellules vivantes et de déterminer le compartiment sub-cellulaire où l'interaction est effective. Néanmoins, des problèmes peuvent apparaître si les co-transformations aboutissent à des niveaux d'expression différent des deux protéines fusion. De manière à éviter cet inconvénient, nous utilisons le système du ratiometric BiFC (rBiFC) (Grefen & Blatt, 2012) reposant sur l'utilisation d'un seul vecteur contenant l'effecteur fusionné à une partie de YFP, le candidat interactant fusionné à l'autre partie de la YFP (ainsi qu'un contrôle interne sous la forme d'une protéine RFP (Red Fluorescent Protein) (Figure 2). Chaque construction est sous le contrôle d'un promoteur 35S (constitutif fort). Le signal RFP indique si la cellule a été correctement transformée, et suggère que les deux partenaires seront aussi produits avec une stœchiométrie 1 : 1.



Souches bactériennes utilisées

Les vecteurs rBiFC (Figure 2) contenant les séquences codantes de la protéine MiSSP8 et des différents interactants testé ont été propagés dans un premier temps dans des *E.coli* DH5alpha dans du milieu LB liquide supplémenté avec les antibiotiques appropriés à 37°C. L'ADN plasmidique a été ensuite extrait et lesvecteurs ainsi obtenus ont été transformés dans des Agrobacterium tumefaciens GV3101 électrocompétentes.



Mise en oeuvre du rBiFC

Blatt, 2012.

- 1. Les séquences codantes de MiSSP8 et de ses différents interactants putatifs, flanquées des séquences attb ont été amplifiées avec une polymérase à haute-fidélité Phusion II Hot Start avant d'être clonés dans un vecteur d'entrée pDONR222 via une réaction de BP cloning (GATEWAY, Invitrogen).
- 2. Après extraction et séquençage des plasmides recombinants, une réaction de LR Cloning multiplex a été mise en œuvre en suivant les recommandations des auteurs du système rBiFC (Greffen & Blatt, 2012, données supplémentaires) via l'enzyme LR Clonase Plus.
- 3. Les souches d' *A. tumefaciens* GV3101 sont cultivées sur la nuit. Les cultures sont centrifugées 10 minutes à 4000 rpm puis resuspendues dans 5mL de tampon d'activation (10 mM MgCl2, 10mM MES pH 5.6, 100uM acétosyringone) et mis sous faible agitation pendant 1h.
- 4. La culture bactérienne est ajustée à un $D.O_{600}=0.5$ avant infiltration. Des feuilles de tabacs de 5 semaines sont infiltréees via une seringue sans aiguille.
- 5. Les tabacs sont ensuite été mis en chambre de culture phytotronique à 22°C avec une photopériode de 8h/16h.
- 6. Les observations au microscope confocal à balayage laser sont faites 36h après infiltration.

Fiche technique 3

Recherche d'interactions protéines-sucres par titration calorimétrique isotherme





Principe.

La titration calorimétrique isotherme est une technique permettant d'étudier des interactions macromolécules entre et d'obtenir des paramètres thermodynamiques que la stœchiométrie, la constante tels d'affinité ou le changement d'enthalpie. Cette technique est beaucoup utilisée dans l'étude interactions protéines/protéines, des protéines/sucres ou encore protéines/ARN. La protéine est placée dans une cuve maintenue à une température constante. Le ligand potentiel est présent dans une seringue en rotation insérée dans la cuve. L'injection successive de ligand dans la cuve met en présence la protéine et son ligand et, dans le cas d'une interaction, sature progressivement la protéine. L'interaction physique entre la protéine et le ligand est détectée par le dégagement de chaleur généré lors de l'interaction entre les deux partenaires. A l'inverse. une absence d'interaction n'engendra aucune variation de température dans la cuve. Tiré de Leevit, 2001

Microcalorimétrie

- 1. La protéine MiSSP8 recombinante, concentrée à 40uM, a été transférée dans un tampon phosphate ou dans de l'eau par diafiltration au moyen d'une colonne Vivaspin Turbo 15 (Sartorius).
- 2. Le ligand à tester (sucre) est transféré dans un tampon identique par purification sur colonne de désalage PD-10 (GeLifesciences, USA) et ajusté à une concentration au moins cent fois supérieure à la protéine (400uM).
- 3. La protéine est insérée dans la cuve du microcalorimètre et le sucre inséré dans la seringue de l'appareil.
- 4. La mise en présence de la protéine et du sucre se fait par injection successive de polysacharides dans la cuve.
- 5. Les données sont ensuite analysées avec le logiciel Origin v7.0 (Malvern).

Les réactions sont effectuées soit dans un tampon phosphate pH7, soit en milieu aqueux ou en milieux aqueux supplémenté en cofacteur MgCl₂, MnCl₂ ou CaCl₂ (5mM chacun).

Fiche technique 4

Recherche d'interactions protéines-lipides par puces à lipides



TBS Wash Solution	PBS Wash Solution	TBS or PBS +	TBS or PBS + 1% milk	TBS or PBS +0.1%
10 mM Tris	Dissolve PBS	3% BSA	Blocking Solution	ovalbumin
150 mM NaCl	Tablet (Sigma P4417) in	Blocking Solution	Add 1 g non-fat dry milk	Blocking Solution
pH 8.0.	200 mL H ₂ O.	Add 3 g fatty acid free	to 100 mL TBS or PBS	Add 0.1 g ovalbumin
For TBS-T Add 0.1%	For PBS-T Add 0.1%	BSA (Sigma A7030) to		(Sigma A5253) to 100 mL
(v/v) Tween-20	(v/v) Tween-20	100 mL TBS or PBS		TBS or PBS
· · ·	· · ·			

ANALYSE D'EFFECTEURS DU CHAMPIGNON ECTOMYCORHIZIEN *LACCARIA BICOLOR* : APPROCHES BIO-INFORMATIQUES ET FONCTIONNELLES

La symbiose ectomycorhizienne associe les racines d'un arbre aux hyphes d'un champignon, conduisant à un échange réciproque de nutriments entre les deux partenaires. La colonisation fongique massive du cortex racinaire est caractérisée par la formation d'une interface symbiotique, le réseau de Hartig. L'acquisition du génome du symbionte ectomycorhizien *Laccaria bicolor* a permis d'identifier des petites protéines prédites sécrétées, les MiSSPs (Mycorrhiza-induced Small Secreted Proteins). Mon projet de thèse avait pour objectifs la comparaison des sécrétomes, notamment les petites protéines sécrétées (SSPs), de champignons ectomycorhiziens et saprotrophes, la localisation subcellulaire *in planta* et l'analyse fonctionnelle de MiSSPs de *L. bicolor*.

L'analyse bioinformatique a notamment permis de révéler des clusters de SSPs conservées entre champignons ectomycorhiziens et saprotrophes ou spécifiques de champignons ectomycorhiziens, mettant en lumière que les champignons ectomycorhiziens partagent des SSPs avec leurs ancêtres saprotrophes mais possèdent aussi d'autres SSPs spécifiques à leur mode de vie.

Un jeu de MiSSPs de *L. bicolor* ont été localisées *in planta*. Trois d'entre eux ciblent spécifiquement des compartiments subcellulaires de la cellule végétale. Le motif répété DWRR présent dans la séquence de MiSSP8 est partagé par une famille de protéine fongique de champignons majoritairement saprotrophes.

Ces résultats suggèrent que l'utilisation de SSPs comme moyen de communication est générique chez les champignons et démontrent aussi qu'au moins une petite protéine sécrétée requise pour la symbiose de *L. bicolor* a évoluée à partir de protéines de champignons saprotrophes.

Mots-clés : effecteurs, petites protéines sécrétées, ectomycorhize, symbiose, Laccaria bicolor

ANALYSIS OF EFFECTOR PROTEINS FROM THE ECTOMYCORRHIZAL FUNGUS LACCARIA BICOLOR: BIOINFORMATIC AND FUNCTIONAL ANALYSIS

Roots of most trees form ectomycorrhizal (ECM) symbiosis with mutualistic soil-borne fungi, relying on a bi-directional exchange of nutrients between the two partners. Fungal colonization of cortical root cells form the Hartig net, a symbiotic interface. Functioning of this symbiotic interface is not well known. However, *Laccaria bicolor* genome sequencing sheds the light on upregulated small-secreted proteins, so-called MiSSPs (Mycorrhiza-Small Secreted Proteins). Several *L. bicolor* MiSSPs were demonstrated as symbiosis effectors.

My PhD project aims to compare secretomes, in particular SSPs, of fungal with different lifestyles and pursue functional analysis of MiSSPs of *L. bicolor*.

Based on the clustering analysis, we identified clusters of SSPs shared between saprotrophic and ECM fungi and clusters of SSPs specific to ECM-fungi. This study highlights that ECM fungi share SSPs with their saprotrophic ancestors but also possess lifestyle specific SSPs.

In planta subcellular localization of a set of MiSSPs belonging to a core-regulon showed that three of them are able to target different plant subcellular compartments. Functional analysis of the symbiosis effector MiSSP8 does not lead to the identification of a putative interactor but the repetitive motif DWRR of MiSSP8 protein sequence is unique to fungi and is shared with SSPs from saprotrophic ancestors.

Our results suggest the use of SSPs as mean of communication is common and generic and show at least one SSPs required for ectomycorhizal symbiosis of *L. bicolor* has evolved from SSPs found in saprotrophic fungi.

Keywords: effectors, small-secreted proteins, ectomycorrhizal, symbiosis, Laccaria bicolor