



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Paul-Sabatier, Toulouse III

Discipline ou spécialité : Interaction plantes - microorganismes

Présentée et soutenue par **Maria-Victoria GOMEZ-ROLDAN**

Le 14 Novembre 2008

Titre :

**Rôle des Strigolactones dans la Symbiose
Mycorhizienne à Arbuscules**

Jury

Mme Uta PASZKOWSKY, Professeur d'Université, Lausanne

M. Bilal CAMARA, Professeur d'Université, Strasbourg

M. Jean-Marie BEAU, Professeur d'Université, Paris

M. Mathieu ARLAT, Professeur d'Université, Toulouse

M. Guillaume BECARD, Professeur d'Université, Toulouse

Mme Virginie PUECH-PAGES, Maître de conférences, Toulouse

École doctorale : Sciences Écologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries - SEVAB

Unité de Recherche : *Surfaces Cellulaires et Signalisation chez les Végétaux,*

UMR5546 CNRS/Université de Toulouse

Directeur (s) de Thèse : *M. Guillaume BECARD et Mme Virginie PUECH-PAGES*

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier le Professeur Guillaume Bécard de m'avoir accueillie dans son laboratoire pendant ces trois années de thèse au cours desquelles sa disponibilité, sa rigueur scientifique et ses précieux conseils m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions.

Je tiens aussi à témoigner toute ma reconnaissance à mes deux co-encadrantes Virginie Puech-Pages et Soizic Rochange pour le travail que nous avons réalisé en commun et pour la confiance qu'elles m'ont accordée. Ce fut un grand plaisir de travailler et d'apprendre, jour après jour, à leurs côtés. Je les remercie aussi tous les trois pour le temps passé à corriger ce manuscrit.

Je voulais également exprimer ma profonde reconnaissance aux Professeurs Uta Paszkowski et Bilal Camara pour l'honneur qu'ils me font en acceptant d'évaluer ce travail et d'en être les rapporteurs.

Abréviations

ABA	acide abscissique
BF	branching factor
CCD	Carotenoid cleavage dioxygenases
<i>dad</i>	<i>decreased apical dominance</i>
DMAPP	dimethylallyl diphosphate
DXR	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase
DXS	deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase
FPP	farnesyl diphosphate
GGPP	geranylgeranyl diphosphate
GPP	geranyl diphosphate
HPLC	High performance liquid chromatography
IPP	isopentenyl diphosphate
<i>max</i>	<i>more axillary growth</i>
MA	mycorhizien à arbuscules
MEP	2-C-methylerythritol-4-phosphate
MRM	Multiple reaction monitoring
MS-MS	tandem mass spectrometry
MVA	acide mévalonique
NCED	Nine- <i>cis</i> -epoxy-carotenoid dioxygenases
PDS	phytoène desaturase
PI	Precursor ion scan
PSY	phytoène synthase
Q-Trap	Quadrupole – Ion trap
Q-TOF	Quadrupole – Time of flight
<i>rms</i>	<i>ramosus</i>
SMS	Shoot multiplication signal
SPP	solanesyl diphosphate
UPLC	Ultra performance liquid chromatography
ZDS	ζ-carotène desaturase

Résumé

La symbiose mycorhizienne à arbuscules (MA) est une association des champignons du groupe des Gloméromycètes et les racines de la plupart des plantes terrestres. Cette symbiose améliore la santé et la nutrition hydrique et minérale des plantes. Des travaux antérieurs ont montré qu'une famille de molécules, les strigolactones, secrétées par les racines des plantes, étaient capables de stimuler fortement la croissance pré-symbiotique des champignons MA. Ces molécules, initialement caractérisées comme étant inductrices de la germination des graines des plantes parasites *Striga* et *Orobanche*, sont peu stables dans le sol, produites à l'état de traces, et actives sur les plantes parasites et les champignons MA à de très faibles concentrations.

Afin de préciser l'importance des strigolactones dans la symbiose MA, nous avons tout d'abord étudié des plantes de maïs (*Zea mays*) bloquées dans les étapes précoces de la synthèse des caroténoïdes (précurseurs hypothétiques des strigolactones). Les plantes mutées (mutant *y9*) ou traitées à la fluridone présentent une diminution de leur taux de mycorhization, et ce phénotype a été restauré par l'ajout exogène de GR24, une strigolactone synthétique. Ensuite, l'analyse de mutants de Pois (*Pisum sativum*) *rms1* et *rms5*, affectés dans le clivage des caroténoïdes (enzymes CCD8 et CCD7, respectivement) par des techniques de spectrométrie de masse a révélé que le Pois sauvage produisait deux strigolactones, l'orobanchyl acétate et une autre strigolactone incomplètement identifiée, mais que les mutants *rms1* et *rms5* ne produisaient aucune des deux. Les exsudats des mutants étaient aussi moins actifs sur les champignons MA et sur la germination des graines de plantes parasites. De plus, le mutant *rms1* était moins mycorhizé et l'application exogène de GR24 permettait de restaurer le taux normal de mycorhization. Ces résultats ont permis de démontrer l'importance des deux enzymes CCD8 et CCD7 dans la synthèse des strigolactones et leur importance pour l'établissement de la symbiose MA.

Les mutants *rms1* et *rms5* (avec des tiges hyper ramifiées) ont permis ces dernières années de révéler l'existence d'une nouvelle hormone végétale (appelée SMS, pour Shoot Multiplication Signal) de structure chimique inconnue et contrôlant la croissance des bourgeons axillaires. En collaboration avec d'autres équipes il a été montré que l'application de GR24 sur les bourgeons axillaires des mutants *rms1* et *rms5* permettait de restaurer le phénotype sauvage (inhibition de la croissance des bourgeons). Le mutant *rms4*, bloqué dans la perception du SMS et non dans sa synthèse, produit des strigolactones et est insensible à l'application de GR24. Ces résultats confirment l'intervention des strigolactones comme signal hormonal dans la voie SMS. Ces résultats ont été confirmés chez *Arabidopsis* avec les mutants *max*.

Nous avons révélé la nature multi signalétique des strigolactones dans trois processus biologiques distincts : la stimulation de la germination des graines des plantes parasites, la mise en place de la symbiose MA et le contrôle hormonal de la croissance des bourgeons axillaires chez les plantes. Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives de recherche fondamentale et appliquée sur l'origine évolutive des strigolactones, leurs mécanismes d'action, leur rôle écologique, et sur leur potentiel d'exploitation agronomique.

Mot clés : symbiose mycorhizienne à arbuscules, signalisation, strigolactones, clivage de caroténoïdes, plantes parasites, hormone végétale (SMS), spectrométrie de masse.

Abstract

The Arbuscular Mycorrhizal (AM) symbiosis is a mutualistic association between fungi to the group of *Glomeromycota* and the roots of most land plants. This symbiosis helps to improve plant health as well as water and mineral nutrition. Previous work has shown that a family of molecules called strigolactones, secreted by plant roots, are able to stimulate pre-symbiotic growth of AM fungi. These molecules initially characterize as seed germination stimulants for the parasitic plants *Striga* and *Orobancha*, are very unstable in the soil, produced in trace amounts, and active on parasitic plants and AM fungi at very low concentrations.

To investigate the importance of strigolactones in the AM symbiosis, we first studied maize (*Zea mays*) plants affected at early stages of carotenoid synthesis, because carotenoids are hypothetical precursors of strigolactones. Mutant ($\gamma 9$) and fluridone-treated plants exhibit a decreased mycorrhization rate and this phenotype can be rescued by treatment with the synthetic strigolactone GR24. We then analysed *rms1* and *rms5* garden pea (*Pisum sativum*) mutants affected in carotenoid cleavage enzymes CCD8 and CCD7, respectively. Using mass spectrometry techniques we showed that root exudates of wild-type pea plants contain orobanchyl acetate and another incompletely identified strigolactone while *rms1* and *rms5* produce neither of these two strigolactones. Mutant exudates are also less active on AM fungi and on *Orobancha* seed germination. Furthermore, *rms1* mutants are less mycorrhized than the wild type and exogenous treatment with GR24 can restore a normal mycorrhization rate. Together, these results demonstrate the importance of two enzymes, CCD8 and CCD7, in the synthesis of strigolactones and show that these compounds are important for the establishment of AM symbiosis.

Pea *rms1* and *rms5* mutants (with an increased shoot branching phenotype) have been used to reveal the existence of a new plant hormone called SMS, for Shoot Multiplication Signal. This hormone inhibits lateral bud outgrowth, and its chemical structure has long remained unknown. In collaboration with other research groups, we showed that the application of GR24 on axillary buds of *rms1* and *rms5* mutants can restore the wild-type phenotype (inhibition of bud outgrowth). The *rms4* mutant, blocked in the perception of SMS and not in its synthesis, produces strigolactones and is insensitive to the application of GR24. These results confirm the involvement of strigolactones as hormonal signals in the SMS pathway. Similar experiments carried out on *max* mutants confirmed our findings in *Arabidopsis*.

Our work shows that strigolactones act as signals in three distinct biological processes: the stimulation of parasitic plant seed germination, the establishment of AM symbiosis and the hormonal control of lateral bud growth in plants. Our results open up many opportunities for basic and applied research into the evolutionary origin of strigolactones, their mechanisms of action, their ecological role and their potential use in agriculture.

Key words: arbuscular mycorrhizal symbiosis, signalling, strigolactones, cleavage of carotenoids, parasitic plants, plant hormone (SMS), mass spectrometry.

Sommaire

<i>Introduction</i>	1
I. La rhizosphère, point de départ de multiples interactions	1
II. La symbiose endomycorhizienne à arbuscules	7
II.1. Origine, diversité et biologie de la symbiose MA.....	7
II.2. Cycle de vie des champignons MA.....	11
II.3. Dialoguer pour mieux se reconnaître.....	15
III. Rôle des strigolactones dans le cycle de vie des plantes parasites <i>Striga</i> et <i>Orobanche</i>	21
IV. Le « branching factor » contient des strigolactones	25
V. Voie de biosynthèse hypothétique des strigolactones	27
VI. Rôle des apocaroténoïdes dans la plante	33
VI.1. Implication des apocaroténoïdes dans la symbiose MA.....	35
VII. Objectif de la thèse	39

Chapitre 1

<i>Etude pharmacologique et génétique chez le maïs (<i>Zea mays</i>) de l'importance des strigolactones dans la symbiose MA</i>	47
1.1. Introduction	47
1.2. Addendum	51
<i>Strigolactones: promising plant signals</i>	
1.3. Résultats additionnels et discussion	57
1.3.1. Effet de la fluridone sur les champignons MA.....	57
1.3.2. Effet du GR24 sur la mycorhization du mutant <i>y9</i>	57
1.4. Conclusions	61

Chapitre 2

<i>Implication des strigolactones dans la symbiose MA, la germination des graines de plantes parasites et le développement des plantes</i>	65
2.1. Introduction	65
2.1.1. Régulation de la croissance des bourgeons latéraux par CCD7 et CCD8.....	67
2.1.2. Activité biochimique des enzymes CCD7 et CCD8.....	71

2.1.3. Modèle de régulation de l'hormone SMS.....	73
2.1.4. Présentation des résultats.....	75
2.2. Article.....	77
<i>Strigolactone inhibition of shoot branching</i>	
2.3. Résultats additionnels et discussion.....	97
2.3.1. Analyses complémentaires obtenus avec le mutant <i>rms1 (ccd8)</i>	97
2.3.2. Analyse du phénotype mycorhizien du mutant <i>rms5 (ccd7)</i>	101
2.4. Conclusions.....	109
<i>Discussion et Perspectives.....</i>	<i>113</i>
I. Importance des strigolactones dans la symbiose MA.....	113
I.1. Le « branching factor » est un ensemble de molécules.....	117
I.2. D'autres implications des strigolactones dans la symbiose MA.....	119
I.3. Régulation hormonale de la symbiose MA.....	125
II. Les strigolactones, une nouvelle classe d'hormones végétales.....	127
II.1. Apports dans la caractérisation et la biosynthèse de strigolactones.....	127
II.2. Rôle des strigolactones dans l'inhibition de croissance de bourgeons latéraux.....	133
III. Strigolactones, molécules avec une triple fonction.....	137
<i>Méthodologie.....</i>	<i>143</i>
<i>Références.....</i>	<i>151</i>

Introduction

I. La rhizosphère, point de départ de multiples interactions

Le système racinaire d'une plante est la partie souterraine lui servant à l'ancrage au sol, à l'absorption de l'eau et des minéraux, au stockage de ses réserves et à sa propagation ou dispersion. Le système racinaire a également comme rôle la synthèse de composés impliqués dans la régulation de sa croissance et celle des organismes qui l'entourent (Bertin et al., 2003). Ces composés vont être sécrétés principalement dans une zone appelée rhizosphère. Le terme **rhizosphère** signifie étymologiquement *rhiza* "racine" et *sphera* "ce qui entoure". La rhizosphère est donc la région du sol immédiatement adjacente (environ 2 mm) aux racines des plantes et qui est directement ou indirectement influencée par celles-ci (Bais et al., 2006).

Les caractéristiques biologiques et physico-chimiques de la rhizosphère dépendent en grande partie de la nature des différents composés rejetés par la plante dans un processus appelé rhizodéposition. La quantité et la composition de ces produits sont fortement influencées par les facteurs suivants : l'espèce végétale, le stade de développement de la plante et sa nutrition, le type de sol, les conditions de l'environnement telles que la température, le potentiel hydrique du sol et l'intensité de la lumière, entre autres. C'est par ce processus de rhizodéposition que toute une myriade de composés carbonés issus de la photosynthèse, des ions inorganiques, de l'eau et des protons, s'accumulent dans la rhizosphère (Bertin et al., 2003). Les composés carbonés sécrétés par la plante sont fortement majoritaires et peuvent représenter entre 5 et 20% des photosynthétats produits par celle-ci. Ils peuvent être dérivés du métabolisme primaire (acides aminés, acides organiques, carbohydrates, CO₂) et du métabolisme secondaire (plus de 100 000 molécules ont été décrites dans la littérature) (Bais et al., 2004). Différents mécanismes d'exsudation sont mis en place par la plante, selon qu'il s'agit de molécules à grand ou à faible poids moléculaire. Pour les molécules à grand poids moléculaire, comme les protéines et le

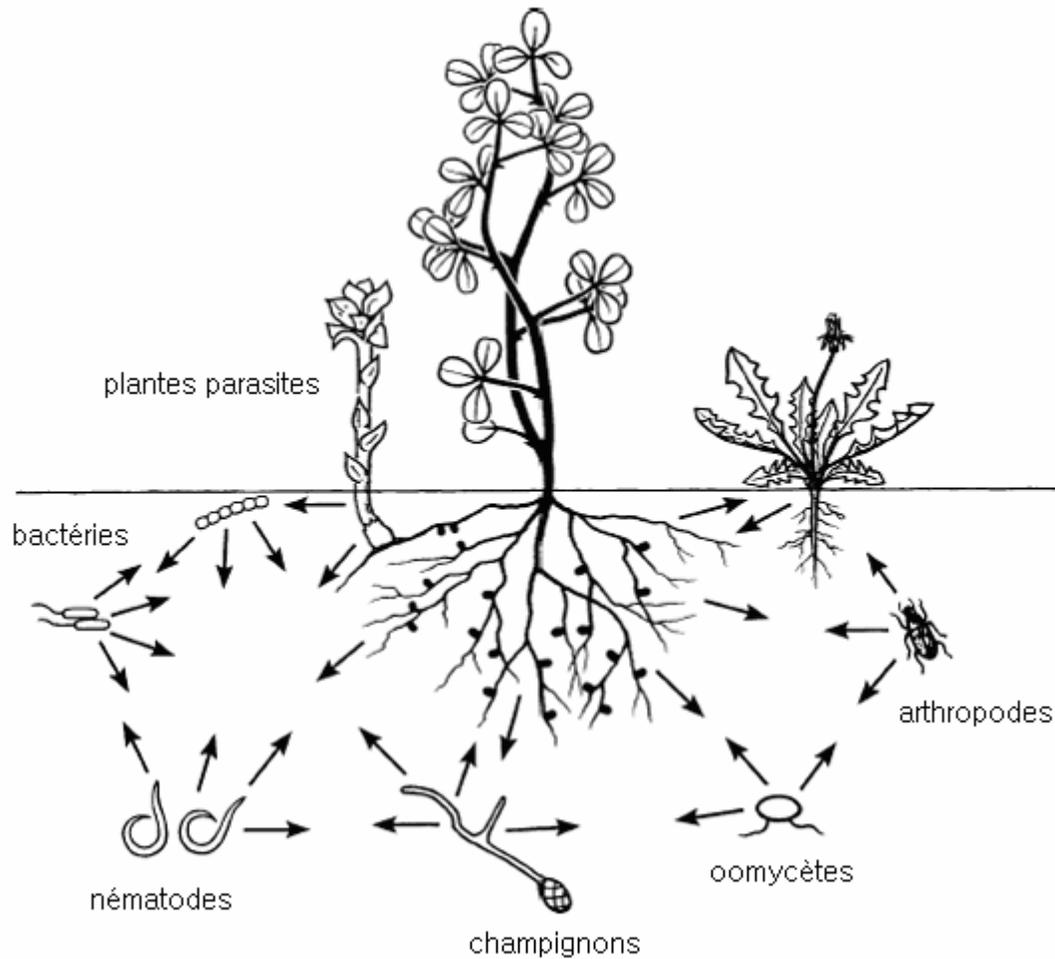


Fig.1. Représentation de la diversité des interactions entre les racines des plantes et les microorganismes du sol. La diversité des molécules chimiques impliquées dans les mécanismes de signalisation entre la plante hôte et les autres organismes de la rhizosphère est indiquée par des flèches. La reconnaissance de ces signaux amènera à la mise en place d'une association parasitique ou mutualiste. D'après Hirsch et al., 2003.

mucilage¹, des vésicules de transport et d'exocitose jouent le rôle principal. Pour les molécules à faible poids moléculaire, comme les sucres, les acides aminés, les composés phénoliques, les acides organiques et certains terpènes, des processus de diffusion impliquant ou non des transporteurs ou des canaux ioniques sont impliqués (Walker et al., 2003).

La sécrétion des exsudats est coûteuse en énergie et il a été proposé que les molécules exsudées étaient principalement produites avec des objectifs de défense (Bais et al., 2004). Plusieurs molécules sécrétées par les plantes ont en effet des propriétés phytotoxiques, antimicrobiennes, antibiotiques et insecticides.

Cependant d'autres rôles ont pu se mettre en place au cours de l'évolution des plantes. C'est ainsi que les exsudats racinaires vont aussi aider à améliorer l'acquisition des nutriments par la plante. Le phosphate dans le sol, par exemple, est relativement abondant mais il se trouve sous forme conjuguée, ce qui le rend non absorbable par les plantes. La sécrétion d'acides organiques tels que l'acide malique ou citrique, va agir comme chélateur libérant des phosphates assimilables par la plante (Bais et al., 2006).

Les exsudats racinaires vont aussi conditionner la diversité et la densité des organismes présents dans la rhizosphère. Grâce à la richesse de la matière organique exsudée par les racines, les organismes du sol vont établir des relations directes ou indirectes avec celles-ci (Fig. 1). Dans la plupart des cas les relations entre une plante hôte et un organisme du sol sont précédées par la reconnaissance des partenaires via des signaux chimiques (Hirsch et al., 2003). Ces signaux chimiques sont perçus par des récepteurs qui induisent des effecteurs spécifiques entraînant des interactions plus ou moins bénéfiques pour la plante hôte. Quelques molécules régulant ces interactions ont été identifiées, mais dans la plupart des cas elles restent inconnues. Pour citer un exemple, le cas de la (\pm)-catéchine, molécule sécrétée par les racines de *Centaurea maculosa*, permet d'illustrer l'importance des exsudats racinaires pour la vie d'une plante. Il a été démontré que *C. maculosa* produit de la catéchine capable de contrôler négativement la croissance des plantes de la même espèce (autoinhibition) ou d'une autre espèce (des compétiteurs) (Perry et al., 2007). La conformation chimique de la molécule joue aussi un rôle important dans son activité. Ainsi, il a été montré que la (+)-catéchine avait des propriétés antibactériennes et antifongiques, alors que la (-)-catéchine est plus active comme nématocide. Finalement, la (\pm)-catéchine semble

¹ Polysaccharides impliqués dans la lubrification de la racine durant la pénétration du sol et dans la protection vis-à-vis de certaines toxines (Walker et al., 2003)

être un important chélateur qui augmente l'absorption par la plante du phosphate et autres micronutriments (Perry et al., 2006).

Cette diversité d'effets d'une seule molécule permet d'illustrer la richesse des interactions possibles entre une plante et les organismes du sol. C'est ainsi qu'on pourra rencontrer, associés spécifiquement aux racines des plantes, des organismes aussi variés que d'autres plantes, des insectes, des bactéries, des nématodes et des champignons. Ces associations auront des effets négatifs ou positifs et seront dans certaines conditions indispensables pour la plante. Les relations néfastes pour la plante peuvent être de l'ordre de la compétition ou du parasitisme. Dans cette catégorie, on peut citer l'infection des racines de *Lycopersicon esculentum* par la bactérie pathogène *Ralstonia solanacearum*. Elle est attirée par divers acides aminés et acides organiques produits dans les exsudats racinaires et cause rapidement la mort de la plante (Yao et Allen, 2006). Les relations bénéfiques pour la plante sont principalement de type mutualiste où chacun des partenaires est bénéficiaire de l'association ; elles sont connues plus spécifiquement sous le nom de symbioses². La symbiose végétale la plus connue associe les plantes de la famille des légumineuses et les bactéries *Rhizobia* fixatrices d'azote. Certains flavonoïdes produits par la plante activent les gènes bactériens responsables du processus de nodulation (Kistner et Parniske, 2002).

Un autre exemple de symbiose plus ancienne, très répandue dans la nature, est la symbiose mycorhizienne. Le mot **mycorhize** provient du grec *mykès* (champignon) et *rhiza* (racine). C'est donc le nom donné à l'association entre certains champignons du sol et les racines des plantes. Il existe deux types principaux de mycorhizes : les ectomycorhizes, dans lequel les hyphes du champignon, appartenant aux *Basidiomycètes* ou aux *Ascomycètes*, colonisent les racines mais ne pénètrent pas dans les cellules, et les endomycorhizes arbusculaires, où les hyphes du champignon, appartenant aux *Gloméromycètes*, colonisent les racines de façon inter-mais aussi intra-cellulaire. Une présentation plus approfondie de cette symbiose particulière est nécessaire afin d'introduire notre sujet d'étude.

² Le terme symbiose sera utilisé ici pour définir une association de mutualisme même si ce terme, utilisé pour la première fois en 1890, servait pour définir toute interaction étroite entre différentes espèces (du mutualisme au parasitisme) (Strack et al., 2003).

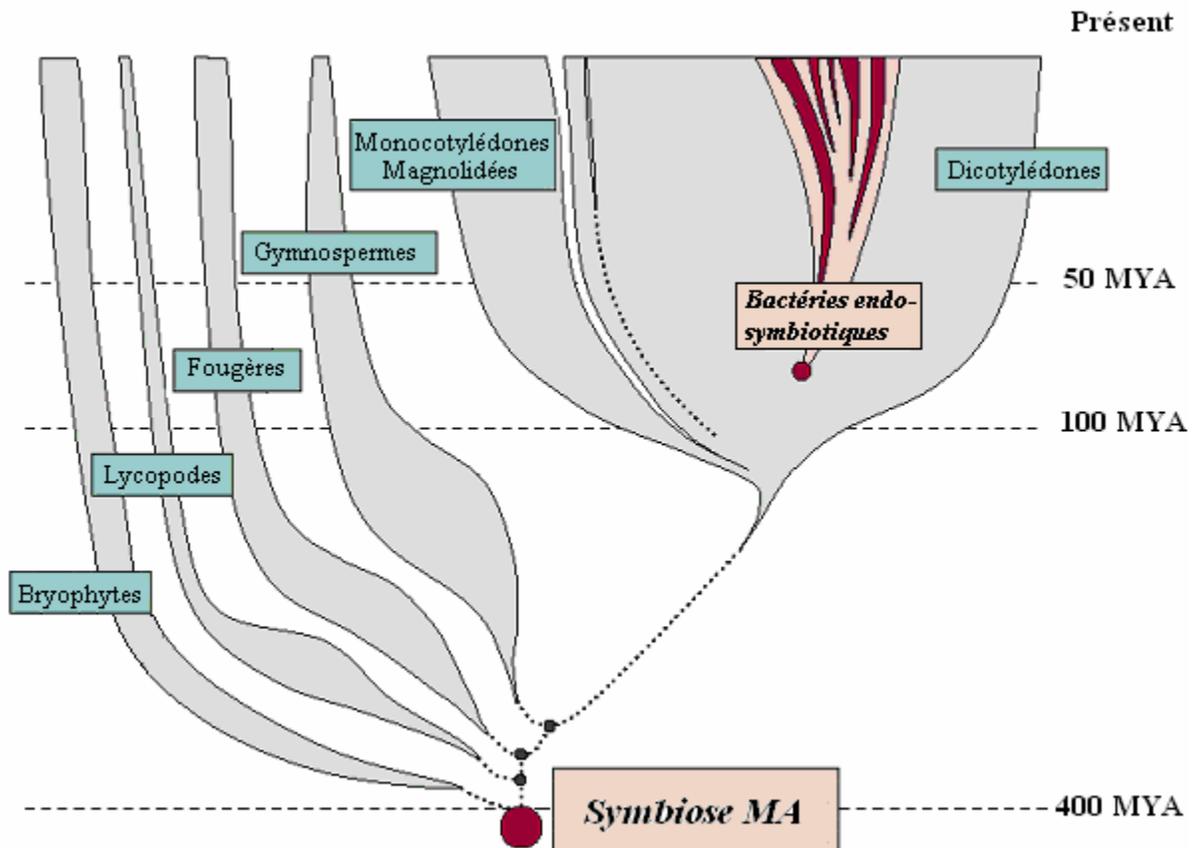


Fig. 2. Arbre phylogénétique représentant l'évolution des deux principales symbioses racinaires. L'association symbiotique entre les champignons mycorhiziens à arbuscules (MA) et la plupart des lignées des plantes terrestres, y compris les mousses, les lycopodes et les fougères, est apparu il y a plus de ~ 400 millions d'années (MYA). L'origine de la symbiose entre les plantes et les bactéries fixatrices d'azote étant beaucoup plus récente (~ 65 millions d'années). D'après Kistner et Parniske, 2002.

II. La symbiose endomycorhizienne à arbuscules

II.1. Origine, diversité et biologie de la symbiose MA

Le système racinaire des plantes primitives était très simple et ressemblait fortement à celui présent aujourd'hui chez les mousses. Il semblerait que l'environnement dans lequel les premières plantes terrestres ont évolué était suffisamment humide pour que l'acquisition d'eau ne présente pas un problème majeur. Il est donc possible que la fonction la plus importante de la racine primitive était de développer des mécanismes d'acquisition des nutriments indispensables pour la plante mais peu abondants dans les sols, comme le phosphate (Fitter, 1996). La mise en place d'une symbiose avec des organismes capables de leur apporter ces nutriments a pu être une des stratégies utilisées par les premières plantes pour coloniser le milieu terrestre. Cette hypothèse est basée sur la découverte de plusieurs structures fongiques observées dans les racines fossilisées d'*Aglaophyton*, une énigmatique plante de l'ère Dévonienne (il y a 400 millions d'années). Les hyphes non-septés et les arbuscules observés dans les cellules du cortex de cette plante sont morphologiquement identiques à ceux des endomycorhizes à arbuscules actuelles (Remy et al., 1994).

Parmi les plantes vasculaires présentes aujourd'hui, on considère que 80% environ sont mycotrophes. On les trouve donc chez les angiospermes, les gymnospermes, les ptéridophytes, les lycopodes et les bryophytes (Kistner et Parniske, 2002; Hause et Fester, 2005). Les données sur les fossiles et la distribution actuelle de la symbiose MA suggèrent que les plantes terrestres les plus anciennes étaient déjà mycorhizées, et que l'association a été suffisamment bénéfique pour être conservée tout au long de l'évolution des plantes vasculaires (Fig. 2). Seules quelques familles de plantes telles que les Brassicaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Proteaceae, Urticaceae, Cyperaceae, Juncaceae, Pinaceae, et le genre *Lupinus* chez les légumineuses, sont incapables d'établir une symbiose mycorhizienne (Strack et al., 2003). L'hypothèse la plus vraisemblable serait qu'au cours de l'évolution, ces plantes aient perdu, par des phénomènes indépendants, la capacité à rentrer en symbiose. Plusieurs familles de plantes non (ou peu) mycorhizables par des champignons MA ont adopté d'autres types de mycorhizes. Certaines espèces de plantes non-mycorhizables vivent dans des habitats aquatiques, riches en nutriments ou ont un système racinaire avec des poils racinaires très développés (Bucher, 2007). Un exemple très surprenant est celui du lupin dont quelques racines spécialisées appelées protéoïdes secrètent

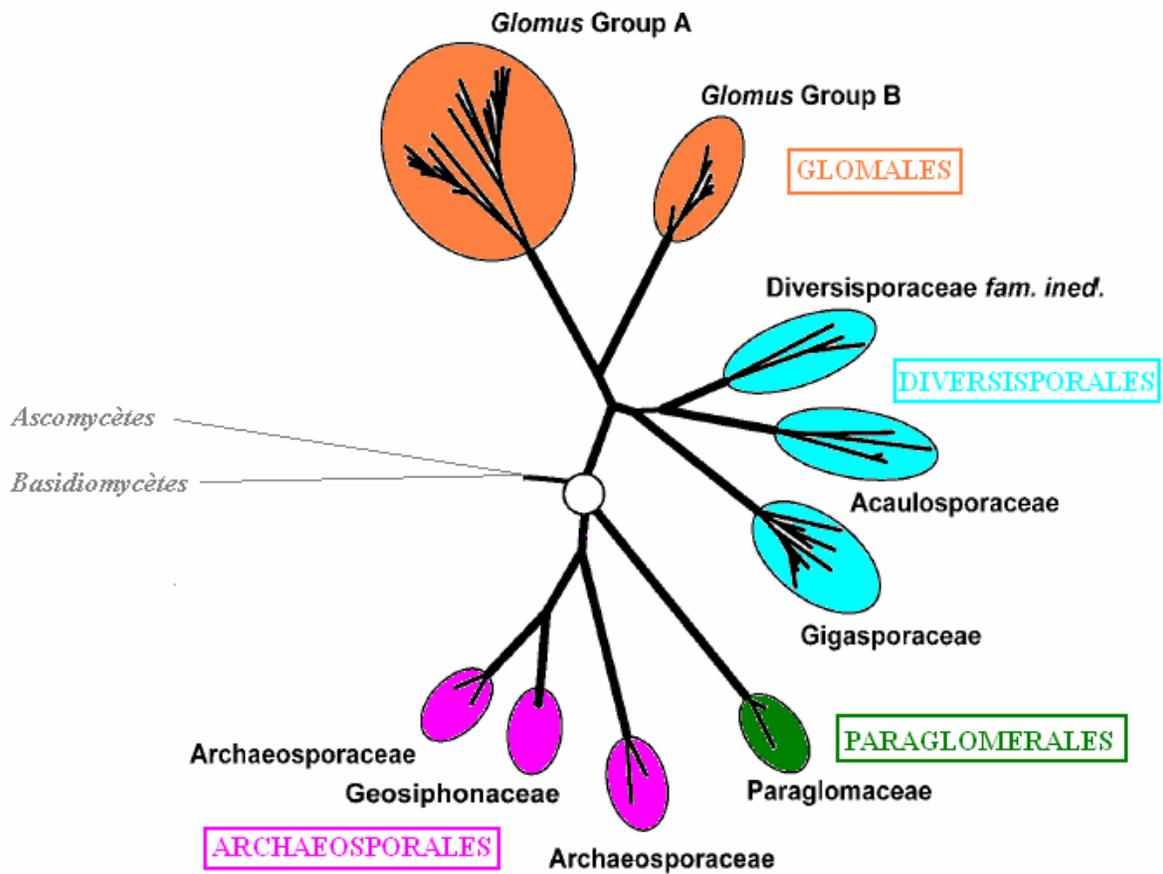


Fig. 3. Phylogénie des Gloméromycètes. Les champignons mycorhiziens à arbuscules rassemblés dans le phylum *Glomeromycota* forment un groupe monophylétique. Les 200 espèces décrites sont classées dans 4 ordres. D'après Shüßler et al., 2001.

d'importantes quantités d'acides organiques lui permettant d'augmenter l'absorption du phosphate de plus de 50% par rapport aux racines ordinaires (Johnson et al., 1994). L'exsudation de molécules modifiant chimiquement l'environnement du sol pour améliorer la solubilisation du phosphate et ensuite l'absorption par les racines, a aussi été la stratégie utilisée par une autre plante non-mycorhizable : le navet, *Brassica napus* (Hoffland et al., 1992).

Les champignons mycorhiziens à arbuscules (MA) sont des organismes entièrement dépendants de leur plante hôte, qui leur fournit les éléments carbonés indispensables à leur développement (Smith et Read, 2008). On appelle donc ces organismes des biotrophes obligatoires. En retour, la plante bénéficie de l'aide du champignon pour obtenir de l'eau et des nutriments présents dans le sol (principalement du phosphore et de l'azote mais aussi du potassium, du soufre et du cuivre). La plante est capable d'obtenir elle-même ces nutriments mais la zone explorée par les racines est vite dépourvue en minéraux. Le réseau d'hyphes extraracinaires formé par le champignon permet l'exploration d'un plus grand volume de sol et le transport du phosphate et des autres nutriments vers l'intérieur des racines (Bucher, 2007). En plus de bénéficier d'une meilleure nutrition minérale, les plantes mycorhizées montrent aussi une meilleure résistance à divers stress : hydrique, salin, provoqués par des métaux lourds ou des agents pathogènes (Al-Karaki et al., 2004; Zhang et al., 2006).

Les champignons MA appartiennent au phylum des *Glomeromycota*. Cette classification a été basée principalement sur l'analyse de la comparaison des séquences de la petite sous-unité d'ARN ribosomique. Plus de 200 espèces sont réparties en 4 ordres différents (*Archaeosporales*, *Paraglomerales*, *Diversisporales* et *Glomerales*) mais il est possible que d'autres espèces restent encore à découvrir (Schüßler et al., 2001). Une classification simplifiée est présentée dans la figure 3.

Les champignons MA sont des organismes coenocytiques (hyphes dépourvus de septa) et multinucléés. Leur reproduction est de type asexuée et cela probablement depuis plus de 400 millions d'années (Reinhardt, 2007). Les spores végétatives sont formées dans le sol ; elles peuvent contenir, selon les espèces, de plusieurs centaines à plusieurs milliers de noyaux. Un polymorphisme génétique important a été détecté dans ces spores polynucléées. Des interprétations différentes ont été avancées selon lesquelles les champignons MA seraient hétérocaryotiques avec des noyaux haploïdes ou homocaryotiques avec des noyaux polyploïdes (Kuhn et al., 2001; Pawlowska et Taylor, 2004). D'autres défendent l'hypothèse selon laquelle le

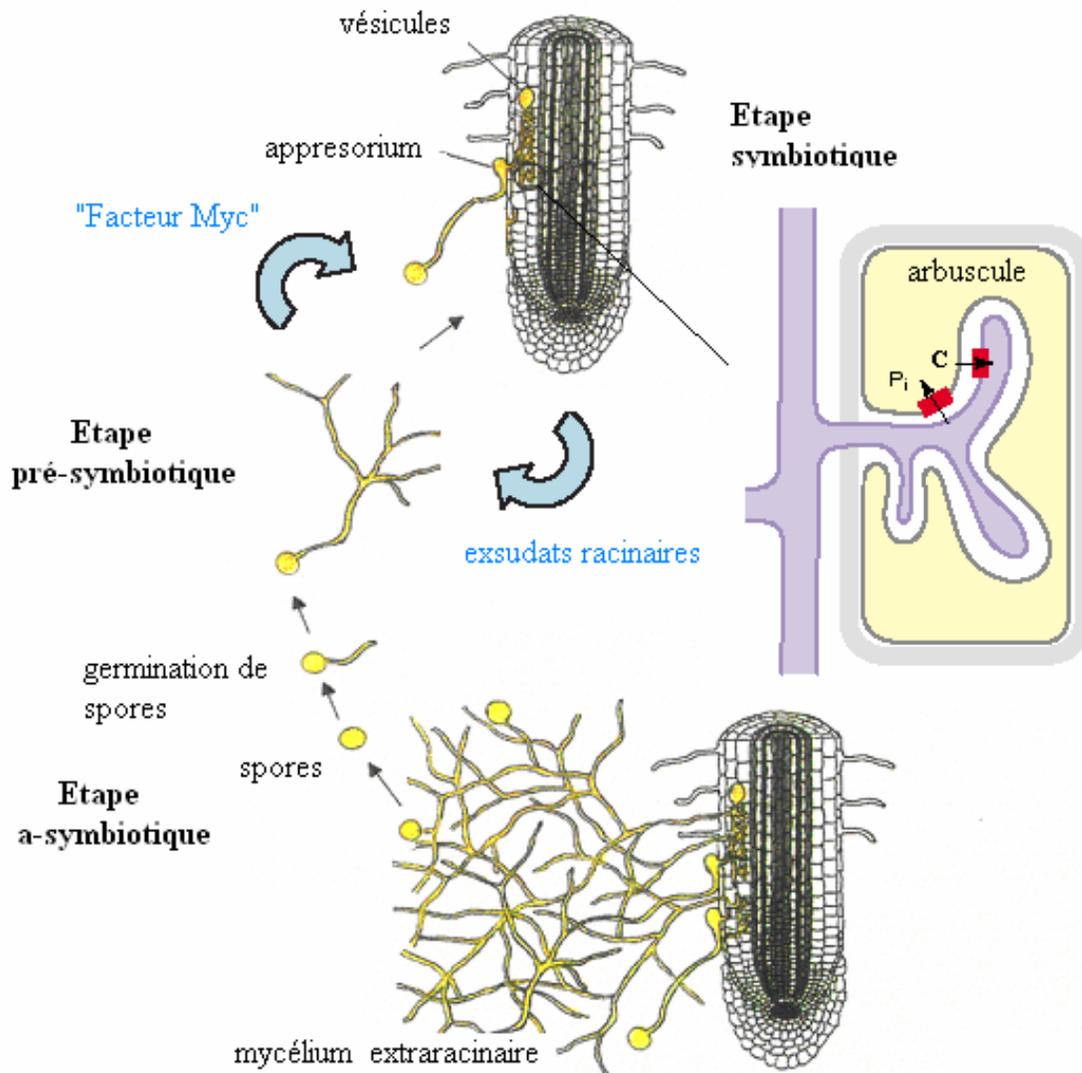


Fig. 4. Cycle de développement des champignons MA. La germination généralement spontanée des spores correspond à la phase a-symbiotique. Une première communication entre la plante et le champignon (avant tout contact physique) s'établit lors de l'étape pré-symbiotique. Ensuite, la formation d'un appressorium est suivie par la colonisation symbiotique des cellules corticales de la racine. Le développement des arbuscules met en place une interface entre la plante et le champignon où les échanges nutritionnels auront lieu. Modifié d'après Balestrini et Lanfranco, 2006.

polymorphisme observé à l'intérieur d'une spore n'est pas si important. Pour eux les champignons MA seraient homocaryotiques et leurs noyaux haploïdes (Stukenbrock et Rosendahl, 2005). Les études dans ce domaine progresseront quand le programme (en cours) du séquençage du génome de *Glomus intraradices* sera achevé.

II.2. Cycle de vie des champignons MA

On peut retrouver des champignons MA dans la plupart des écosystèmes terrestres. Les différentes étapes de la colonisation des racines par les champignons MA sont illustrées dans la figure 4. Les spores de champignon MA sont généralement produites dans le sol à partir du mycélium extraracinaire. Leur taille varie entre 40 et 500µm selon les espèces. Bien qu'elles puissent germer spontanément et alors qu'elles contiennent d'importantes quantités de lipides, la croissance des hyphes germinatifs est très limitée. Cette étape, encore **a-symbiotique**, représente le seul moment où le champignon est d'une certaine manière autonome. Le passage vers l'étape **pré-symbiotique** se fait par la reconnaissance de molécules exsudées par les racines de la plante hôte. La croissance et la ramification des hyphes germinatifs sont alors fortement stimulées (Bécard et al., 2004). Grâce à ce phénomène très précoce, la probabilité de contact entre le champignon et les racines augmente. Le champignon émet également des molécules non encore caractérisées, les facteurs *Myc*, qui permettent à la plante de le reconnaître comme un possible symbionte (révisé par Paszkowski, 2006a).

Au contact de la racine le champignon forme des appressoria qui sont des structures d'attachement puis de pénétration des cellules de l'épiderme (pénétration pouvant se réaliser en 36h). A ce stade d'autres signaux fongiques doivent intervenir qui entraînent un réarrangement cytoplasmique des cellules épidermiques et la formation d'un appareil de pré-pénétration (APP) grâce auquel le champignon pourra traverser la cellule végétale (Genre et al., 2005). Les hyphes du champignon vont ensuite progresser de manière intercellulaire jusqu'aux cellules du cortex racinaire, où ils formeront des structures intracellulaires très ramifiées appelées **arbuscules**. L'arbuscule n'est pas en contact direct avec le cytoplasme de la cellule végétale. La membrane plasmique de la cellule végétale augmente considérablement sa surface et s'invagine tout autour. C'est à cette interface cellulaire que les échanges de nutriments entre les partenaires ont principalement lieu (Reinhardt, 2007). Par exemple la membrane plasmique végétale et celle du champignon présentent à ce niveau des transporteurs spécifiques de phosphate et des H⁺-

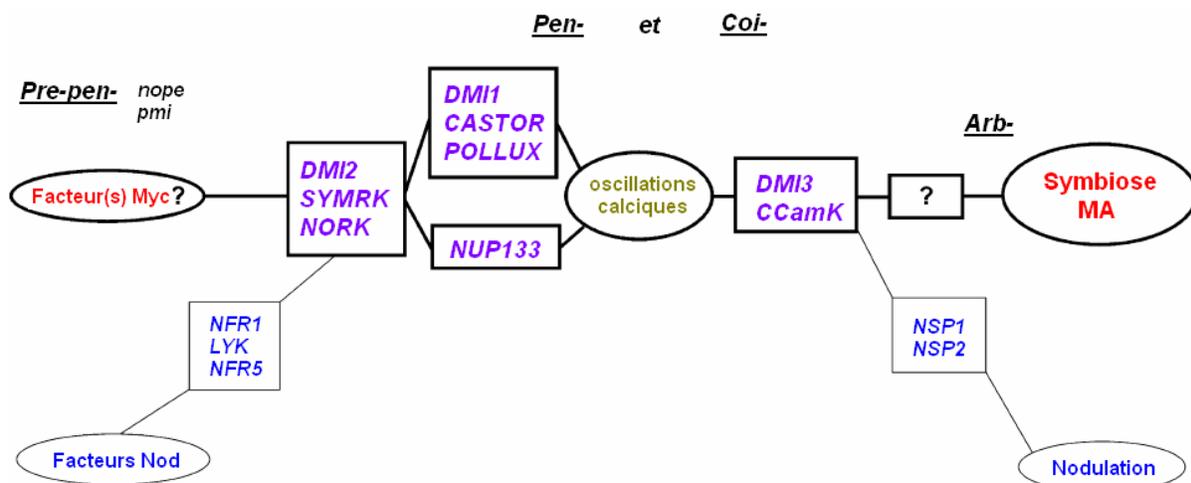


Fig. 5. Représentation hypothétique de la voie de signalisation de la symbiose MA. La convergence (gènes en mauve) dans différentes étapes de la cascade de signalisation entre la nodulation et la symbiose MA a été mise en évidence par l'analyse des mutants groupés dans deux catégories, *Pen-* et *Coi-*. L'étude des mutants dans les étapes en amont (*PrePen-*) et en aval (*Arb-*) de la voie commune a permis d'identifier des étapes spécifiques à la symbiose MA. Modifié d'après Paszkowski, 2006.

ATPases génératrices d'énergie (Bucher, 2007). La sénescence de l'arbuscule, après 4-10 jours de symbiose, semble être fortement sous le contrôle de la plante, peut-être pour limiter l'extension du champignon MA dans les racines (Strack et al., 2003). Certaines espèces de champignons MA forment aussi d'autres structures intraracinaires impliquées dans le stockage de lipides : les vésicules. Mais une caractéristique que partagent toutes les espèces de champignons MA est la formation simultanée d'un important réseau d'hyphes extraracinaires dont les fonctions sont multiples : le recrutement des nutriments dans les micro-infractuosités du sol, la formation de nouvelles mycorhizes avec les racines de plantes voisines (infections secondaires), enfin, chez la plupart des espèces, la production de nouvelles spores (révisé par Paszkowski, 2006a; Balestrini et Lanfranco, 2006; Requena et al., 2006)

La découverte de plantes mutantes bloquées dans la colonisation racinaire a permis de faire progresser nos connaissances sur les principales étapes de la mycorhization. Dans la plupart des cas, ces plantes mutantes avaient été identifiées premièrement comme incapables de rentrer en symbiose avec rhizobium car incapables de noduler. Les nodules sont d'organes racinaires néoformés dans lesquels les bactéries fixent l'azote. Il a été ainsi mise en évidence que certaines étapes de signalisation précoce de la symbiose MA et de la nodulation sont partagées par les deux symbioses (Fig. 5) (Albrecht et al., 1999). Les premiers mutants *Nod-Myc-* ont été identifiés chez le pois (*Pisum sativum*) (Harrison, 2005). Chez ces mutants la colonisation mycorhizienne était arrêtée principalement dans la formation de l'appressorium (phénotype *Pen-*) ou dans des étapes plus en aval, la pénétration et la colonisation du cortex par le champignon (phénotype *Coi-*). Les gènes mutés dans les trois mutants *Pen-* de pois ont été identifiés ainsi que leurs orthologues chez le *Lotus* et chez *Medicago*. Il s'agit des gènes *DMI1*, *DMI2* et *DMI3* (*Doesn't Make Infections*) impliqués à la fois dans la transduction du signal des facteurs *Nod* dans la symbiose rhizobienne, et de l'hypothétique(s) facteur(s) *Myc* dans la symbiose MA (révisé par Marsh et Schultze, 2001; Parniske, 2004; Paszkowski, 2006a).

Malheureusement peu des mutants dans les étapes en amont ou en aval des étapes *Pen-* et *Coi-* ont été identifiées. Néanmoins quelques mutants, principalement dans des plantes non-légumineuses, ont permis d'approfondir ces étapes spécifiques à la symbiose MA, c'est-à-dire, les événements de signalisation avant contact physique et la formation d'arbuscules (Marsh et Schultze, 2001; Parniske, 2004). Un des premiers mutants à être identifié en amont de l'étape *Pen-*, est le mutant *pmi* chez la tomate (*Lycopersicon esculentum*). Il a été identifié après de

laborieux travaux de criblage au microscope. Ce mutant n'est semble-t-il pas affecté dans sa capacité à produire les molécules inductrices ; il exsuderait plutôt une forte quantité d'inhibiteurs de la croissance du champignon (David-Schwartz et al., 2001). Un autre mutant précoce est le mutant *nop1* chez le maïs (*Zea mays*). Il a été criblé par une méthode élégante profitant de la caractéristique des racines mycorhizées de maïs à se colorer d'un pigment jaune. Le mutant *nop1* résiste à la mycorhization par *Glomus mosseae* mais les causes de ce phénotype sont encore inconnues (Paszkowski et al., 2006).

Du côté des champignons MA, les approches génétiques sont peu envisageables puisque ces organismes sont très difficilement transformables. Très récemment une étude utilisant des méthodes de biolistique et de transformation avec *A. tumefaciens* a montré que l'on pouvait transformer des spores de *G. intraradices* mais de façon transitoire et avec un faible taux de succès (Helber et Requena, 2008). Ceci, rajouté au fait que les champignons MA ne peuvent être cultivés en culture pure, fait que l'étude des premières étapes de la symbiose endomycorhizienne est difficile.

Malgré cela, nous allons voir que des études récentes ont tout de même permis d'élucider plusieurs aspects de la communication précoce entre les plantes et les champignons MA.

II.3. Dialoguer pour mieux se reconnaître

Dans la symbiose MA, il est depuis longtemps connu que le CO₂ et des molécules présentes dans les exsudats racinaires stimulent la croissance des champignons MA (Mosse et Hepper, 1975; Bécard et Piché, 1989; Giovannetti et al., 1993). Il semblerait que des molécules contenues dans le mucilage sécrété par la plante et les cellules de l'apex racinaire soient également actives (Nagahashi et Douds, 2004). Plusieurs études ont été réalisées afin de caractériser la nature chimique de ces molécules stimulatrices. Les premières d'entre-elles ont montré qu'il s'agissait de(s) molécule(s) à faible poids moléculaire, inférieur(s) à 500 Da (Giovannetti et al., 1996), de nature hydrophobe ou amphiphile et actives à très faibles concentrations (Buée et al., 2000). Des molécules présentant ces caractéristiques telles que les brassinolides, l'acide jasmonique, les facteurs *Nod*, l'acide salicylique ont été testées mais n'ont présenté aucune activité. Les flavonoïdes, comme dans le cas de la symbiose rhizobienne, ont fait l'objet d'études nombreuses car il a été montré que certains d'entre eux stimulaient la croissance de certains champignons MA ainsi que la mycorhization (révisé par Steinkellner et al., 2007).

Mais il a aussi été montré que des maïs mutants déficients en chalcone synthase et incapables de synthétiser les flavonoïdes pouvaient être mycorhizés par plusieurs espèces de champignons MA tout à fait normalement. Ces résultats écartaient la possibilité que les flavonoïdes soient des molécules signal clé dans la mycorhization (Bécard et al., 1995). Il a été proposé que ces molécules jouent un rôle pour favoriser certaines associations spécifiques plante-champignon MA, même si on n'observe pas de spécificité d'hôte stricte dans la symbiose endomycorhizienne (Steinkellner et al., 2007).

La fraction lipophile semi-purifiée contenant les molécules racinaires stimulatrices encore inconnues, a été appelée « Branching Factor » (« BF ») (Buée et al., 2000). Ce nom a été donné en référence à la ramification intense des hyphes du champignon classiquement observée lorsque ce dernier croît à proximité d'une racine (Mosse et Hepper, 1975; Powell, 1976; Bécard et Fortin, 1988; Giovannetti et al., 1993; Giovannetti et al., 1996). Cette ramification intense peut être provoquée artificiellement *in vitro* sur des hyphes germinatifs (Nagahashi et Douds, 1999; Buée et al., 2000) et sert aujourd'hui de biotest rapide et sensible pour étudier l'effet des exsudats racinaires sur les champignons MA³. Cette ramification a été observée uniquement en réponse à des exsudats provenant de plantes mycotrophes. Les exsudats de plantes non-hôtes (dans la nature certaines espèces de plantes ne forment pas d'associations symbiotiques endomycorhiziennes) sont restés inactifs (Bécard et Piche, 1990; Schreiner et Koide, 1993; Giovannetti et al., 1993; Buée et al., 2000), suggérant l'importance de cette réponse fongique dans la reconnaissance de la plante hôte.

Par des approches moléculaires et cytologiques, il a été montré que la ramification des hyphes en réponse au BF, observable après 24h, est précédée d'une augmentation de l'activité mitochondriale chez le champignon. L'activité respiratoire ainsi que la consommation d'oxygène par le champignon augmentent significativement après 2 heures. La morphologie et l'orientation des mitochondries dans les cellules fongiques sont aussi modifiées après 3 heures (Tamasloukht et al., 2003). Le champignon MA après stimulation par le « BF » passera ainsi d'une étape à-symbiotique à une étape pré-symbiotique, plus active, pendant laquelle son catabolisme et l'utilisation de ses réserves sont véritablement déclenchés (Bécard et al., 2004).

Il a été suggéré qu'une fois le catabolisme du champignon MA activé, l'exsudation de

³ Le bioessai consiste à faire germer les spores de champignons. Après 5 à 6 jours de croissance, on dépose de chaque côté du tube germinatif quelques microlitres de l'échantillon à tester et après 24 ou 48h d'incubation, les nouvelles ramifications d'hyphes formées sont comptées.

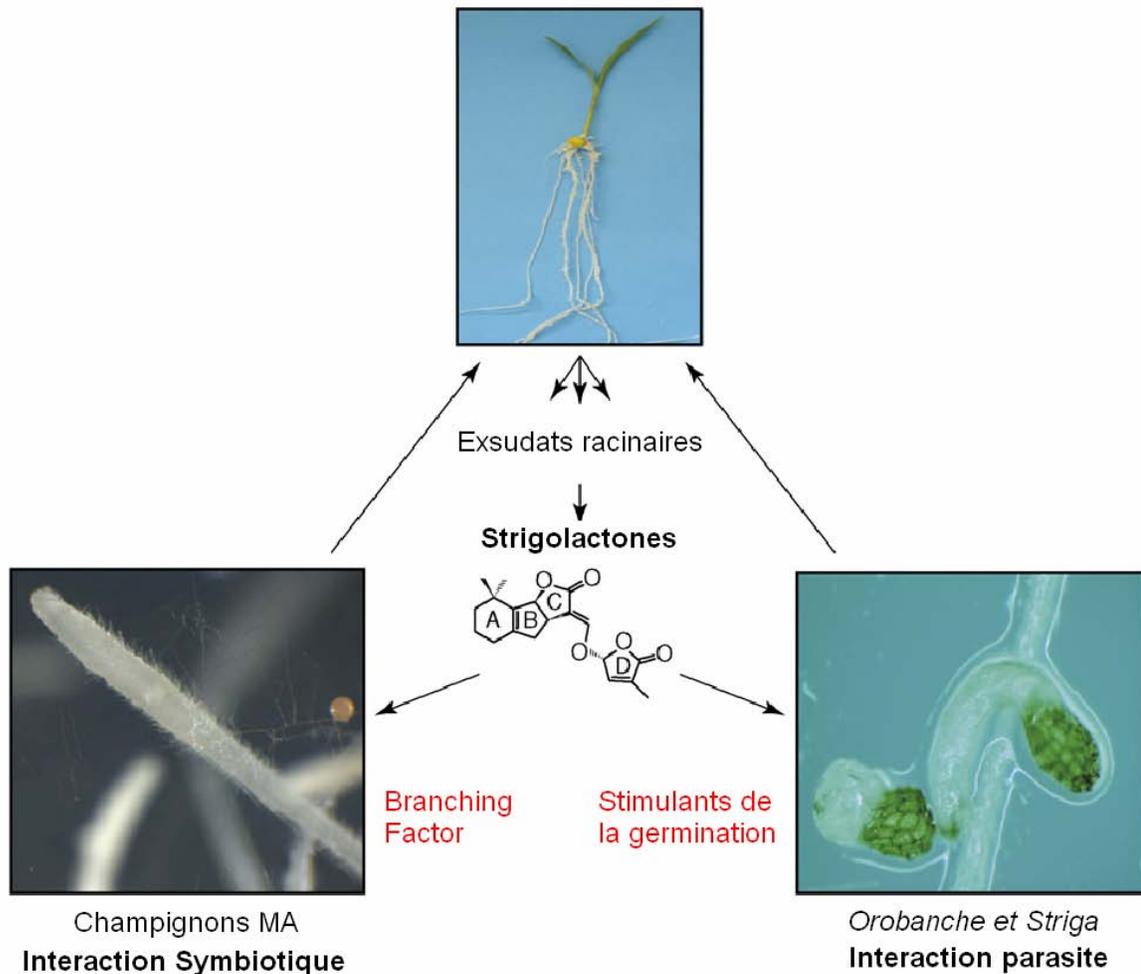


Fig. 6. Rôle des strigolactones dans la symbiose MA et dans l'interaction avec *Striga* et *Orobanche*. Les strigolactones exsudées par les racines des plantes ont un double rôle dans la rhizosphère. Premièrement elles servent de molécules signal dans la reconnaissance de la plante hôte par les plantes parasites (organismes néfastes pour la plante) en stimulant la germination de leurs graines, et aussi en stimulant la croissance pré-symbiotique des champignons MA (organismes bénéfiques pour la plante). D'après Bouwmeester et al., 2007.

molécule(s) signal(s) produite(s) par celui-ci permet à la plante de reconnaître son partenaire fongique (Kosuta et al., 2003; Olah et al., 2005). Cette hypothèse a été inspirée principalement par l'analogie des gènes impliqués dans la cascade de signalisation pendant l'établissement de la symbiose MA et la symbiose rhizobienne. Dans la symbiose rhizobienne, les flavonoïdes exsudés par les plantes, sont perçus par la bactérie et déclenchent l'expression des gènes *Nod*, responsables de la synthèse de molécules lipochitoooligosaccharidiques, appelé facteurs *Nod*. La spécificité hôte-bactérie repose principalement sur la reconnaissance par la plante des facteurs *Nod* dont la structure est caractéristique de chaque espèce bactérienne (Debelle et al., 2001). Les facteurs *Nod* se lient à des récepteurs situés au niveau des poils absorbants de la racine, ce qui déclenche une voie de signalisation complexe qui conduira à la formation d'un nouvel organe racinaire, le nodule, où les bactéries vont proliférer et fixer l'azote atmosphérique (Kistner et Parniske, 2002).

Il a donc été proposé que le champignon secrète une ou plusieurs molécules signal appelées « Facteurs *Myc* », par analogie aux facteurs *Nod* (Kosuta et al., 2003). Les premières expériences démontrant l'existence d'un signal fongique ont été réalisées en plaçant une membrane perméable entre les racines de la plante hôte et les hyphes du champignon, empêchant tout contact physique. L'activation du gène *MtENOD11* (*Medicago truncatula* Early *NOD*ulin *11*), impliqué dans les premières étapes de la symbiose MA (et rhizobienne), était observé en réponse à des signaux mobiles provenant des hyphes ramifiés du champignon (Kosuta et al., 2003). Ce signal fongique stimulait également dans la plante l'expression de certains gènes (Weidmann et al., 2004), et la formation des racines latérales, représentant les points d'infection privilégiés des champignons MA (Olah et al., 2005). Finalement, il a été démontré que les molécules émises par le champignon sont capables de moduler la concentration en calcium dans le cytosol des cellules racinaires (Navazio et al., 2007). L'implication du calcium comme messenger intracellulaire dans les premières étapes de la symbiose rhizobienne avait été précédemment démontré (Cardenas et al., 2000). Si l'existence de signaux fongiques produits par les champignons MA est clairement établi, la structure chimique des facteurs *Myc* reste encore inconnue.

En revanche, l'identité chimique de l'une des molécules actives produites par la plante présente dans le « BF » a été récemment élucidée de façon indépendante par Akiyama et al. (2005) et Besserer et al. (2006) (Fig. 6). Parmi les molécules actives contenues dans le « BF »

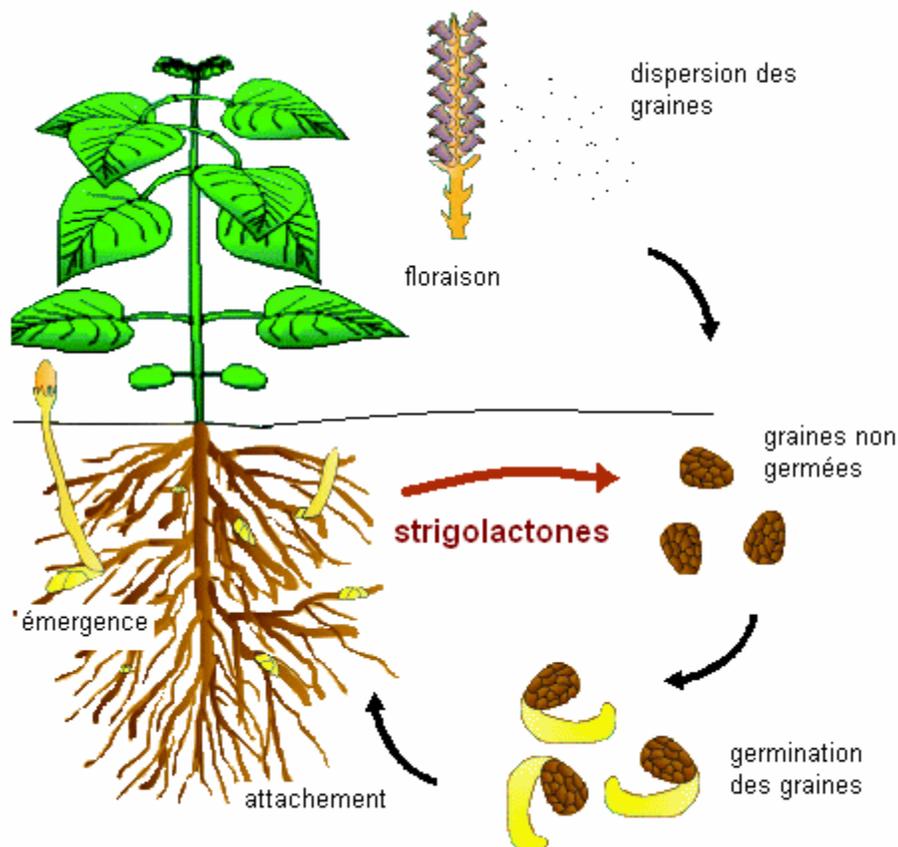


Fig. 7. Cycle de vie des plantes parasites *Orobanche* et *Striga* (Schéma pour les espèces d'*Orobanche*). Certaines molécules (strigolactones, principalement) présentes dans les exsudats racinaires des plantes hôtes vont stimuler la germination des graines des plantes parasites. Les graines germées vont s'attacher aux racines des plantes *via* un haustorium par lequel elles vont pomper de l'eau et des éléments nutritifs qui transitent dans le xylème de la plante hôte. Ces nutriments vont apporter à la plante parasite l'énergie nécessaire pour émerger et former de fleurs, qui produiront ensuite des centaines des petites graines. D'après Rispaïl et al., 2007.

certaines appartiennent à la famille des strigolactones. Ces molécules avaient été déjà identifiées comme les signaux végétaux utilisés par les plantes parasites des genres *Striga* et *Orobanche* pour reconnaître leur plante hôte. Avant de détailler la découverte de ces auteurs, il semble nécessaire d'introduire la biologie de ces plantes parasites et de présenter la famille des strigolactones.

III. Rôle des strigolactones dans le cycle de vie des plantes parasites *Striga* et *Orobanche*

Une caractéristique intéressante des plantes parasites *Striga* et *Orobanche* est qu'elles sont, comme les champignons MA, biotrophes obligatoires. Leurs graines sont extrêmement petites (entre 150 et 300µm) et leurs réserves très limitées. La plantule ne pourra se développer qu'après avoir formé, en guise de radicule, une sorte de suçoir appelé haustorium, capable de prélever sur la racine d'une plante hôte l'eau et les nutriments nécessaires à son développement. Le contrôle de la germination des *Striga* et *Orobanche* par les strigolactones, molécules indiquant la présence d'une plante hôte à proximité, est donc une étape clé dans le cycle de vie de ces organismes (Yoder, 1999).

Les espèces du genre *Orobanche* sont des plantes holoparasites, complètement dépourvues de chlorophylle et entièrement dépendantes de leur plante hôte. Il a été répertorié environ 100 espèces d'*Orobanche* dont seulement cinq parasitent plusieurs espèces de plantes dicotylédones comme les légumineuses et les solanacées, cultivées majoritairement en Europe et en Amérique (Humphrey et al., 2006). Les dégâts économiques causés par l'*Orobanche* ont été estimés à environ un milliard de dollars par an (Aly, 2007).

Les espèces du genre *Striga* sont hémiparasites, elles peuvent avoir une faible activité photosynthétique mais elles ont besoin de la plante hôte pour l'absorption d'eau et de minéraux (Matusova et Bouwmeester, 2006). Les 28 espèces de *Striga* parasitent principalement les plantes monocotylédones comme le maïs, le sorgho et le millet, cultivées dans les régions sèches d'Afrique. Il a été estimé qu'environ deux tiers des 70 millions d'hectares cultivables en Afrique sont infestés par *Striga*, qui affecte l'alimentation de plus de 300 millions de personnes (Aly, 2007).

Le cycle de vie des deux genres est très similaire (Fig. 7). Des centaines de petites graines peuvent être produites par une seule plante parasite. Ces graines sont capables de rester en

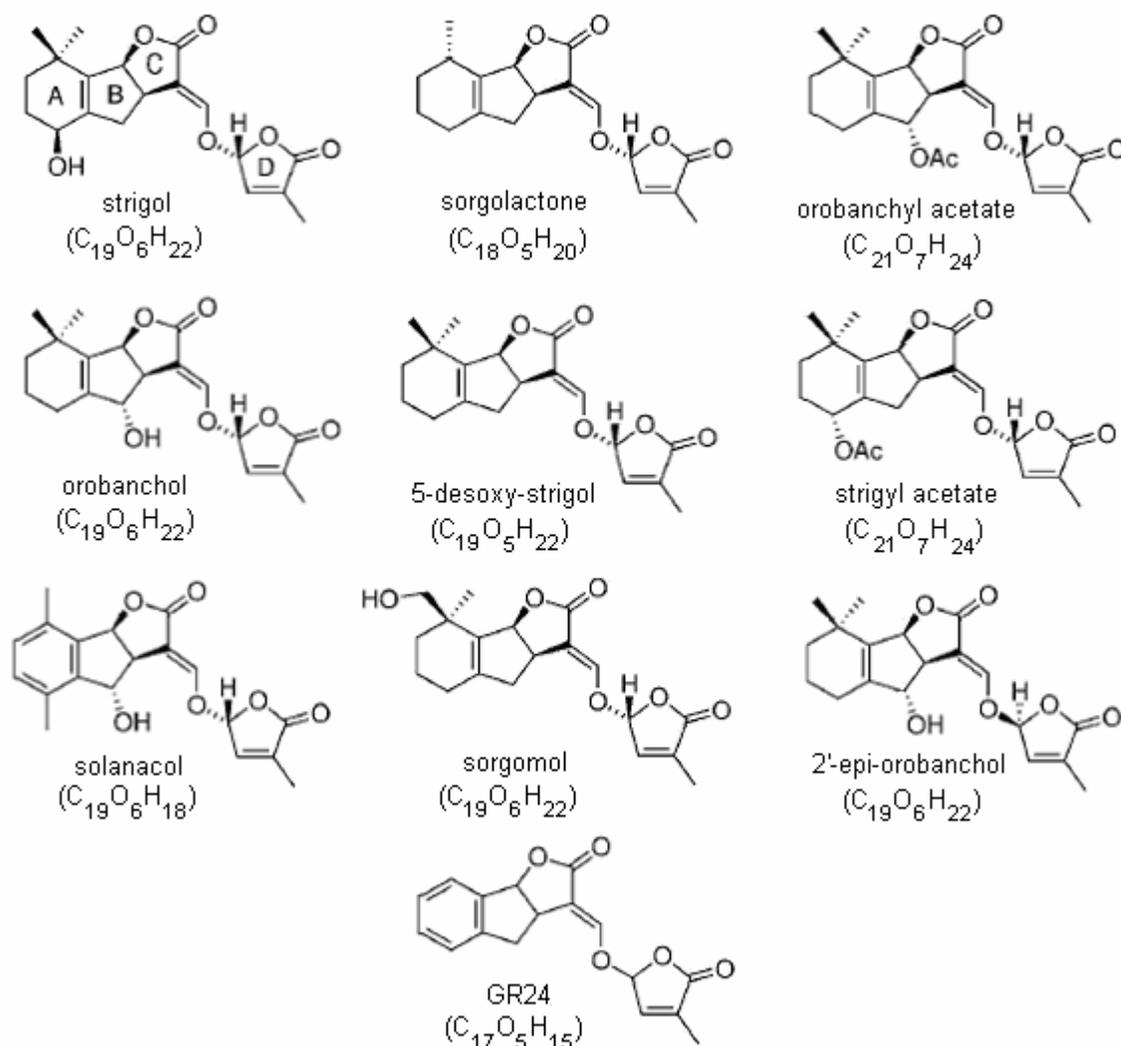


Fig. 8. Structure chimique des neuf strigolactones connues. Elles présentent une structure très similaire formée de quatre cycles A, B, C et D. Seules quelques modifications (principalement dans les cycles A et B) les distinguent. Elles ont été caractérisées dans les exsudats racinaires de plantes monocotylédones et dicotylédones. L'utilisation d'analogues de synthèse (ex. GR24) a facilité les expériences visant étudier le rôle des strigolactones dans les interactions avec les plantes parasites et avec les champignons MA.

dormance pendant plusieurs années et de ne germer que lorsqu'elles détectent les strigolactones secrétées par la plante hôte. Cette étape est précédée par une période de conditionnement pendant laquelle plusieurs paramètres climatiques (température, humidité) vont devoir être réunis (Yoder, 1999). Lors de sa germination, la graine forme une pseudo-radicule qui va s'allonger vers la racine hôte et s'attacher à celle-ci *via* un haustorium. La formation de l'haustorium est aussi induite par des signaux végétaux, principalement des benzoquinones. Ces molécules sont libérées après dégradation de la paroi de la cellule hôte suite à une oxydation par des H₂O₂ excrétés par le parasite (Keyes et al., 2000). Cette étape représente une deuxième phase de reconnaissance de l'hôte par la plante parasite. Il existe des plantes appelées « faux hôtes » capables de stimuler la germination des graines de plantes parasites (*via* les strigolactones), mais pas le développement de l'haustorium, qui serait inhibé par la sécrétion de phytoalexines (Humphrey et al., 2006). L'étape suivante est caractérisée par l'établissement du parasite dans le xylème de la plante hôte, lui permettant de s'approvisionner en nutriments et ensuite de former un tubercule. Ces tubercules deviendront des plantes adultes qui produiront à leur tour plusieurs centaines de graines, achevant ainsi le cycle de développement (Bouwmeester et al., 2003).

En fait trois familles de molécules ont été décrites comme étant stimulatrices de la germination des graines de plantes parasites : la dihydrosorgoleone, les sesquiterpènes lactones et les strigolactones (Bouwmeester et al., 2003). Ces dernières semblent jouer le rôle le plus important dans la germination car, à la différence des deux autres molécules, elles agissent à des concentrations extrêmement faibles (Aly, 2007).

La première strigolactone identifiée à partir des exsudats de 300 000 plantes de cotonnier (un faux hôte) a été le strigol (Cook et al., 1966). C'est seulement 20 ans plus tard que la deuxième strigolactone, la sorgolactone, a été isolée à partir de 16.000 plantes de sorgho (Hauck et al., 1992). Un très grand nombre de plantes était requis à cette époque car les strigolactones sont produites en très faibles quantités, elles sont instables et les méthodes de détection étaient alors peu sensibles. Depuis la découverte de ces premières molécules, neuf strigolactones seulement ont été identifiées (Fig. 8). Aujourd'hui le nombre de plantes requises est plus raisonnable, grâce à l'utilisation de spectromètres de masse plus sensibles. On a détecté des strigolactones dans plusieurs groupes de plantes vasculaires chez les monocotylédones et les dicotylédones, ce qui suggère que ces molécules sont produites par un très grand nombre d'espèces végétales.

Toutes les strigolactones caractérisées à ce jour présentent une structure chimique très

similaire : un cycle à 6 carbones (A), un cycle à 5 carbones (B), un cycle lactone à 4 carbones (C) couplé à un dernier cycle lactone (D) *via* un pont enol-éther. Seules quelques substitutions au niveau des cycles A et B (du type méthyle, hydroxyle ou O-acétyle) les différencient (Fig. 8). Les strigolactones sont produites et actives à très faibles concentrations mais le mode d'action de ces molécules comme stimulateurs de la germination est encore très hypothétique. Une étude avec différents analogues de synthèse de strigolactones a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'activité biologique se trouverait principalement au niveau des cycles C–D. Le clivage du pont enol-éther pourrait permettre la reconnaissance des strigolactones par d'éventuels récepteurs situés à la surface de la graine parasite (Mangnus et Zwanenburg, 1992). La très grande quantité de graines produites par les plantes parasites et leurs remarquables viabilités (capables de germer après plus de 10 ans) rendent la lutte contre le *Striga* et l'*Orobanche* particulièrement difficile. Des analogues chimiques utilisés comme « germinateurs suicide » ont été développées dans le but de mettre au point des stratégies de lutte contre les plantes parasites. Le GR24 (Fig. 8), un des plus actifs, est capable d'induire la germination des graines de plantes parasites à des concentrations très faibles (10^{-8} M) mais pas aussi faibles que les molécules naturelles (10^{-10} M pour la sorgolactone par exemple) (Wigchert et al., 1999). Ces stratégies n'ont pas été poursuivies car la synthèse chimique du GR24 est coûteuse et l'utilisation au champ de cette molécule, trop instable, ne s'est pas avérée efficace. La recherche de variétés de plantes résistantes a été aussi envisagée, sans succès, probablement à cause de la faible héritabilité génétique du caractère de résistance aux plantes parasites (Rispaïl et al., 2007).

IV. Le « branching factor » contient des strigolactones

Akiyama et al. (2005) ont purifié et identifié, à partir des exsudats racinaires d'une plante dicotylédone, *Lotus japonicus*, une fraction active sur le champignon qui contenait une strigolactone, le 5-desoxy-strigol. Seules quatre structures de strigolactones étaient alors connues: le strigol, l'orobanchol, la sorgolactone et l'alectrol, toutes identifiées comme stimulatrices de germination des plantes parasites. Cette découverte révélait donc l'existence d'une nouvelle strigolactone, le 5-desoxy-strigol, que les auteurs ont proposé comme pouvant être un des précurseurs de la biosynthèse des autres molécules de la famille, ceci en raison de l'absence de l'hydroxyle porté par les cycles A ou B comme dans l'orobanchol, l'alectrol ou le strigol.

Dans le même temps l'équipe de G. Bécard arrivait à la même conclusion après avoir analysé le « branching factor », cette fois d'une monocotylédone, le sorgho (Besserer et al., 2006). J'ai participé à ce travail au cours de mon stage de master en purifiant et analysant les molécules végétales actives sur les champignons MA. Nous avons montré que les exsudats racinaires de sorgho actifs sur le champignon MA *Gigaspora rosea*, contenaient une strigolactone, la sorgolactone. Par ailleurs, nous avons testé sur le champignon l'activité du GR24, et celle d'autres molécules actives sur les graines d'*Orobanche*. Le GR24 et la sorgolactone se sont montrés remarquablement actifs, jusqu'à 10^{-11} M et 10^{-13} M, respectivement. Par contre d'autres molécules connues pour être actives sur la germination des graines de plantes parasites et qui ne sont pas des strigolactones, le parthénolide, l'artémisinine et la dihydrosorgoléone, se sont avérées inactives sur le champignon. Nous avons montré que les strigolactones étaient actives sur plusieurs espèces de champignons MA phylogénétiquement distantes. D'autre part, la réponse du champignon aux strigolactones mimait parfaitement celle générée par les exsudats racinaires, tant au niveau morphologique (ramification intense des hyphes) qu'au niveau mitochondrial. En effet, dès 1 heure de traitement au GR24, la densité et le mouvement des mitochondries dans les hyphes du champignon augmentent. Un travail plus approfondi a ensuite confirmé que la mitochondrie et son métabolisme oxydatif étaient une cible d'activation précoce chez les champignons MA (Besserer et al., 2008).

V. Voie de biosynthèse hypothétique des strigolactones

Les strigolactones ont initialement été proposées comme rattachées à la famille des sesquiterpènes lactones (Bouwmeester et al., 2003). Les sesquiterpènes font parties d'une grande famille, les terpènes ou isoprénoides. Les terpènes sont composés d'une ou de plusieurs unités d'isoprène, molécule composée de 5 carbones. La classification des molécules terpéniques est basée sur le nombre de carbones qui les composent. C'est ainsi qu'un terpène formé à partir de deux isoprènes est un monoterpène (10 carbones) ; de trois isoprènes, un sesquiterpène (15 carbones) ; de quatre isoprènes, un diterpène (fusion de 2 monoterpènes, 20 carbonnes). Un terpène de 30 carbones est un triterpène ; de 40 carbones, un tetraterpène (comme les caroténoïdes) et de plus de 50 carbones, un polyterpène.

Les rôles des terpènes sont multiples dans la plante. On les retrouve en tant qu'hormones,

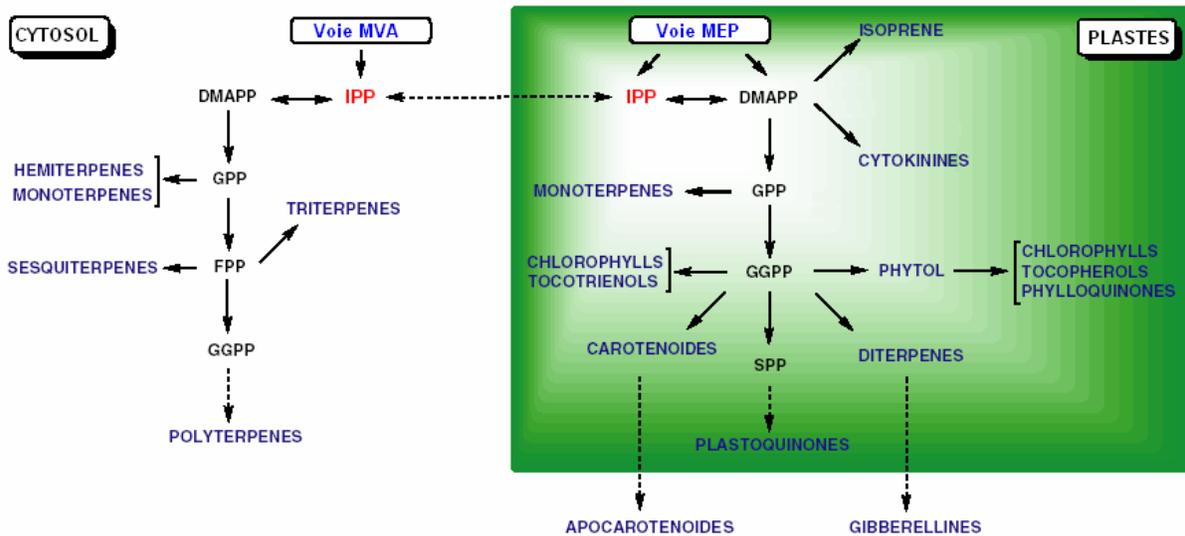


Fig. 9. Voie de biosynthèse des différents isoprenoïdes. Représentation de l'origine biosynthétique des principaux terpènes produits par les plantes. MVA, mevalonate; MEP, 2-C-methylerythritol-4-phosphate; IPP, isopentenyl diphosphate; DMAPP, dimethylallyl diphosphate; GPP, geranyl diphosphate; FPP, farnesyl diphosphate; GGPP, geranylgeranyl diphosphate, SPP, solanesyl diphosphate. Modifié d'après Bouvier et al., 2005.

pigments de la photosynthèse, constituants des membranes ou en tant que métabolites secondaires impliqués dans diverses interactions avec des herbivores, des microorganismes, des insectes pollinisateurs, etc. (Bouvier et al., 2005b). Leur lieu de synthèse varie en fonction du type de terpène (Fig. 9). Les sesquiterpènes, les phytostéroïdes entre autres, sont principalement synthétisés dans le cytosol par la voie de l'acide mévalonique (MVA). La synthèse des monoterpènes, diterpènes, caroténoïdes, plastoquinones et phylloquinones est, elle, plastidiale et utilise comme précurseur le 2-C-méthylerythritol-4- phosphate (MEP) (Penuelas et Munne-Bosch, 2005).

En raison des faibles quantités de strigolactones produites dans les exsudats des plantes (entre 2–15pg/plante/jour) l'utilisation de techniques comme le marquage isotopique de précurseurs afin de définir leur origine biosynthétique, n'a pu être envisagée (Bouwmeester et al., 2003). C'est grâce à une étude utilisant des mutants et des plantes traitées avec des inhibiteurs de deux voies de synthèse des terpènes que, très récemment, les strigolactones ont été identifiées comme issue de la voie MEP et plus particulièrement de la voie de biosynthèse des caroténoïdes (Matusova et al., 2005).

Les caroténoïdes sont des molécules à 40 carbones pouvant avoir plus de 15 doubles liaisons C=C. Plus de 600 composés ont été identifiés dans cette famille. Ils sont synthétisés par une grande variété d'organismes : les plantes photosynthétiques, certains protistes, les bactéries et les champignons (Moise et al., 2005). Dans les plantes, les caroténoïdes sont principalement impliqués dans la photosynthèse. Ils participent à la collecte de l'énergie lumineuse en tant que pigment secondaire (rôle collecteur de lumière) ou en dissipant l'énergie de la chlorophylle en cas d'excès de lumière (rôle photoprotecteur) (Penuelas et Munne-Bosch, 2005). La première étape dans la synthèse des caroténoïdes est le couplage de deux molécules de geranylgeranyl diphosphate (GGPP) pour former le phytoène, carotène non-coloré. Cette réaction est réalisée par l'enzyme phytoène synthase (PSY). Le phytoène est ensuite plusieurs fois oxydé par différentes désaturases produisant 4 carotènes colorés, le phytofluène, le ζ -carotène, le neurosporène et le lycopène. Le lycopène est ensuite cyclisé en deux fois par deux cyclases différentes, amenant à la production de l' α et du β -carotène. Ces derniers sont les précurseurs principaux des xanthophylles, molécules oxygénées à différentes positions de leur chaîne carbonée. La lutéine provient de l' α -carotène, et la violaxanthine et la zéaxanthine proviennent du β -carotène (Busch et al., 2002).

Il est nécessaire d'expliquer davantage les approches pharmacologique et génétique

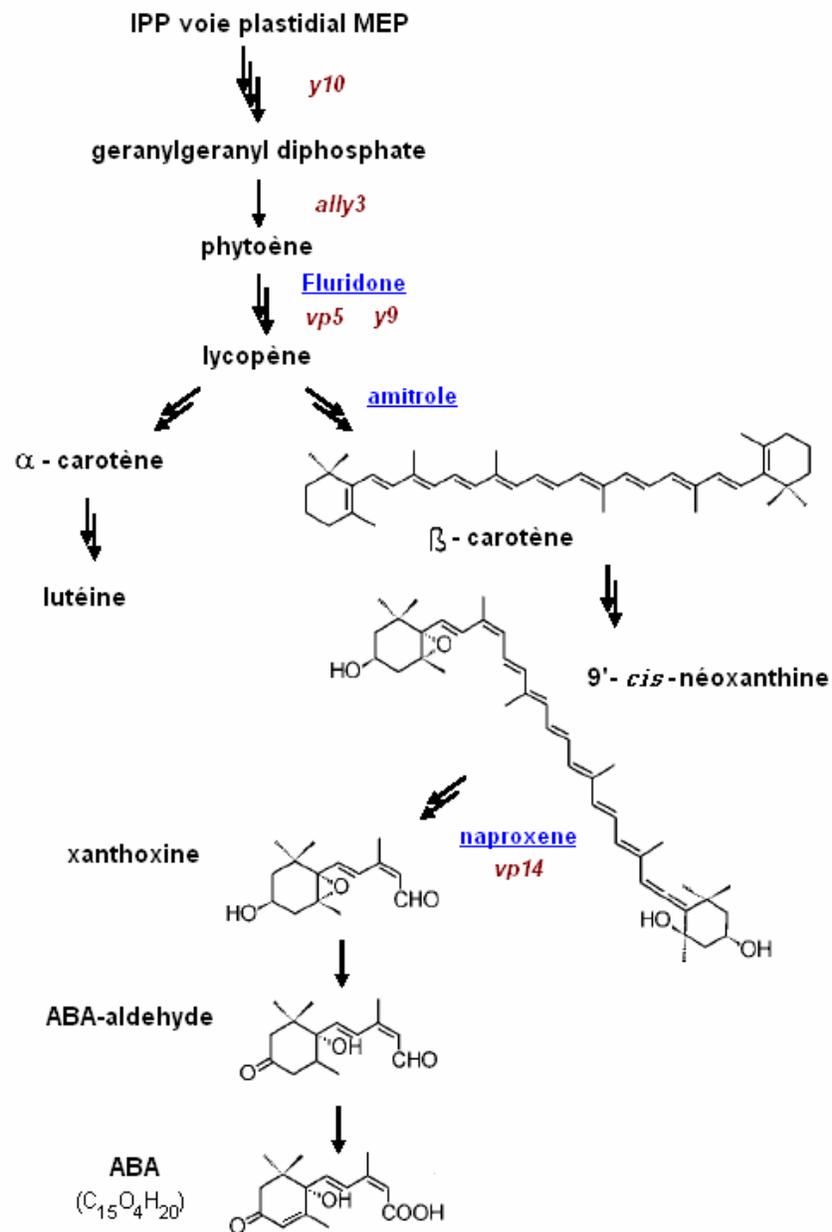


Fig. 10. Représentation des mutants (rouge) et des inhibiteurs (bleu) de synthèse et du clivage de caroténoïdes utilisés pour l'étude de Matusova et al, 2005. IPP, isopentenyl diphosphate ; MEP, 2-C-méthylerythritol-4-phosphate ; ABA, acide abscissique.

utilisées dans l'étude de Matusova et al. (2005) puisqu'elles ont été à la base de nos hypothèses de travail. Afin de déterminer si les strigolactones dérivent de la voie cytosolique ou plastidiale, les auteurs ont tout d'abord utilisé des inhibiteurs plus ou moins spécifiques de chacune des voies : la mevastatine pour bloquer la voie cytoplasmique et la fosmidomycine pour bloquer la voie plastidiale. Cette stratégie n'a pu aboutir à des résultats concluants puisqu'il semblerait que les précurseurs de chaque voie soient capables de transiter entre les deux compartiments cellulaires. Les auteurs ont alors envisagé de bloquer plus spécifiquement la voie des caroténoïdes. Cette voie est plastidiale, elle conduit à l'acide abscissique (ABA) dont la structure ressemble à celle des strigolactones. L'utilisation d'un biotest très sensible et spécifique (le test de germination des graines de plantes parasites⁴) avec les exsudats obtenus à partir d'une seule plante leur a permis de semi-quantifier la présence des molécules stimulatrices (strigolactones). Les mutants de maïs (*Zea mays*) utilisés dans cette étude étaient bloqués dans différentes étapes de la synthèse ou du clivage des caroténoïdes (Fig. 10). Les exsudats des mutants bloqués dans les premières étapes de la synthèse des caroténoïdes (*y10*, *ally*, *vp5*) n'ont stimulé que très faiblement (5%) la germination des graines de plantes parasites. Tous ces mutants présentaient un phénotype albinos dû à la carence en caroténoïdes. Un autre mutant (*y9*), également affecté dans la synthèse des caroténoïdes, mais plus en aval dans la voie de biosynthèse (conversion du ζ -carotène en lycopène), a produit des exsudats racinaires eux aussi moins stimulateurs. Un autre mutant utilisé dans cette étude était le *vp14* bloqué dans la synthèse de l'ABA (ne présentant pas de phénotype albinos). Ses exsudats se sont avérés plus actifs que ceux des mutants bloqués dans la synthèse des caroténoïdes. Les auteurs ont aussi utilisé des inhibiteurs capables de bloquer des étapes enzymatiques identiques ou proches de celles affectées chez les mutants. Ils ont traité des plantes de maïs, de niébé (*Vigna unguiculata*) et de sorgho (*Sorghum bicolor*) avec l'inhibiteur fluridone, qui bloque la même étape que le celle bloqué dans le mutant *vp5*, l'amitrole qui inhibe la conversion du lycopène en β -carotène et le naproxène qui agirait au même stade que le mutant *vp14*. L'activité sur la germination des graines de plantes parasites de ces exsudats de plantes traitées a été, comme pour ceux des mutants, fortement diminuée. Les résultats obtenus suite à ces expériences ont permis aux auteurs de conclure que :

⁴ Les graines préconditionnées des plantes parasites sont traitées avec les exsudats racinaires et, quelques jours après, le pourcentage de germination est déterminé. L'eau n'induit pas la germination et le GR24 est pris comme témoin positif.

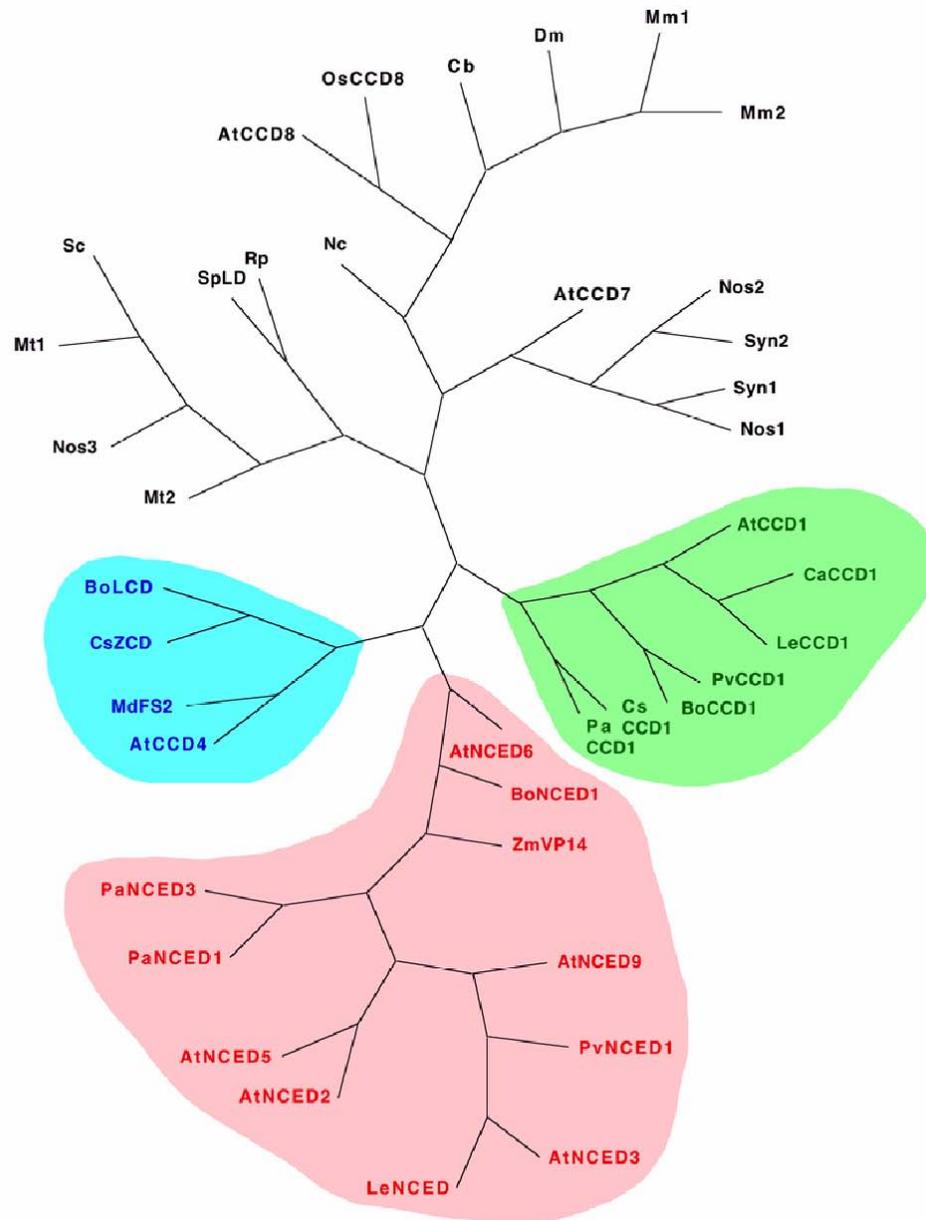


Fig.11. Arbre phylogénétique sans racine des enzymes capables de cliver les caroténoïdes. Alignement à partir des séquences d'acides aminés d'enzymes de : At, *Arabidopsis thaliana*; Bo, *Bixa orellana*; Ca, *Capsicum annum*; Cb, *Coxiella burnetii*; Cs, *Crocus sativus*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Le, *Lycopersicon esculentum*; Md, *Malus x domestica*; Mm, *Mus musculus*; Mt, *Mycobacterium tuberculosis*; Nc, *Neurospora crassa*; Nos, *Nostoc* sp. PCC 7120; Os, *Oryza sativa*; Pa, *Persea americana*; Ps, *Pisum sativum*; Pv, *Phaseolus vulgaris*; Rp, *Rhodopseudomonas palustris* CGA009; Sc, *Streptomyces coelicolor* A3; Sp, *Sphingomonas paucimobilis*; Syn, *Synechocystis* sp. PCC 6803; and Zm, *Zea mays*. D'après Camara et Bouvier, 2004.

- les molécules stimulatrices de la germination des graines de plantes parasites chez les monocotylédones (maïs et sorgho) et les dicotylédones (niébé) ont la même origine biosynthétique,
- les stimulateurs capables d'induire la germination des graines de *Striga* et d'*Orobranche* dérivent de la voie de biosynthèse des caroténoïdes,
- des enzymes capables de cliver les caroténoïdes (comme les enzymes impliquées dans la synthèse de l'ABA) contribueraient à la synthèse du précurseur des strigolactones, mais l'ABA lui-même ne serait pas impliqué.

Les auteurs ont alors proposé qu'un produit de clivage de caroténoïdes serait le précurseur du corps ABC des différentes strigolactones. Cette molécule serait postérieurement liée au cycle D dans une réaction localisée soit dans les plastes, soit dans le cytosol. Cette hypothèse placerait les strigolactones comme des métabolites secondaires appartenant au groupe des apocaroténoïdes et non plus à celui des sesquiterpènes lactones, comme cela avait été proposé initialement.

VI. Rôle des apocaroténoïdes dans la plante

Les molécules dérivées du clivage des caroténoïdes sont appelées apocaroténoïdes. Les enzymes qui catalysent ces transformations peuvent être retrouvées chez les animaux, les plantes et les microorganismes, et elles présentent des séquences fortement conservées (Moise et al., 2005). Le résultat de ces clivages donne une variété importante de structures chimiques qui sont impliquées dans des processus biologiques très divers. Chez les animaux par exemple, le clivage du β -carotène mène à la production de la vitamine A, composé essentiel dans la vision (Camara et Bouvier, 2004). Certaines phéromones (ex. acide trisporique) utilisées par les champignons Zygomycètes pour reconnaître leur partenaire sexuel sont aussi issues du clivage des caroténoïdes (Schachtschabel et al., 2005). Chez les plantes, les apocaroténoïdes sont impliqués dans des processus très variés : rôle hormonal (ex. ABA), attracteurs pour insectes pollinisateurs (ex. β -ionone), odeurs et saveurs des fruits et des fleurs (ex. b-cyclocitral), etc. (Bouvier et al., 2005a).

Un arbre phylogénétique des différentes enzymes impliquées dans le clivage des caroténoïdes identifiées chez les plantes est présenté dans la figure 11. Chez *Arabidopsis*

thaliana, plante modèle dont le génome est complètement séquencé, il en existe neuf membres. Des orthologues sont présents dans d'autres plantes et ils sont nommés en fonction de leur homologie avec les enzymes d'*Arabidopsis* (Auldridge et al., 2006). Ils sont classés principalement par rapport à leur spécificité de substrat. La première enzyme à avoir été identifiée chez les plantes a été la VP14 du maïs, impliquée dans la voie de biosynthèse de l'ABA. VP14 clive la double liaison du 9-cis-violaxanthine ou du 9-cis-neoxanthine, entre les carbones 11-12 ou 11'-12, respectivement. Chez *A. thaliana*, l'homologue de VP14, ainsi que quatre autres gènes impliqués dans la synthèse d'ABA ont été identifiés et rattachés au groupe des Nine-Cis-Epoxy-carotenoid Dioxygenases ou NCEDs (Bouvier et al., 2005a). Afin de les différencier des NCEDs, les autres quatre enzymes identifiées chez *A. thaliana* ont été appelées CCDs (Carotenoid Cleavage Dioxygenases). Elles seraient capables de cliver les caroténoïdes à différentes positions et de façon symétrique ou asymétrique mais le devenir et le rôle de leur produit de clivage ne sont pas encore très bien caractérisés. L'activité biochimique et enzymatique de AtCCD4 est encore inconnue mais un homologue identifié chez le chrysanthème (codée par le gène *CmCCD4a*) déterminerait la couleur des pétales de fleurs de cette plante (Ohmiya et al., 2006). Les enzymes AtCCD7 et AtCCD8 participeraient à la synthèse d'une nouvelle hormone végétale qui contrôlerait la croissance des bourgeons dans la plante (Beveridge, 2006). Cependant ni les précurseurs ni les produits de clivage de ces enzymes n'ont été identifiés. La quatrième enzyme CCD identifiée chez *Arabidopsis* est AtCCD1. Elle serait capable de cliver divers caroténoïdes symétriquement dans les doubles liaisons 9-10 et 9'-10' pour produire un dialdéhyde linéaire et une ou deux molécules à 13 carbones. Ces produits volatiles seraient impliqués dans la flaveur et la fragrance des fleurs et des fruits chez diverses plantes (Schmid et al., 2006).

VI.1. Implication des apocaroténoïdes dans la symbiose MA

Il a été démontré que des produits de clivage des caroténoïdes étaient fortement accumulés dans les racines de plusieurs espèces végétales pendant la mycorhization. Ce phénomène serait spécifique de la symbiose MA puisque cette accumulation n'est observée ni dans des conditions de stress abiotique, ni dans des interactions avec des pathogènes ou avec d'autres symbiontes (ex. avec les ectomycorhizes ou lors de la nodulation) (Fester et al., 2002).

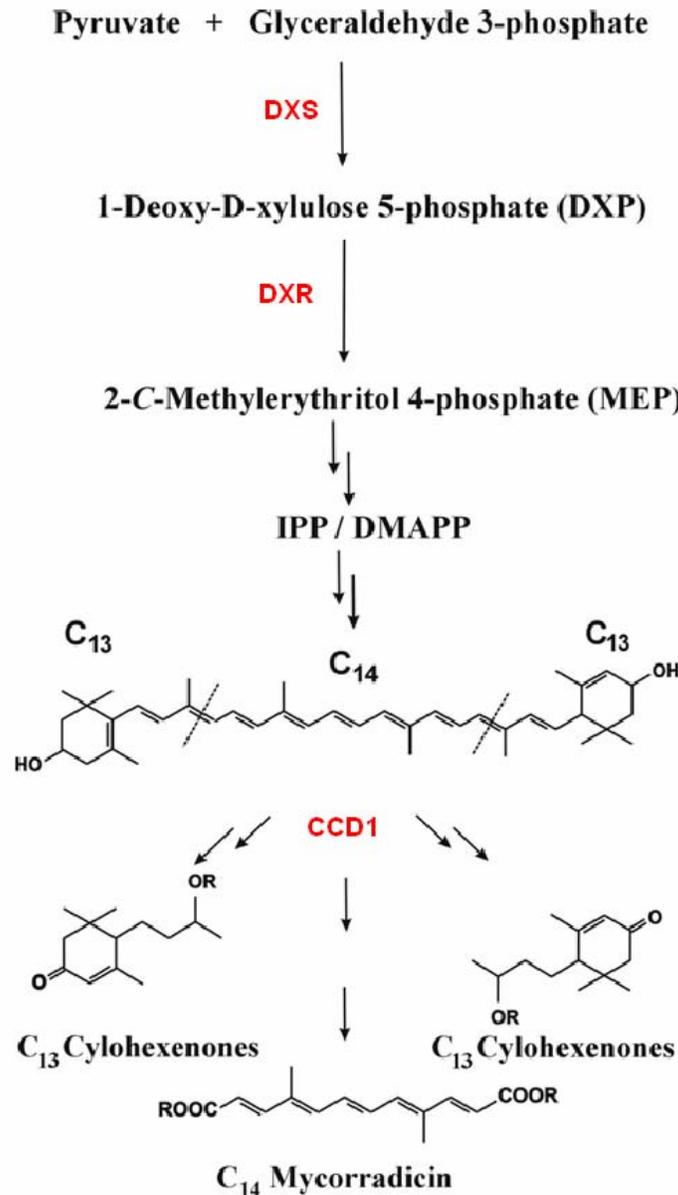


Fig. 12. Voie de biosynthèse hypothétique du « yellow pigment ». Le « yellow pigment » serait composé de cyclohexenones (molécules à 13 carbones) et de mycorradicine (14 carbones) qui proviennent du clivage d'un caroténoïde précurseur commun. Celui-ci est synthétisé par la voie MEP dans les plastes des racines mycorhizées. Les gènes codant pour les trois enzymes suivantes sont surexprimées durant les étapes tardives de la mycorhization : la 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS), la 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) et la carotenoid cleavage dioxygenase 1 (CCD1). D'après Walter et al., 2007.

Cette accumulation d'apocaroténoïdes serait corrélée à l'induction transcriptionnelle de deux gènes codant pour des enzymes précoces de la voie MEP (plastidiale) (Walter et al., 2007). En effet il a été démontré que les niveaux de transcrit des gènes *DXS* (codant pour la 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase) et *DXR* (codant pour la 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase) étaient plus élevés dans les racines mycorhizées (Walter et al., 2000). Ces apocaroténoïdes seraient accumulés dans les vacuoles des cellules mycorhizées conférant aux racines une couleur jaune, connue sous le nom de « yellow pigment » (Fig. 12). Le « yellow pigment » serait composé principalement de deux dérivés, la mycorradicin (C14) et la cyclohexenone (C13). Cette dernière se retrouverait dans la plupart des cas sous forme glycosilée, la bluménine. L'origine et le rôle spécifiques de ces molécules sont encore très hypothétiques. Le précurseur direct de ces molécules n'a pas encore été identifié mais il a été proposé que le caroténoïde précurseur serait clivé aux carbones C9-C10 (ou C9'-C10') par l'enzyme CCD1 qui générerait, en une seule réaction, les deux apocaroténoïdes (Walter et al., 2007). Les organites responsables de la synthèse de ces produits sont les chromoplastes. Ils s'accumulent en très grand nombre et prennent une forme allongée dans les cellules racinaires colonisées par les arbuscules fongiques, particulièrement lors des phases tardives lorsque les arbuscules sont en sénescence. Ces observations ont conduit à l'hypothèse selon laquelle l'accumulation de mycorradicine et de bluménine protégerait la cellule racinaire des espèces activées d'oxygène produites pendant la sénescence des arbuscules (Strack et Fester, 2006).

Les strigolactones ont été initialement répertoriées comme molécules signal responsables de la germination des graines de plantes parasites. Elles ont ensuite été proposées comme impliquées dans les premières étapes de la symbiose MA. Les travaux de Matusova et al. (2005) introduits ci-dessus proposent que les strigolactones soient des apocaroténoïdes. Les strigolactones seraient un produit du clivage des caroténoïdes suite à l'activité d'enzymes CCD ou NCED. Ce produit de clivage pourrait être la xanthoxine, des produits de clivage de celle-ci ou le produit du clivage d'un autre substrat, le 9- β -carotène, par exemple. Plusieurs réactions sur la xanthoxine ou le clivage du 9-cis- β -carotène dans la position C11-12 (ou C11'-12') amèneraient à la formation d'un aldéhyde putatif à 15 carbones. Ensuite de nombreuses étapes enzymatiques, telles que des décarboxylations, des protonations et des oxydations formeraient le troisième cycle lactone. Il a été ensuite proposé que le corps ABC formé pourrait être exporté vers le cytosol avant d'être lié au cycle D, probablement synthétisé par la voie cytosolique MVA

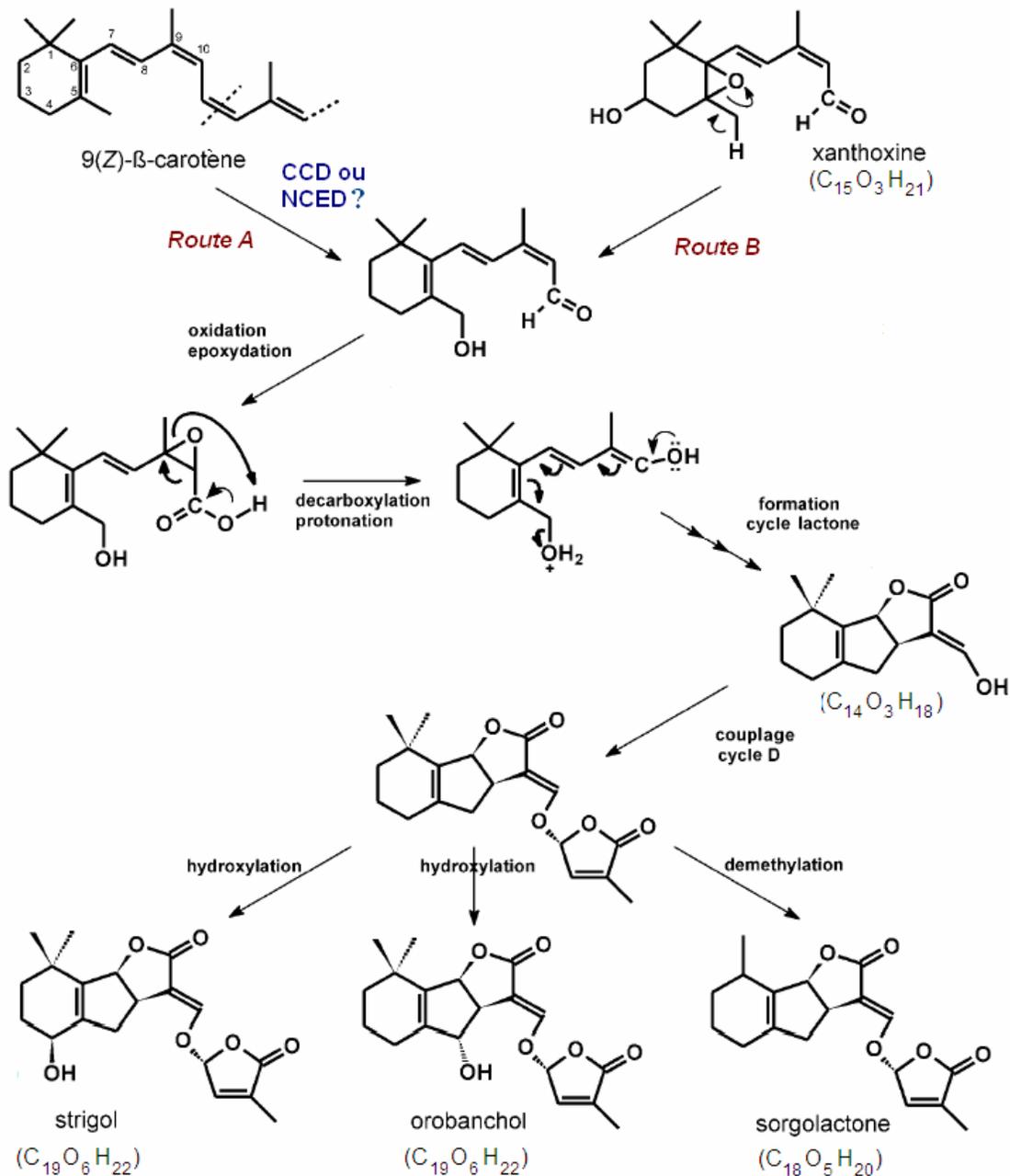


Fig.13. Voie de biosynthèse hypothétique des strigolactones. Deux voies possibles ont été proposées pour la production de l'apocaroténoïde (molécule à 15 carbones) précurseur directe des strigolactones. La première (route A) impliquerait le clivage du 9-(Z)-β-carotène par des enzymes type CCD ou NCED. La route B proposerait la xanthoxine (celui-ci produit par des enzymes NCED) comme molécule précurseur. CCD, Carotenoid Cleavage Dioxygenase; NCED, Nine-Cis-Epoxy-carotenoid Dioxygenases. D'après Matusova et al., 2005.

(Humphrey et Beale, 2006). Il faut ensuite imaginer d'autres réactions, ayant vraisemblablement lieu dans le cytosol, pour greffer différentes substitutions (hydroxyles, méthyles et autres) sur le corps ABC comme celles qu'on trouve sur les strigolactones naturelles connues. De telles modifications cytosoliques de métabolites plastidiaux ont déjà été décrites comme dans le cas de la biosynthèse des gibbérellines ou de l'ABA (Humphrey et Beale, 2006). La figure 13 montre d'une manière très simplifiée la voie de biosynthèse hypothétique des strigolactones.

VII. Objectif de la thèse

La plupart des plantes d'importance agronomique peuvent bénéficier de la symbiose mycorhizienne à arbuscules. Cette symbiose peut améliorer leur nutrition minérale, leur résistance face aux stress biotiques (maladies) et abiotiques (sécheresse), et favoriser leur enracinement et leur floraison (Pozo et Azcon-Aguilar, 2007; Bucher, 2007). Si l'on veut exploiter la symbiose MA en agriculture pour réduire les intrants chimiques, il est souhaitable d'accroître encore nos connaissances fondamentales sur sa biologie. La symbiose mycorhizienne est une interaction complexe, instable et facilement inhibée par les pratiques culturales conventionnelles. Il est en particulier nécessaire de décrypter les mécanismes permettant la reconnaissance précoce entre les deux partenaires (plante et champignon). C'est en optimisant cette reconnaissance, au stade le plus jeune de la plantule, que les apports bénéfiques de la symbiose pourront avoir l'impact attendu, surtout sur des plantes annuelles récoltées quelques mois seulement après leur semis.

L'objectif principal de ma thèse est de mieux appréhender l'importance des strigolactones dans la symbiose MA. Comme nous l'avons vu, ces molécules sont capables d'induire le phénomène de ramification des hyphes du champignon (Akiyama et al., 2005; Besserer et al., 2006) augmentant ainsi ses chances d'entrer en contact avec une racine hôte. Il nous a semblé important d'évaluer jusqu'à quel point les strigolactones étaient indispensables à l'établissement de la symbiose MA. Les flavonoïdes par exemple, comme les strigolactones, sont capables de stimuler les champignons MA mais ils ne sont pas réellement indispensables ni pour l'étape pré-symbiotique ni pour les étapes plus tardives (Bécard et al., 1995).

La recherche de plantes mutantes bloquées dans la voie de biosynthèse des strigolactones

a donc été notre premier objectif. *Arabidopsis thaliana*, une des plantes modèles largement utilisées et pour laquelle de multiples ressources génétiques et moléculaires sont disponibles, est malheureusement une plante non mycotrophe. Nous avons alors choisi de travailler avec le maïs (*Zea mays*) et le pois (*Pisum sativum*), deux organismes mycotrophes.

Dans le premier chapitre de ce manuscrit nous avons tout d'abord mis en place une étude pharmacologique, inspirée de celle réalisée par Matusova et al. (2005). Nous avons étudié le phénotype mycorhizien de plantes de maïs traitées ou non avec un inhibiteur de synthèse des caroténoïdes. Le choix de cette plante a été motivé par la disponibilité du mutant *y9*, bloqué dans les étapes précoces de la biosynthèse de caroténoïdes. Les plantes traitées, de même que le mutant *y9*, ont reçu un apport exogène d'un analogue synthétique de strigolactone, le GR24, afin d'en étudier l'influence sur le phénotype mycorhizien. Les résultats obtenus ont été très encourageants (Gomez-Roldan et al., 2007), mais ils posaient aussi des problèmes d'interprétation à cause des risques importants d'effets pléiotropiques liés au blocage très précoce de la voie des caroténoïdes.

Nous avons donc poursuivi le travail avec d'autres mutants que nous espérions inhibés beaucoup plus en aval dans la biosynthèse des strigolactones. Le deuxième chapitre de ma thèse présente donc l'étude du phénotype mycorhizien de deux mutants *ccd*, cette fois chez le pois. Les mutants *rms1* (*ccd8*) et *rms5* (*ccd7*) présentent un phénotype *ramosus*, c'est-à-dire une ramification intense de leur système aérien (Beveridge, 2006). Les deux gènes mutés codent pour des protéines localisées dans les plastes et ayant une activité CCD (Sorefan et al., 2003; Johnson et al., 2006). Ces mutants chez le pois et ceux équivalents chez *Arabidopsis* (les mutants *max*), font depuis plusieurs années l'objet de nombreux travaux (Beveridge et al., 1996; Foo et al., 2001; Morris et al., 2001; Johnson et al., 2006). Ces travaux ont conduit à l'hypothèse selon laquelle une nouvelle hormone végétale, capable de migrer des racines aux parties aériennes, inhibe la croissance des bourgeons axillaires. Le clonage des gènes *MAX* et *RMS* codant pour des enzymes de clivage des caroténoïdes a ensuite permis de préciser l'hypothèse et d'anticiper que ces enzymes devaient être utilisées pour la synthèse de l'hormone en question. Nous avons testé les exsudats racinaires des deux mutants *rms1* et *rms5* pour leur capacité à induire la ramification des hyphes de champignons MA, comme première analyse de leur aptitude à produire des strigolactones. De plus nous avons étudié leur capacité à établir la symbiose MA. Nous avons également mis en place une méthode d'identification et de quantification des strigolactones du

pois, essentielle pour phénotyper plus précisément les mutants *rms* sur leur capacité à synthétiser les strigolactones. Nos résultats nous ont alors conduit à étudier, en collaboration avec l'équipe de Catherine Rameau à l'INRA de Versailles et celle de Christine Beveridge de l'université du Queensland à Brisbane en Australie, le rôle des strigolactones dans la plante elle-même (Gomez-Roldan et al., 2008).

Chapitre 1

Etude pharmacologique et génétique chez le maïs (*Zea mays*) de l'importance des strigolactones dans la symbiose MA

1.1. Introduction

Nous avons montré *in vitro* que les strigolactones stimulaient la croissance pré-symbiotique des champignons MA (Besserer et al., 2006). Nous avons souhaité aller plus loin et savoir si les strigolactones étaient vraiment indispensables pour la mise en place de la mycorhization. Comme aucune plante non productrice de strigolactones n'était alors disponible nous avons choisi de nous inspirer de l'approche utilisée par Matusova et al. (2005). Dans cette étude, les auteurs ont proposé une hypothèse sur l'origine biosynthétique des strigolactones, lesquelles dériveraient du clivage des caroténoïdes. En effet, les exsudats de plantes mutantes affectées dans la synthèse ou le clivage des caroténoïdes et ceux de plantes traitées avec des inhibiteurs de ce même métabolisme étaient moins efficaces pour induire la germination des graines de plantes parasites, suggérant que la quantité de strigolactones présente dans ces exsudats était diminuée. Les auteurs ont de plus montré, en utilisant des plantes de niébé et de sorgho traitées à la fluridone, que l'origine des molécules stimulatrices devait être semblable chez les plantes monocotylédones et dicotylédones.

L'un des mutants utilisé par Matusova et al. (2005), le mutant *y9* de maïs, déficient dans la synthèse des caroténoïdes (conversion du ζ -carotène en lycopène), avait déjà été répertorié dans une étude de phénotype mycorhizien réalisée par Fester et al. (2002). Le mutant *y9* présentait une forte diminution dans sa capacité à être colonisé par le champignon MA *Glomus intraradices*. Cette étude avait été réalisée afin d'élucider l'origine biosynthétique des apocaroténoïdes mycorradicine et cyclohexenone et leur implication dans la symbiose MA. La capacité des racines du mutant à synthétiser le « yellow pigment » (mycorradicine) était aussi diminuée chez les plantes de maïs traitées avec du norflurazone, un inhibiteur de l'enzyme PDS impliqué dans la synthèse des caroténoïdes. Ce travail avait permis aux auteurs de proposer que la mycorradicine dérive probablement d'un caroténoïde (40 carbones) et que la synthèse du

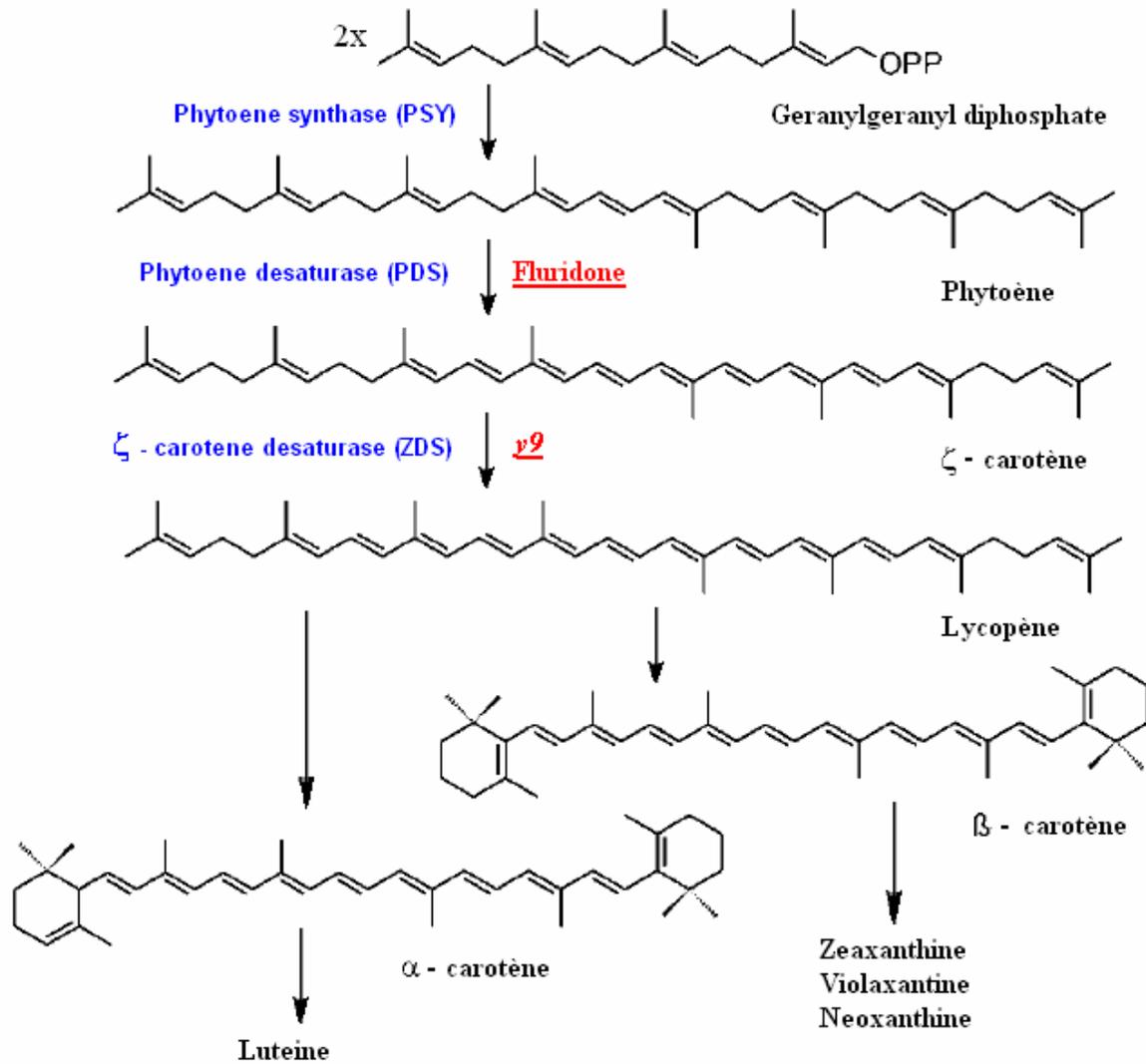


Fig. 14. Voie de biosynthèse des caroténoïdes dans les plantes et enzymes bloquées lors du traitement à la fluridone (PDS) ou chez le mutant y9 (ZDS).

« yellow pigment » joue un rôle important pendant la mycorhization. Cependant le lien entre le phénotype « myc- » du mutant *y9* et l'absence hypothétique de strigolactones dans ses exsudats, pouvant être responsable de l'absence de reconnaissance du partenaire symbiotique par le champignon, ne faisait pas partie de leurs hypothèses.

Comme dans l'étude réalisée par Matusova et al. (2005), nous avons utilisé les deux approches, pharmacologique et génétique. Pour la première nous avons utilisé un inhibiteur de synthèse des caroténoïdes, la fluridone. Cet inhibiteur agit au niveau de l'enzyme Phytoène désaturase (PDS). Pour la deuxième, nous avons principalement utilisé le mutant *y9* (Fig.14). Nous avons inoculé avec le champignon MA *Gigaspora rosea* ce mutant et les plantes traitées ou non avec la fluridone. Nous avons inclus dans notre étude des expériences de complémentation physiologique avec un analogue synthétique de strigolactone, le GR24, afin de voir s'il était possible de restaurer le phénotype mycorhizien des plantes témoin.

Les résultats de ces expériences ont été publiés dans la revue *Plant Signaling & Behavior*, sur invitation, comme un addendum de l'article de Besserer et al. (2006). Nous présenterons dans ce chapitre cet addendum ainsi que d'autres résultats complémentaires.



Fig. 15. Phénotype des plantes de maïs traitées à la fluridone et/ou au GR24. Plantules de maïs (2 semaines de culture) mycorhizées avec le champignon *Gigaspora rosea* et traitées ou pas avec 25 μ M de fluridone (pour bloquer la synthèse des caroténoïdes) et/ou avec 10⁻⁸M de GR24 (pour compléter l'éventuelle absence dans la synthèse de strigolactones).

1.2. Addendum publié dans *Plant Signaling and Behavior*

Strigolactones: promising plant signals

Victoria Gomez-Roldan, Christophe Roux, Daniel Girard, Guillaume Bécard, Virginie Puech-Pagès.

Résumé

Les champignons mycorhiziens à arbuscules (AM), symbiontes biotrophes obligatoires, doivent d'une façon efficace reconnaître leur plante hôte afin de pouvoir survivre et accomplir leur cycle de vie. Des travaux récents ont montré que les strigolactones, molécules sécrétées par les racines des plantes, activaient la croissance pré-symbiotique des champignons MA, et cela à de très faibles concentrations. Ces molécules, dont on pense qu'elles dérivent de la voie de biosynthèse des caroténoïdes, induisent le métabolisme mitochondrial du champignon. Afin d'étudier l'importance des strigolactones pour la symbiose nous avons traité des plantules de maïs avec de la fluridone, un inhibiteur d'une étape précoce de la biosynthèse des caroténoïdes (Fig. 15). Nous montrons que le taux de mycorhization des plantules traitées est significativement réduit, mais qu'il est restauré par l'apport exogène de GR24, un analogue de synthèse des strigolactones. Des résultats similaires ont été obtenus avec le mutant *y9* affecté dans une autre étape précoce de la biosynthèse des caroténoïdes. Ces données sont compatibles avec l'hypothèse selon laquelle les strigolactones sont des signaux symbiotiques importants pour l'établissement de la symbiose MA.

Addendum

Strigolactones

Promising Plant Signals

Victoria Gomez-Roldan

Christophe Roux

Daniel Girard

Guillaume Bécard*

Virginie Puech-Pagès

Toulouse University; Castanet Tolosan, France

*Correspondence to: Guillaume Bécard; SCSV, UMR 5546 CNRS; Toulouse University; 24 chemin de Borde-Rouge; BP 42617 Auzeville; Castanet, Tolosan 31326 France; Tel.: +05.62.19.35.02; Fax: +05.62.19.35.20; Email: guillaume.becard@scsv.ups-tlse.fr

Original manuscript submitted: 12/08/06

Manuscript accepted: 12/08/06

Previously published online as a *Plant Signaling & Behavior* E-publication: <http://www.landesbioscience.com/journals/psb/abstract.php?id=3689>

KEY WORDS

strigolactones, mycorrhization, biological activity, carotenoids, plant signal, fluridone

ABBREVIATIONS

AM arbuscular mycorrhizal
MEP 2-C-methyl-D-erythritol 4-P

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank C. Brière for the statistical analyses, and E. Würtzel for providing the $\gamma 9$ mutant seeds.

Addendum to:

Strigolactones Stimulate Arbuscular Mycorrhizal Fungi by Activating Mitochondria

A. Besserer, V. Puech-Pagès, P. Kiefer, V. Gomez-Roldan, A. Jauneau, S. Roy, J. Portais, C. Roux, G. Bécard and N. Séjalon-Delmas

PLoS Biol 2006; 4:e226

ABSTRACT

As obligate biotrophic symbionts, Arbuscular Mycorrhizal (AM) fungi must efficiently recognize their host plant to insure their survival and complete their life cycle. Recent works have shown that some root secreted molecules, the strigolactones, activate the presymbiotic growth of AM fungi at extremely low concentrations. These compounds, derived from carotenoid biosynthesis, induce the mitochondrial metabolism of the fungus. The hypothesis that strigolactones are important plant recognition signals for AM fungi was further supported in this study by using maize seedlings treated with fluridone, an upstream inhibitor of the carotenoid metabolism. We showed that mycorrhization of the treated seedlings was significantly reduced, but restored by the addition of GR24, a strigolactone analogue. Similar results were obtained with the $\gamma 9$ mutant of maize defective in an upstream step of carotenoid synthesis. These data provide additional evidence that strigolactones may be essential symbiotic signals for the establishment of AM symbiosis.

In natural conditions, most plants are root-associated with arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. In this symbiosis, AM fungi obtain photoassimilates from plants and in return they are able to improve plant mineral nutrition (particularly in phosphorus) and water uptake. Plant host recognition is a crucial step for AM fungi because they are obligate biotrophs. Their spores can usually germ spontaneously, but hyphal growth will be limited and will eventually stop in the absence of a host plant. In the vicinity of a host root, hyphal growth is activated and there is profuse formation of new hyphal branches. This presymbiotic hyphal growth is presumably more invasive as the presence of more hyphal tips increases probabilities of root contact, colonisation and then mycorrhization. Recently, Akiyama and coworkers¹ identified 5 deoxy-strigol as the main inducer of hyphal branching in root exudates of the host plant *Lotus japonicus*, and sorgolactone was found as the most representative active compound in sorghum root exudates.² These molecules were found to be active at sub-picomolar concentrations. They are members of a group of compounds collectively named strigolactones, previously characterized as stimulants of the germination of seeds of parasitic weeds *Striga* (witchweed) and *Orobanch* (Broomrape) (For a review see Refs. 3,4). Genetic and pharmacological data suggest that these metabolites are formed by cleavage of carotenoids in the plastidic MEP pathway, the same pathway leading to the synthesis of ABA hormone.⁵ However their initial precursor is still unknown. Four decades after the characterization of the first member of this family, strigol,⁶ only six strigolactone structures, in mono- and dicotyledonous plants, have yet been characterized.⁷ A larger structural diversity is suspected as there are several indirect indications that strigolactones are widely distributed among the green lineage, from mosses to angiosperms.^{7,8}

This suspected wide distribution of strigolactones in the plant kingdom, the presence of these molecules as trace elements and their extremely high activity on parasitic weeds as well as on AM fungi, now challenge plant scientists to further describe the physiological and ecological incidences of strigolactones: (1) How are these compounds perceived by such phylogenetically divergent organisms, i.e., AM fungi and parasitic weeds? (2) Are there other organisms sensitive to strigolactones? (3) Do these compounds have an endogenous role in plants?

The first question is intriguing. Because of the ancestral nature of the interaction between AM fungi and plants, it has been proposed that the molecular signalling between plants and AM fungi could have been hijacked by parasitic plants.⁹ This evolutionary hypothesis is supported by the observation that mitochondria in AM fungi are an early

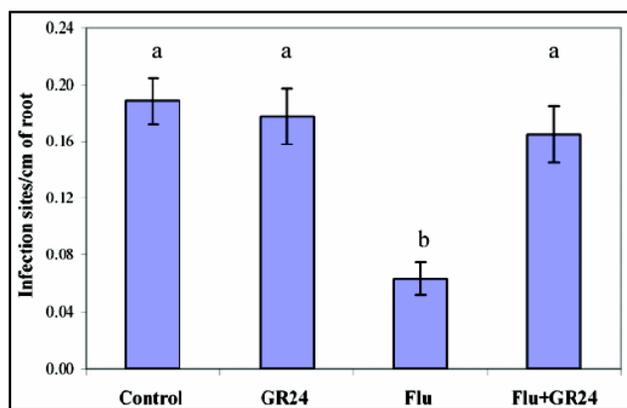


Figure 1. Effect of 25 μM Fluridone (inhibiting phytoene desaturase) and/or of 10^{-8} M GR24 on the early mycorrhization of B73 maize seedlings inoculated with *Gigaspora rosea* (20 spores per seedling). Inoculated seedlings were cultivated in a growth chamber under reduced light at 25°C, 16 h/8 h photoperiod and 70% relative humidity. The two compounds were added every two days (15 ml per 250 ml pot). After three weeks of culture, the average numbers of infection sites/cm of root length exhibiting arbuscules were calculated ($n = 10\text{--}12$ plants) under the microscope after the roots had been cleared (10% KOH) and stained (Chlorazol Black E). Histograms with the same letter are not significantly different (ANOVA $p < 0.05$). The experiment was repeated twice and gave similar results.

target of strigolactone activation.² The addition of GR24, a synthetic analogue of strigol, induces a rapid rearrangement of mitochondria and triggers higher oxygen consumption. Such activation on parasitic weeds has yet to be demonstrated, but it would explain this convergence on very distant organisms. By extrapolation, this hypothesis leads to the prediction of a possible incidence of strigolactones on other organisms, firstly on the producing plants themselves, but also on additional organisms present in the rhizosphere.

A more immediate question remains. How important are strigolactones in the establishment of AM symbiosis? Although it has been shown that strigolactones are active on hyphal growth of AM fungi *in vitro*, no demonstration has been provided yet that these molecules are essential for the establishment of symbiosis. Plants impaired in strigolactone biosynthesis are therefore necessary to explore the actual incidence of strigolactones on the early steps of AM establishment.

We used pharmacological and genetic approaches to observe the effect of GR24 on early mycorrhization of maize plantlets affected in the upstream steps of carotenoid biosynthesis. Maize is a mycotrophic plant producing at least two strigolactones (strigol and sorgolactone).¹⁰ It has previously been shown that the addition of the herbicide fluridone, inhibitor of *phytoene desaturase* (*PDS*), an upstream enzyme of the carotenoid pathway,¹¹ leads to a reduced stimulation of the germination of witchweed seeds, presumably because of a reduction of strigolactone production.⁵ We inoculated maize (B73 line) seedlings with *Gigaspora rosea* and treated them with Fluridone at 25 μM for three weeks, a dose which has no activity on the fungus. Comparison of the early colonization of treated and nontreated plants (Fig. 1) showed 66% fewer root colonization sites in fluridone-treated cultures. Addition of 10^{-8} M GR24 during the culture reversed the inhibitory effect of fluridone on mycorrhization. We also observed that mycorrhization of control maize was not increased by the addition of GR24, indicating that the endogenous strigolactone production by the B73 maize plants was optimum for

mycorrhization. In a second approach, we used the maize mutant $\gamma 9$, affected in the conversion of ζ -carotene to lycopene.¹² Fester and coauthors¹³ demonstrated that this mutant presents a reduced mycorrhization, presumably correlated to inhibition of the apocarotenoid-derived mycorradicin metabolism. In addition, Matusova and coauthors⁵ observed that the exudates of $\gamma 9$ mutant produced significantly lower germination stimulant of witchweed seeds than the wild type. As for fluridone experiments, the $\gamma 9$ mutant inoculated with *Gigaspora rosea* showed fewer infection sites (69% less) when compared to the wild type and addition of GR24 partly restored mycorrhization (data not shown).

Taken together, these data provide preliminary evidence that the perception of strigolactone by AM fungi has an incidence on the establishment of mycorrhizal symbiosis. The risk that an upstream inhibition of carotenoid biosynthesis may have reduced mycorrhization by some pleiotropic effects will be reduced in the future by using plant mutants more precisely affected in strigolactone biosynthesis. Such mutants will also be helpful to study the incidence of strigolactones in later steps of AM interactions.

References

- Akiyama K, Matsuzaki KI, Hayashi H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 2005; 435:824-7.
- Besserer A, Puech-Pagès V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, Roy S, Portais J, Roux C, Bécard G, Séjalon-Delmas N. Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol* 2006; 4:e226.
- Bouwmeester HJ, Matusova R, Zhongkui S, Beale MH. Secondary metabolite signalling in host-parasitic plant interactions. *Curr Opin Plant Biol* 2003; 6:358-64.
- Humphrey AJ, Beale MH. Strigol: Biogenesis and physiological activity. *Phytochemistry* 2006; 67:636-40.
- Matusova R, Rani K, Verstappen FWA, Franssen MCR, Beale MH, Bouwmeester HJ. The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanchae* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiol* 2005; 139:920-34.
- Cook CE, Whichard LP, Turner B, Wall ME, Egley GH. Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour.): Isolation and properties of a potent stimulant. *Science* 1966; 154:1189-90.
- Humphrey AJ, Galster AM, Beale MH. Strigolactones in chemical ecology: Waste products or vital allelochemicals? *Nat Prod Rep* 2006; 23:592-614.
- Akiyama K, Hayashi H. Strigolactones: Chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. *Ann Bot (Lond)* 2006; 97:925-31.
- Paszkowski U. Mutualism and parasitism: The yin and yang of plant symbioses. *Curr Opin Plant Biol* 2006; 9:364-70.
- Awad A, Sato D, Kusumoto D, Kamioka H, Takeuchi Y, Yoneyama K. Characterization of strigolactones, germination stimulants for the root parasitic plants *Striga* and *Orobanchae*, produced by maize, millet and sorghum. *J Plant Growth Regul* 2006; 48:221-7.
- Li ZH, Matthews PD, Burr B, Wurtzel ET. Cloning and characterization of a maize cDNA encoding phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthetic pathway. *Plant Mol Biol* 1996; 30:269-79.
- Matthews PD, Luo R, Wurtzel ET. Maize phytoene desaturase and ζ -carotene desaturase catalyse a poly-Z desaturation pathway: Implications for genetic engineering of carotenoid content among cereal crops. *J Exp Bot* 2003; 54:2215-30.
- Fester T, Schmidt D, Lohse S, Walter M, Giuliano G, Bramley P, Fraser P, Hause B, Strack D. Stimulation of carotenoid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots. *Planta* 2002; 216:148-54.

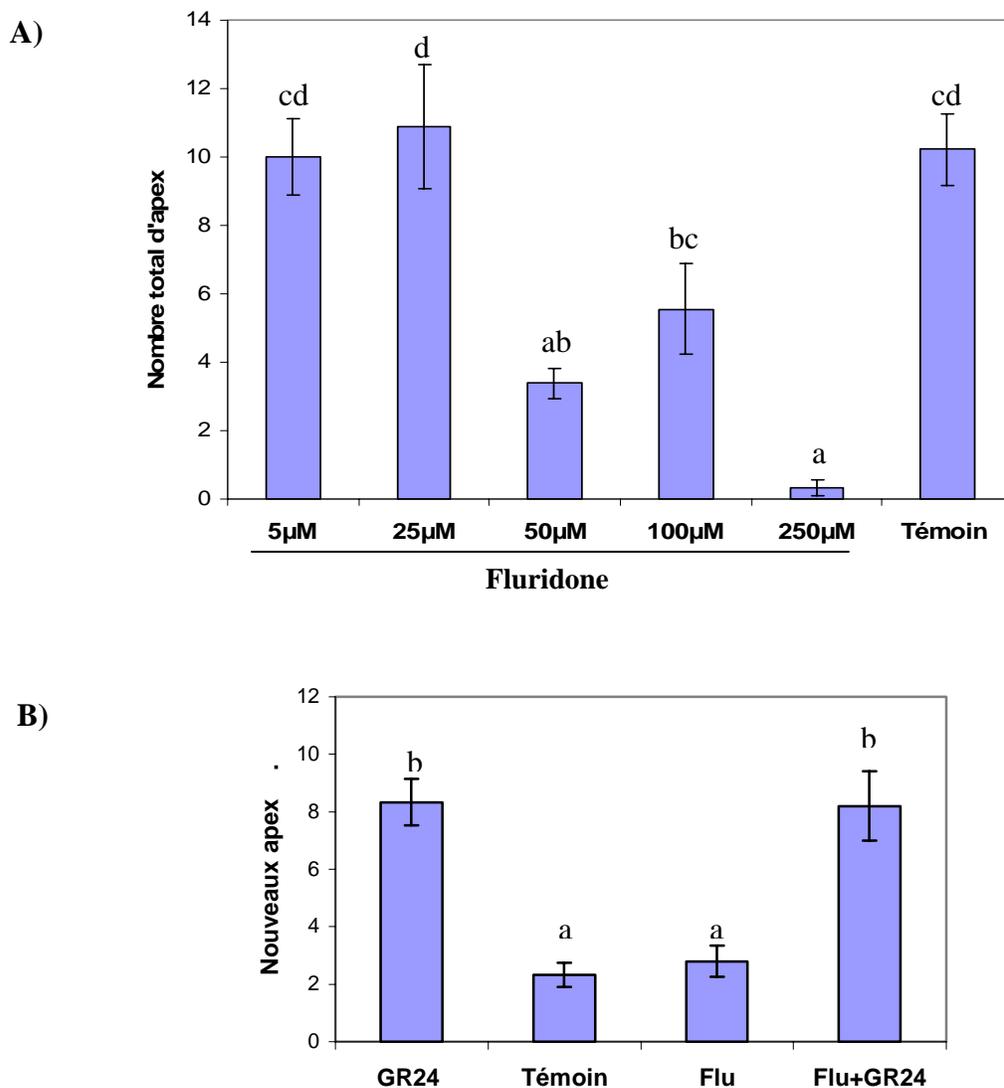


Fig. 16. Effet de la fluridone sur la croissance des hyphes germinatifs de *Gigaspora rosea*. **A)** Effet de différentes concentrations de fluridone (5 à 250 µM) sur le nombre total d'apex d'hyphes formés. Les spores pré-germées ont poussé pendant 7 jours sur le milieu contenant la fluridone, n=7-9 (bar d'erreur ± SEM). **B)** Influence de la fluridone (25µM, dans le milieu de culture) sur la réponse de « branching » (nombre de nouveaux d'apex d'hyphes néoformés) après un traitement de 24h avec une solution à 10⁻⁸M de GR24 n= 6-8 (bar d'erreur ± SEM). Les tubes germinatifs témoins sont traités avec une solution à 10% acétonitrile/eau. Les histogrammes avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (test ANOVA, P ≤ 0.05)

1.3. Résultats additionnels et discussion

1.3.1. Effet de la fluridone sur les champignons MA

Avant de mettre en place les expériences de mycorhization des plantes traitées ou non à la fluridone nous avons étudié l'effet de cet inhibiteur sur la croissance des champignons MA. Nous avons ajouté dans le milieu de culture des spores de *G. rosea*, différentes concentrations de fluridone et nous avons observé la croissance des hyphes germinatifs après 7 jours. Les concentrations en fluridone utilisés ont été : 5, 25, 50, 100 et 250 μM . Nous avons observé que les concentrations entre 50 et 250 μM diminuaient sérieusement la croissance du champignon (Fig. 16A), par contre la croissance des hyphes en présence de 5 et 25 μM de fluridone était similaire à celle des témoins. Même si la croissance du champignon à 25 μM de fluridone ne présentait pas d'altération visible nous avons vérifié que le champignon traité à cette concentration percevait toujours les strigolactones. Nous avons analysé le nombre de nouvelles ramifications d'hyphes formées par le champignon ayant poussé 7 jours dans un milieu contenant 25 μM de fluridone et traité pendant 24h avec du GR24 à 10^{-8}M . Le nombre de ramification des champignons traités à la fluridone et au GR24 était comparable à celui observé chez les spores traitées seulement avec du GR24 (Fig. 16B). Devant ces résultats nous avons choisi une concentration de 25 μM en fluridone pour traiter les plantes de maïs et mesurer leur capacité à être mycorhizées, cette concentration n'affectant ni la croissance ni la perception des strigolactones par le champignon. Ces expériences nous ont permis d'éliminer la possibilité d'un effet observé sur la mycorhization des plantes traitées à la fluridone qui serait lié à une toxicité de la fluridone sur la croissance des champignons MA.

1.3.2. Effet du GR24 sur la mycorhization du mutant y9

Le taux de mycorhization des mutants y9 et des plantes sauvages correspondantes (W23) a été mesuré après trois semaines en coculture avec un inoculum de *G. rosea*. La mycorhization du mutant y9 a été 69 % plus faible que celle observée chez les plantes sauvages. Fester et al. (2002) avaient associé cette diminution du pourcentage de mycorrhization chez le mutant y9 à sa plus faible capacité à produire la mycorradicine. Matusova et al. (2005) ont de leur côté montré une

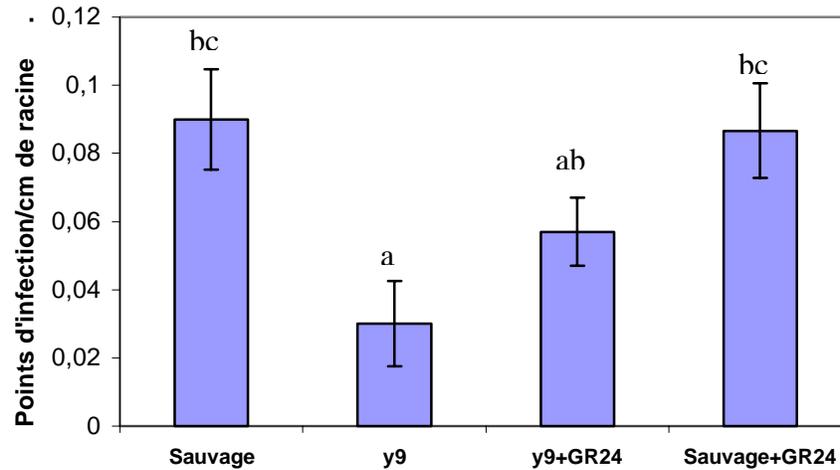


Fig. 17. Phénotype mycorhizien des mutants *y9* et complémentation avec le GR24. Le nombre de points d'infection par centimètre de racine a été déterminé après 3 semaines de croissance des plantes en présence de spores de *Gigaspora rosea*. L'arrosage avec du GR24 à 10^{-8} M a été réalisé 3 fois par semaine, n= 4-6 (bar d'erreur = SEM). Expérience réalisée 2 fois et montrant des résultats similaires. Les histogrammes avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différents (test ANOVA, $P \leq 0.5$)

capacité moindre des exsudats racinaires du mutant *y9* à faire germer les graines des plantes parasites et avait associé cela à un défaut de production de strigolactones. Nous avons alors traité les plantes avec une solution de GR24 à 10^{-8} M afin de vérifier s'il était possible de compléter ainsi le phénotype mycorhizien du mutant *y9*. Le mutant *y9* traité avec du GR24 a significativement amélioré sa capacité à être mycorhizé mais n'a pas atteint le même niveau de mycorhization que celui des plantes sauvages (Fig. 17). Les effets pléiotropiques dus au défaut de synthèse des caroténoïdes chez le mutant *y9* sont certainement nombreux : photosynthèse très altérée, absence de synthèse de l'hormone ABA et de la mycorradicine, etc. On peut penser que le traitement avec le GR24 ne peut pallier à lui tout seul toutes ces anomalies physiologiques et métaboliques dont les effets sont certainement non nuls sur la mycorhization.

Par ailleurs, les plantes sauvages traitées avec du GR24 n'ont pas été davantage mycorhizées, suggérant que les quantités de molécules stimulatrices endogènes étaient suffisantes pour initier la symbiose.

1.4. Conclusions

En utilisant l'approche pharmacologique et génétique développée par Matusova et al. (2005) qui avait montré que les exsudats de plantes inhibés dans la synthèse des caroténoïdes étaient moins actifs pour faire germer les graines de plantes parasites (et probablement aussi pour produire les strigolactones), nous avons pu montrer que ces plantes étaient aussi affectées dans leur capacité à rentrer en symbiose avec les champignons MA. Nos résultats montrent que les plantes inhibées dans la synthèse des caroténoïdes mais traitées avec un analogue de synthèse des strigolactones, le GR24, arrivent à retrouver un phénotype mycorhizien proche de celui observé chez les plantes sauvages (Gomez-Roldan et al., 2007). Ces résultats confortent notre hypothèse selon laquelle les strigolactones jouent un rôle important dans la mise en place de la symbiose MA.

Cependant nous n'avons pas vérifié que la synthèse des strigolactones dans ces plantes était effectivement inhibée. Par ailleurs, il existe de nombreux effets pléiotropiques, liées à la mutation *y9* et au traitement avec la fluridone, tels que par exemple la diminution de la photosynthèse et de la synthèse de l'hormone ABA. Nous avons donc souhaité poursuivre notre étude avec des plantes mutées plus en aval dans la voie de biosynthèse des strigolactones, chez lesquelles on aura cette fois confirmé par analyses biochimiques leur incapacité à synthétiser les strigolactones, pour examiner leur phénotype mycorhizien en ayant éliminé une grande partie de ces effets pléiotropiques.

Chapitre 2

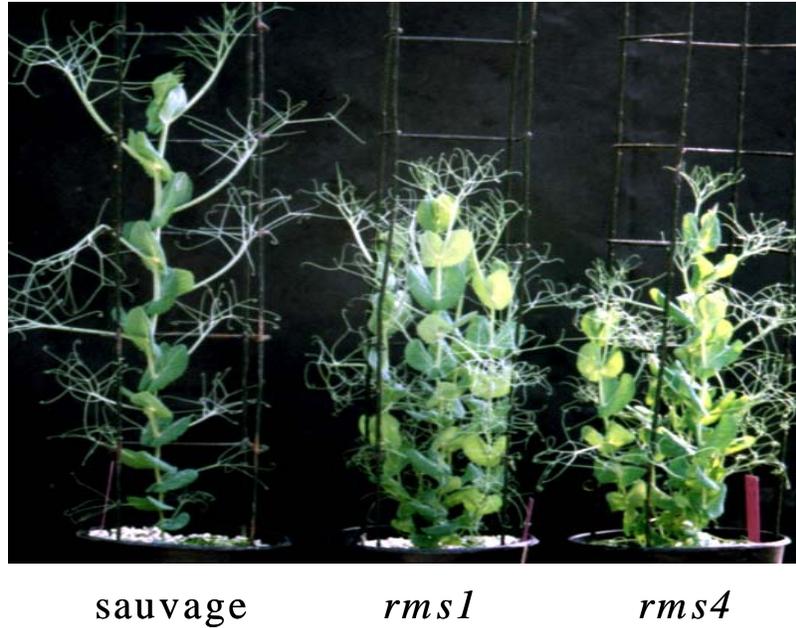


Fig. 18. Phénotype des plantes de pois sauvage et des mutants *rms1* et *rms4*. Les mutants *rms* (*ramosus*) ont un phénotype très ramifié des tiges à cause de l'absence (*rms1*) ou une perception déficiente d'une nouvelle hormone végétale qui contrôle la croissance des bourgeons latéraux.

Implication des strigolactones dans la symbiose MA, la germination des graines de plantes parasites et le développement des plantes

2.1. Introduction

L'objectif principal de notre travail de thèse est de mieux comprendre le rôle joué par les strigolactones dans la symbiose MA. Des études précédentes ayant montré que les strigolactones étaient impliquées dans la stimulation de croissance des champignons MA au stade pré-symbiotique (Besserer et al., 2006), nous avons voulu savoir jusqu'à quel point cette étape de stimulation par les strigolactones était vraiment indispensable à l'établissement de la mycorhization. Dans le chapitre précédent nous avons étudié le phénotype mycorhizien de plants de maïs inhibés dans la synthèse des caroténoïdes et possiblement aussi dans la synthèse des strigolactones. Cependant, les effets pléiotropiques associés ne nous ont pas permis de conclure sur l'implication directe des strigolactones dans le phénotype mycorhizien observé. Nous avons alors initié une recherche de mutants inhibés plus spécifiquement dans la synthèse de ces molécules.

Dans l'article de Matusova et al. (2005) les auteurs ont proposé que les strigolactones dérivent de la voie de biosynthèse des caroténoïdes (Fig.13, Introduction). Le clivage de caroténoïdes effectué par des enzymes spécifiques produirait le précurseur (cycles ABC) des strigolactones qui serait ensuite couplé au cycle D. Parmi les enzymes capables de cliver les caroténoïdes, il y a la famille des Carotenoid Cleavage Dioxygenases (CCDs). Peu de plantes mutées dans ces enzymes ont été répertoriées, la plupart ont été obtenues chez *A. thaliana*, plante non mycotrophe. Parmi les autres mutants décrits, les mutants *ramosus* (*rms*) chez le pois semblaient être de bons candidats pour notre étude : le pois (*Pisum sativum*) est une plante mycotrophe, facilement cultivable et deux mutants, *rms5* (*ccd7*) et *rms1* (*ccd8*), avaient été bien caractérisés au niveau moléculaire dans des études précédentes. Les mutants des enzymes CCD7 et CCD8 montrent une augmentation du nombre de ramifications des tiges par rapport aux plantes sauvages (Fig. 18). L'étude de ces mutants a révélé l'existence d'un nouveau signal hormonal provenant des racines, et capable d'affecter négativement la croissance des bourgeons

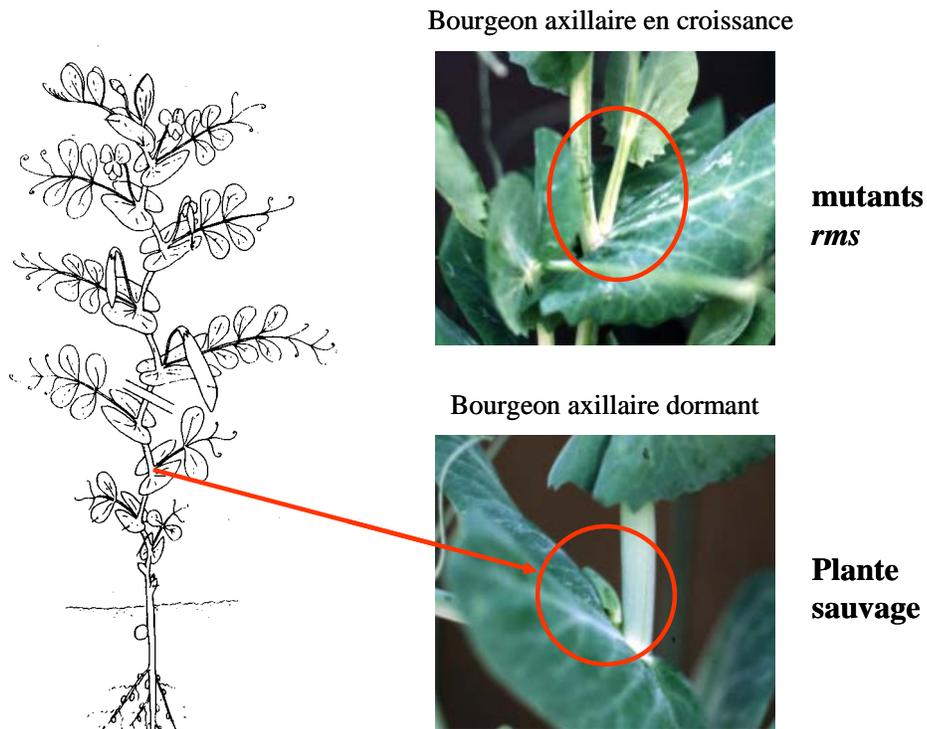


Fig. 19. Implication des bourgeons axillaires dans l'architecture de la plante. Le bourgeon terminal est situé à l'extrémité de la tige et les bourgeons axillaires sont situés à l'aisselle des feuilles. Le bourgeon apical assure la croissance en hauteur de la plante, les bourgeons axillaires sont à l'origine de la ramification des tiges. Chez la plante sauvage la plupart des bourgeons axillaires restent dormants au cours de la phase de croissance végétative. Le phénotype hyper-ramifié des mutants *rms* est dû à l'absence de l'hormone SMS qui réprime la croissance des bourgeons axillaires.

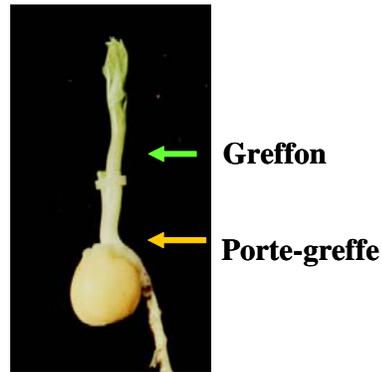
latéraux (Beveridge, 2006). Une description détaillée des connaissances biologiques, moléculaires et biochimiques sur ces mutants va suivre afin de mieux comprendre leur utilisation dans notre étude.

2.1.1. Régulation de la croissance des bourgeons latéraux par CCD7 et CCD8

Pendant l'embryogenèse des plantes, deux méristèmes primaires vont se former : le méristème apical caulinaire (à l'origine de la partie aérienne) et le méristème apical racinaire (à l'origine du système racinaire). Ultérieurement, la plante développe des méristèmes secondaires (ou axillaires) qui vont établir de nouveaux axes amenant à la formation des ramifications latérales au niveau des tiges et des racines. Dans la partie aérienne, les bourgeons axillaires se retrouvent situés à l'aisselle des feuilles, et sont souvent à l'état dormant (Fig. 19). L'architecture aérienne de la plante sera déterminée par le nombre, la distribution et la croissance de ces bourgeons axillaires, générant une diversité importante de formes. La croissance des bourgeons axillaires est contrôlée par plusieurs facteurs : l'environnement, le stade de développement et la génétique de la plante. Ces facteurs vont déterminer la transition du bourgeon dormant vers un bourgeon actif, point de départ d'une nouvelle tige (Ongaro et Leyser, 2007).

Pendant des décennies il a été postulé un rôle prépondérant joué par l'auxine (hormone produite principalement dans le méristème apical caulinaire) dans le contrôle de la croissance des bourgeons axillaires. Il avait été observé qu'en enlevant le méristème apical d'une plante (décapitation), les bourgeons axillaires dormants s'activent et la plante se ramifie. Par la suite il a été démontré qu'en appliquant de l'auxine exogène sur les plantes décapitées, la croissance des bourgeons axillaires était arrêtée (Thimann et Skoog, 1933). Ce phénomène, appelé dominance apicale, implique le transport de l'auxine d'une façon basipétale via le cylindre central jusqu'aux bourgeons sous-jacents. Cependant, deux découvertes plus récentes ont suggéré que l'auxine n'agissait pas directement, mais via d'autres molécules, pour inhiber la croissance des bourgeons axillaires. La première découverte montrait que l'auxine provenant de l'apex n'était pas capable de pénétrer dans les bourgeons (Everat-Bourbouloux et Bonnemain, 1980), la seconde que l'application directe d'auxine sur les bourgeons axillaires n'inhibait pas leur croissance (Brown et al., 1979). Il existe deux molécules signale candidates pour agir avec l'auxine. Tout d'abord, il a été démontré que les cytokinines étaient capables d'activer directement la croissance des bourgeons latéraux. Or, il semblerait que la synthèse et le transport des cytokinines des racines

A)



B)

Porte-greffe	Greffon			
	sauvage	<i>rms1</i>	<i>rms5</i>	<i>rms4</i>
Sauvage				 ├───┘ ├───┘
<i>rms1</i>		 ├───┘ ├───┘	 ├───┘ ├───┘	 ├───┘ ├───┘
<i>rms5</i>		 ├───┘ ├───┘	 ├───┘ ├───┘	 ├───┘ ├───┘
<i>rms4</i>				 ├───┘ ├───┘

| Inhibition complète
(comme le WT)

|
├───┘
├───┘ Pas d'inhibition de
la ramification

Fig. 20. Phénotype de la partie aérienne des plantes greffées. A) Procédure expérimentale utilisée pour réaliser les greffes racines-tiges. B) Tableau schématisant les ramifications des tiges (greffon) observées après greffage sur différents types de racines (porte-greffe). L'inhibition de la ramification a été observée pour les greffons mutants *rms1* et *rms5* lorsqu'ils sont associés au porte greffe sauvage (signal hormonal racines>tiges). Dans les mêmes conditions la mutation *rms4* n'est pas complémentée. Modifié d'après Morris et al., 2001.

vers les tiges soient contrôlés par l'auxine (Bangerth, 1994). L'existence d'une autre molécule candidate a été proposée plus récemment, une nouvelle hormone végétale de structure chimique inconnue, appelé postérieurement Shoot Multiplication Signal ou SMS (Foo et al., 2001).

C'est principalement par la caractérisation des mutants *rms* du pois, et de leurs équivalents chez *A. thaliana* (mutants *max* pour *more axillary growth*) et chez le pétunia (mutant *dad* pour *decreased apical dominance*), que l'existence du signal hormonal SMS a été démontrée. La principale raison de croire que le signal SMS était une nouvelle hormone végétale provenaient des expériences de quantification d'auxine et de cytokinine chez les mutants *rms* (Beveridge et al., 1997). En effet l'auxine, présumée inhiber la croissance des bourgeons, n'était pas accumulée chez ces mutants, et les cytokinines, supposées activer la croissance des bourgeons, étaient moins abondantes dans les mutants *rms*. Des expériences de greffes avec les mutants *rms* ont permis d'identifier certains gènes impliqués dans la synthèse ou le transport du signal SMS (Fig. 20). L'hyper ramification des tiges des mutants *rms1* et *rms5* était supprimée quand elles étaient greffées à des racines sauvages (ou à des tiges sauvages décapitées). Le phénotype d'un autre mutant hyper ramifié, le mutant *rms4*, lui, ne pouvait pas être restauré après greffage sur les racines de plantes sauvages, et l'hyper ramification des parties aériennes des mutants *rms1* et *rms5* pouvait être supprimée après greffage sur les racines du mutant *rms4* (Beveridge et al., 1996). A partir de ces expériences, l'hypothèse suivante a été proposée : les mutants *rms1* et *rms5* seraient déficients dans la synthèse du signal SMS, et le mutants *rms4*, dans le transport ou la transmission du signal SMS (mais pas dans sa synthèse). L'hormone SMS serait synthétisée principalement au niveau des racines (peut-être aussi dans une moindre mesure dans les tiges) et serait transportée vers les bourgeons (mouvement acropétale) pour inhiber leur croissance (Foo et al., 2001; Morris et al., 2001).

Le clonage des gènes *MAX3* et *MAX4* d'*A. thaliana* (orthologues de *RMS5* et *RMS1* chez le pois, respectivement) a permis de les identifier comme codant des enzymes plastidiales, capables de cliver les caroténoïdes (Sorefan et al., 2003). Les gènes *MAX3* et *MAX4* codent respectivement pour AtCCD7 et AtCCD8, tous les deux membres de la famille des CCDs (Carotenoid Cleavage Dioxygenases). L'acide absissique (ABA) est aussi un produit du clivage des caroténoïdes (plus spécifiquement par les NCEDs), mais sa synthèse ne semble pas être moins importantes chez les mutants *rms* (Foo et al., 2005). Tous ces résultats montraient que le

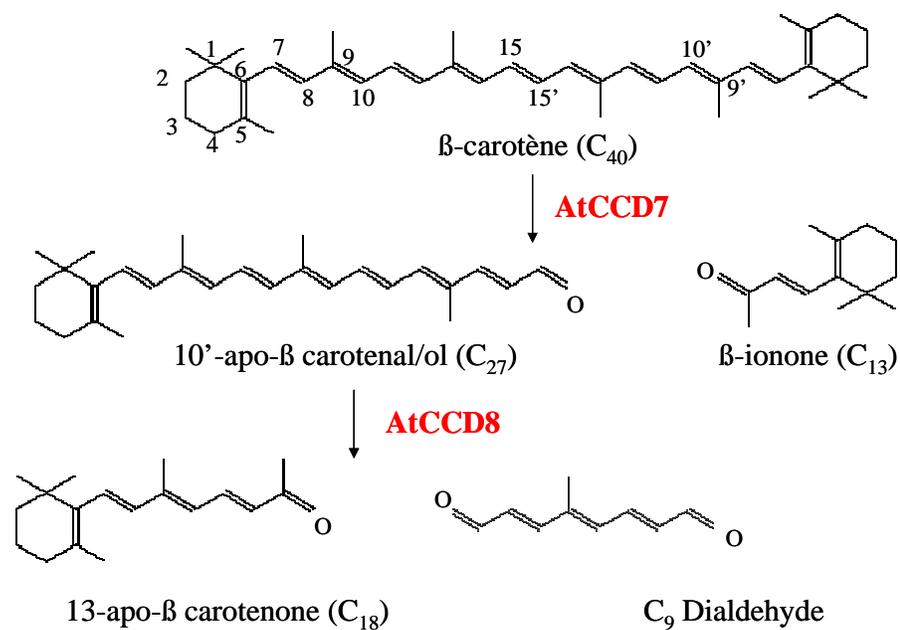


Fig. 21. Site de clivage proposé des enzymes AtCCD7 et AtCCD8. Le clivage du β -carotène par l'enzyme recombinante AtCCD7 (chez *E. coli*) produirait le substrat qui serait ensuite clivé par l'enzyme AtCCD8 pour former deux produits finaux, le 13-apo- β -carotenone et un C₉-dialdehyde. Le premier pourrait être le précurseur du signal SMS. D'après Schwartz, et al., 2004.

signal SMS était vraisemblablement un nouveau produit du clivage des caroténoïdes et non une hormone végétale déjà connue.

Par la suite, il a été démontré que le gène *RMS4* (orthologue de *MAX2* d'*A. thaliana*) exprimé principalement au niveau des bourgeons, codait pour une protéine à domaine LRR appartenant à la famille des protéines F-box (Johnson et al., 2006; Stirnberg et al., 2007). Les protéines F-box agissent au niveau du complexe SCF d'ubiquitination pour étiqueter les protéines qui seront détruites. Des études récentes ont démontré l'implication du protéasome 26S dans la régulation du signal de transduction (ex. protéolyse des récepteurs) de plusieurs hormones végétales, comme l'auxine, l'acide gibbérellique et l'éthylène (Chow et McCourt, 2006).

2.1.2. Activité biochimique des enzymes CCD7 et CCD8

Afin de caractériser les substrats et les produits de clivage des enzymes CCD7 et CCD8, une approche d'expression hétérologue chez *E. coli* a été utilisée. Les protéines AtCCD7 et AtCCD8 ont été exprimées chez des souches d'*E. coli* accumulatrices de caroténoïdes (Schwartz et al., 2004). Il a été montré par cette approche que la protéine AtCCD7 était capable de cliver spécifiquement le β -carotène (mais pas le lycopène ou la zéaxanthine) au niveau des doubles liaisons 9-10 (Fig. 21), les deux apocaroténoïdes produits étant le 10'-apo- β -caroténal (C_{27}) et le β -ionone (C_{13}). Aucun apocaroténoïde n'a été détecté en exprimant uniquement l'enzyme AtCCD8 chez *E. coli* même s'il semblerait que certains caroténoïdes aient été dégradés. Seule la co-expression des enzymes AtCCD7 et AtCCD8 chez *E. coli* a amené à la formation des deux produits du clivage par AtCCD7 et d'un troisième produit identifié comme pouvant être un 13-apo- β -caroténone ou caroténol (C_{18}). L'absence du 13-apo- β -caroténone quand AtCCD8 est exprimée seule chez *E. coli* suggère qu'AtCCD8 clive le 10'-apo- β -caroténal ou caroténol produit par AtCCD7. Les expériences de greffes et les expériences biochimiques ont permis de proposer que CCD7 et CCD8 agissent ensemble et successivement (CCD7 en amont de CCD8) afin de synthétiser le précurseur de l'hormone végétale SMS (Foo et al., 2001; Morris et al., 2001; Schwartz et al., 2004). Cependant il est possible qu'*in planta* ces enzymes plastidiales aient des fonctions biochimiques différentes ou additionnelles.

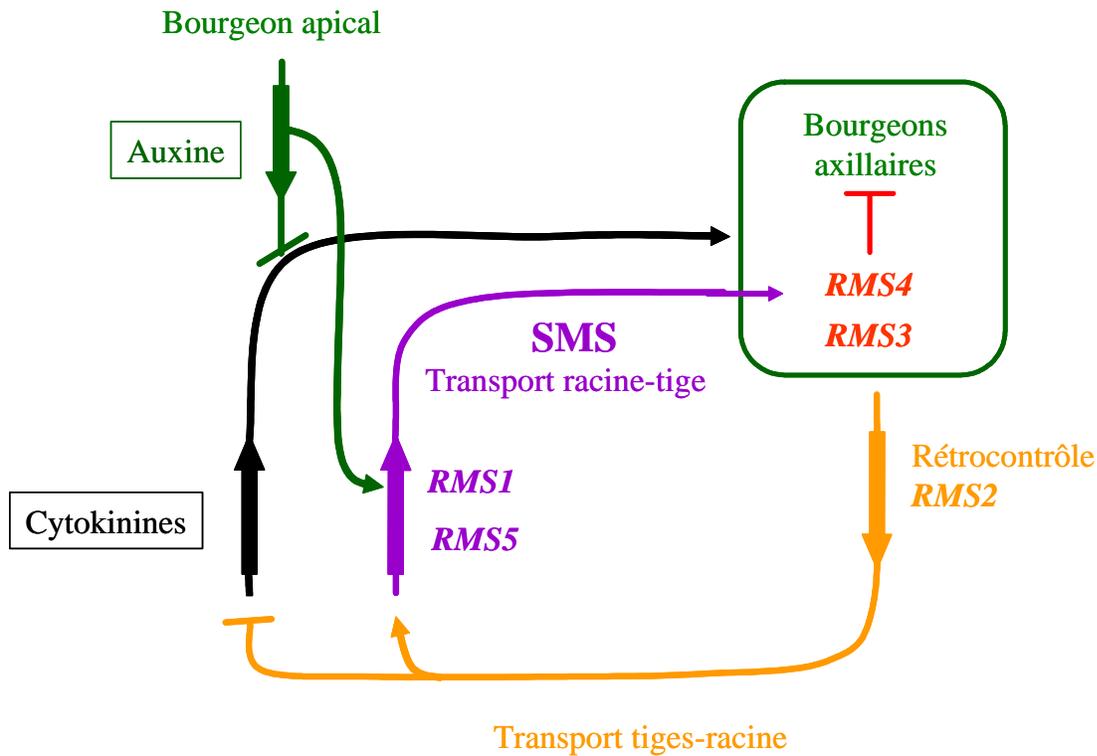


Fig. 22. Modèle de régulation de la croissance des bourgeons axillaires chez le pois. La synthèse de l'hormone SMS serait réalisée dans les racines par l'action consécutive des gènes *RMS5* et *RMS1*. Le signal SMS serait transporté vers la partie aérienne de la plante et la perception ou la transduction du signal impliquerait le produit du gène *RMS4*. Un rétrocontrôle de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de SMS et du transport des cytokinines se réaliserait via *RMS2*. L'auxine provenant du bourgeon apical inhiberait la synthèse et le transport des cytokinines et stimulerait l'expression des gènes *RMS1* et *RMS2*. D'après Morris et al., 2001.

2.1.3. Modèle de régulation de l'hormone SMS

Un mode d'action hypothétique de la voie SMS a été proposé dans lequel l'auxine exercerait un rôle important (Fig. 22). L'implication de l'auxine a été mise en évidence par des expériences de greffes et de décapitation du bourgeon apical (technique ayant servi auparavant pour proposer la théorie de la dominance apicale). Quand des tiges décapitées de plantes mutantes *rms1* étaient greffées à des racines sauvages, l'inhibition de la croissance des bourgeons par le signal SMS n'était pas observée. Par contre, quand ces mêmes plantes étaient traitées au niveau de l'apex avec de l'auxine exogène, la ramification des tiges était inhibée (Beveridge et al., 2000). De plus, il a été montré que le gène *RMS1* était surexprimé dans les racines en réponse à l'auxine (Foo et al., 2005).

Dans le modèle d'action proposé, *RMS1* avec *RMS5* seraient impliqués dans la synthèse du signal SMS au niveau des racines (Sorefan et al., 2003). Chez *A. thaliana*, des modifications structurales du signal SMS seraient possibles sous l'action d'une cytochrome P450 codée par le gène *MAX1* (Booker et al., 2005). Cependant, l'implication de l'homologue de *MAX1* chez le pois dans la synthèse de SMS, n'a pas encore été prouvée. Le signal SMS serait transporté des racines vers les tiges. La perception au niveau de chaque bourgeon impliquerait l'action du gène *RMS4*. Comme dans la régulation d'autres hormones, un phénomène de rétrocontrôle a aussi été mis en évidence dans le modèle SMS. Dans les mutants *rms5* et *rms4*, le gène *RMS1* est surexprimé au niveau des racines. Des expériences de greffes ont permis de démontrer que ce rétrocontrôle impliquait l'action du gène *RMS2*. Le gène *RMS2* contrôlerait la production d'un autre signal qui serait transporté des tiges vers les racines et contrôlerait l'expression de *RMS1* et la synthèse de cytokinines (Foo et al., 2005). La découverte d'autres mutants présentant un phénotype *ramosus* (ex. *rms3*) et probablement touchés dans la perception du signal SMS, permet de constater la complexité du mécanisme de régulation de la croissance des bourgeons.

Malgré cela, il a été suggéré que ce mécanisme était universel dans le règne végétal. Cette hypothèse a été appuyée par l'identification très récente de mutants de riz hyper-ramifiées (*dwarf1*, *dwarf10* et *dwarf3*) mutés respectivement dans les gènes orthologues à *RMS5*, *RMS1* et *RMS4* (Arite et al., 2007; Ishikawa et al., 2005; Zou et al., 2005). Il a ainsi été montré que le

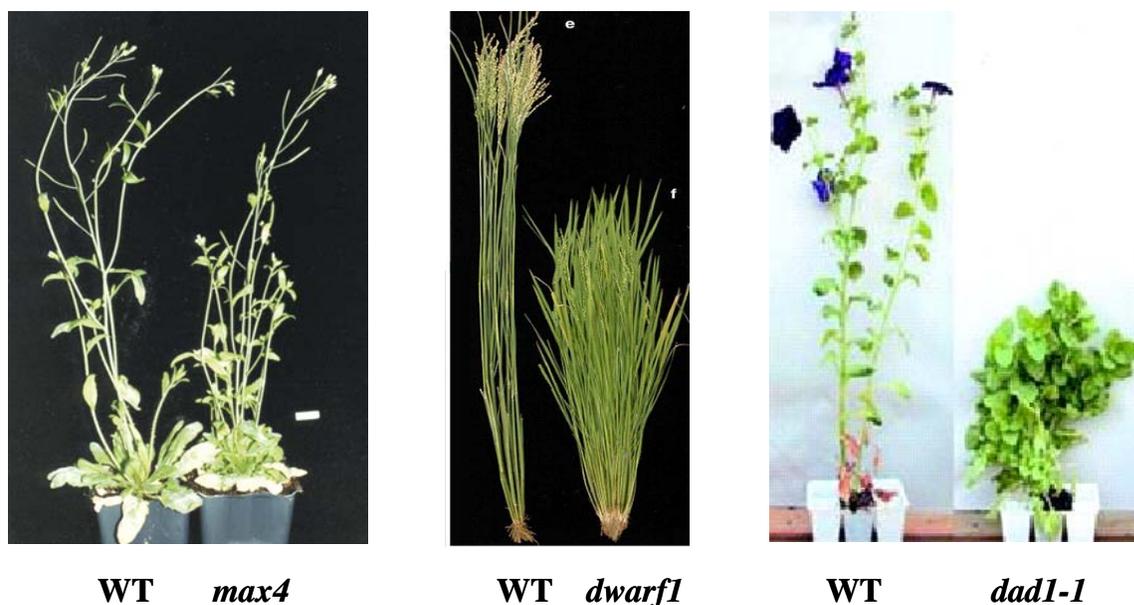


Fig. 23. Conservation évolutive des gènes impliqués dans la voie SMS. Phénotype ramifié des mutants déficients dans la synthèse de l'hormone SMS chez *Arabidopsis*, le riz et le pétunia.

Tableau 1. Gènes isolés dans différentes espèces et leur fonction putative dans la voie SMS. D'après Johnson et al., 2006.

	Biosynthèses de SMS			Rétrocontrôle	Perception de SMS		
	<i>CCD7</i>	<i>CCD8</i>	<i>P450</i>		<i>F-box</i>		
Arabidopsis	<i>MAX3</i>	<i>MAX4</i>	<i>MAX1</i>	-	<i>MAX2</i>	-	-
Pois	<i>RMS5</i>	<i>RMS1</i>	<i>PsMAX1</i>	<i>RMS2</i>	<i>RMS4</i>	<i>RMS3</i>	-
Petunia	<i>DAD3</i>	<i>DAD1</i>	-	-	-	-	<i>DAD2</i>
Riz	<i>Dwarf10</i>	<i>Dwarf1</i>	<i>OsMAX1</i>	-	<i>Dwarf3</i>	-	-

mécanisme de contrôle de la croissance des bourgeons par l'action de l'hormone SMS était partagé par les plantes monocotylédones et dicotylédones (Fig. 23 et Tableau 1).

2.1.4. Présentation des résultats

Afin de mieux comprendre l'implication et l'importance des strigolactones dans la symbiose MA nous avons utilisé une approche de génétique inverse dans laquelle le choix des mutants de pois *rms1* et *rms5* a été adopté.

L'ensemble des résultats obtenus sera donc présenté dans ce chapitre, divisé en deux parties. Dans la première partie seront présentés les résultats obtenus dans l'étude du phénotype biochimique des mutants *rms1* et *rms4* (réalisée en collaboration avec une équipe toulousaine, INSA), puis, sous forme d'article, dans l'étude du phénotype mycorhizien de ces mêmes mutants (Gomez-Roldan et al., 2008). Cet article démontre la forte implication des strigolactones non seulement dans la symbiose MA et l'infection des plantes par les plantes parasites (expériences réalisées en collaboration avec une équipe des Pays-Bas), mais aussi dans la plante elle-même, en tant qu'hormone (expériences réalisées avec les chercheurs de l'INRA de Versailles et de l'Université du Queensland en Australie).

Dans la deuxième partie de ce chapitre seront présentés les résultats obtenus avec le mutant *rms5* ainsi que des analyses biochimiques supplémentaires, qui nous permettront d'avoir une vision plus précise du rôle des strigolactones dans la symbiose MA.

2.2. Article

Strigolactone inhibition of shoot branching

Victoria Gomez-Roldan, Soraya Fermas, Philip B. Brewer, Virginie Puech-Pagès, Elizabeth A. Dun, Jean-Paul Pillot, Fabien Letisse, Radoslava Matusova, Saida Danoun, Jean-Charles Portais, Harro Bouwmeester, Guillaume Bécard, Christine A. Beveridge, Catherine Rameau et Soizic F. Rochange.

Résumé

Les mutants *rms* (*ramosus*) du pois, dont les gènes mutés *rms1* et *rms5* codent pour des enzymes de clivage des caroténoïdes, présentent une hyper ramification de leurs tiges. Ce phénotype serait due à un défaut de synthèse d'une nouvelle hormone végétale appelée SMS (Shoot Multiplication Signal) dont la structure chimique était jusqu'alors inconnue. Nous montrons ici que le mutant *rms1* (*ccd8*) de pois est déficient en strigolactones, or ces molécules sont connues comme étant stimulatrices de la germination des graines des plantes parasites *Striga* et *Orobanche* et également de la croissance présymbiotique des champignons mycorhiziens à arbuscules (MA). En accord avec les phénotypes attendus pour des plantes déficientes en strigolactones, les exsudats racinaires du mutant *rms1* stimulent plus faiblement la germination des graines d'*Orobanche crenata* et la ramification des hyphes germinatifs du champignon MA *Gigaspora rosea*. D'autre part, la symbiose mycorhizienne s'établit moins facilement chez le mutant *rms1* et l'ajout exogène d'un analogue de synthèse des strigolactones, le GR24, permet de rétablir son phénotype mycorhizien, démontrant ainsi l'importance du rôle des strigolactones dans la symbiose MA. Nous montrons d'autre part que l'application exogène de strigolactones sur les bourgeons axillaires du mutant *rms1* permet de restaurer le phénotype peu ramifié de la plante sauvage. Le mutant *rms4*, lui aussi hyper ramifié, produit correctement l'hormone SMS mais ne la perçoit plus normalement. Il nous a servi de témoin négatif. Nous montrons qu'il est capable de synthétiser normalement les strigolactones et qu'il est insensible au traitement par des strigolactones exogènes. Ces mêmes réponses sont observées avec les mutants correspondants

chez *Arabidopsis*. Nous proposons que les strigolactones, ou des molécules proches, capables d'inhiber la croissance des bourgeons axillaires des plantes soient l'hormone végétale SMS dont la structure chimique était recherchée depuis plusieurs années.

Strigolactone inhibition of shoot branching

Victoria Gomez-Roldan¹, Soraya Fermas², Philip B. Brewer³, Virginie Puech-Pagès¹, Elizabeth A. Dun³, Jean-Paul Pillot², Fabien Letisse⁴, Radoslava Matusova⁵, Saida Danoun¹, Jean-Charles Portais⁴, Harro Bouwmeester^{5,6}, Guillaume Bécard¹, Christine A. Beveridge^{3,7*}, Catherine Rameau^{2*} & Soizic F. Rochange^{1*}

A carotenoid-derived hormonal signal that inhibits shoot branching in plants has long escaped identification. Strigolactones are compounds thought to be derived from carotenoids and are known to trigger the germination of parasitic plant seeds and stimulate symbiotic fungi. Here we present evidence that *carotenoid cleavage dioxygenase 8* shoot branching mutants of pea are strigolactone deficient and that strigolactone application restores the wild-type branching phenotype to *ccd8* mutants. Moreover, we show that other branching mutants previously characterized as lacking a response to the branching inhibition signal also lack strigolactone response, and are not deficient in strigolactones. These responses are conserved in *Arabidopsis*. In agreement with the expected properties of the hormonal signal, exogenous strigolactone can be transported in shoots and act at low concentrations. We suggest that endogenous strigolactones or related compounds inhibit shoot branching in plants. Furthermore, *ccd8* mutants demonstrate the diverse effects of strigolactones in shoot branching, mycorrhizal symbiosis and parasitic weed interaction.

More than a decade ago, increased branching mutants in garden pea (*Pisum sativum* L.) and petunia (*Petunia hybrida*), *rms1* and *dad1* respectively, revealed that a mobile signal produced in shoot and root inhibits shoot branching^{1,2}. For simplicity, we refer to this signal as SMS (shoot multiplication signal)³. SMS moves acropetally in shoots and inhibits lateral bud outgrowth⁴. On the basis of measurements of cytokinin, auxin and abscisic acid in *rms1* mutants, and in a similar mutant *rms5*, SMS was concluded to be a novel plant hormone^{2,5,6}. *MAX3* and *MAX4* shoot branching genes in *Arabidopsis thaliana* encode carotenoid cleavage dioxygenases *CCD7* and *CCD8* (refs 7–9), and are orthologous to *RMS5* and to *RMS1* in pea, respectively^{10,11} acting in the synthesis of SMS (refs 5, 10, 11). Although we cannot be sure of their role *in planta*, on the basis of studies in *Escherichia coli*, *CCD7* and *CCD8* may be involved in the sequential cleavage of β -carotene^{7,8,12}, indicating that SMS may be carotenoid derived. *CCD7* and *CCD8* are conserved across angiosperm species including monocotyledons^{3,13,14}. Grafting studies indicate that *RMS4* in pea and *MAX2* in *Arabidopsis*, which encode F-box leucine-rich repeat proteins^{11,15,16}, confer response to SMS^{2,17,18}.

The strategy used here to identify SMS relies on the suggestion that SMS may be an identified carotenoid-derived compound that has already been described as controlling another biological process. Strigolactones are examples of such compounds.

Strigolactones are thought to be the principal plant-derived signal that promotes seed germination of the parasitic plants *Striga* and *Orobancha*^{19,20}. Recent data suggest that strigolactones might also act in arbuscular mycorrhizal symbiosis. This interaction, probably the most widespread and significant symbiosis in nature²¹, associates Glomeromycota fungi with the roots of most land plants²². Strigolactones are thought to function as an early host plant recognition signal, acting at picomolar concentrations to trigger the characteristic hyphal branching of arbuscular mycorrhizal fungi before root colonization^{23,24}. They are found in root exudates of many species including dicotyledons and monocotyledons²⁰ and have also

been detected in shoots^{25,26}. The fact that they are also present in the non-mycotrophic plant *Arabidopsis*²⁷ suggests that they may have additional functions in plants. In 2005, one study²⁸ showed that plants treated with fluridone, an inhibitor of an early enzyme in the biosynthetic pathway of carotenoids, had reduced stimulation of the germination of parasitic plant seeds. That study also proposed a biochemical pathway in which β -carotene is cleaved to produce the strigolactones²⁸.

No strigolactone biosynthesis mutants have previously been identified. Given the known properties of strigolactones, our approach first involved findings relating to fungal symbiosis and parasitic seed germination, and then finally to shoot branching. We showed that *P. sativum ccd8* mutations affect mycorrhizal symbiosis and that this could be restored with exogenous strigolactone. We then observed depleted strigolactone content in *P. sativum ccd8* samples. Finally, we observed shoot branching inhibition by exogenous strigolactone in these mutants.

Mycorrhizae and parasitic plant responses

As *CCD7* and *CCD8* might be involved in β -carotene metabolism^{7,8,12}, the corresponding mutants are candidates for strigolactone deficiency²⁸. As detection of strigolactones is not trivial, we chose to screen the mutants for arbuscular mycorrhizal fungal hyphae branching and parasitic seed germination defects. We chose garden pea because it can be infected by arbuscular mycorrhizal fungi and parasitic plants and used *rms1* (*P. sativum ccd8*) as the type-line for this phenotype. Enhanced branching of arbuscular mycorrhizal fungal hyphae has been used as a bioassay for the identification of strigolactones^{23,24}. Root exudates of *ccd8* plants had significantly reduced activity in promoting fungal hyphae branching when compared with wild-type exudates (Fig. 1a). Similar fungal hyphae branching results were obtained with another arbuscular mycorrhizal fungal species, *Gigaspora gigantea*, and with root exudates of *ccd7* plants (data not shown).

Another key feature of strigolactones is that they stimulate the seed germination of parasitic plants such as *Orobancha*, a natural parasite

¹Université de Toulouse; UPS; CNRS; Surface Cellulaire et Signalisation chez les Végétaux, 24 chemin de Borde Rouge, F-31326 Castanet-Tolosan, France. ²Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, Institut J. P. Bourgin, UR254 INRA, F-78000 Versailles, France. ³ARC Centre of Excellence for Integrative Legume Research, The University of Queensland, Brisbane 4072, Australia. ⁴CNRS, UMR5504, INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, INSA de Toulouse, F-31400 Toulouse, France. ⁵Plant Research International, PO Box 16, 6700 AA Wageningen, the Netherlands. ⁶Laboratory of Plant Physiology, Wageningen University, Arboretumlaan 4, 6703 BD Wageningen, the Netherlands. ⁷School of Integrative Biology, The University of Queensland, Brisbane 4072, Australia.

*These authors contributed equally to this work.

of pea. The germination of *Orobanche* seeds exposed to *ccd8* mutant exudates of pea was markedly decreased compared with wild-type exudates (Fig. 1b). Similar results were obtained for *ccd7* plants (data not shown). This demonstrates that *ccd7* and *ccd8* mutants lack host recognition signals required for this interaction. In addition, three concentrations of the synthetic strigolactone analogue GR24 (ref. 23), commonly used in strigolactone research, were tested in both bioassays (hyphal branching and *Orobanche* germination) and showed that relatively small changes in biological responses were induced by large differences in strigolactone concentration (Fig. 1a, b). The reduced activities observed in *ccd8* mutant root exudates of pea may therefore reflect a large decrease in strigolactone content.

To test whether the effects on fungal hyphae branching translate to reduced mycorrhizal colonization in *P. sativum ccd8* plants, we examined arbuscular mycorrhizal symbiosis with the symbiont *Glomus intraradices*. The extent of root colonization of these *ccd8* mutants was reduced compared to wild type (Fig. 1c). Similar results were obtained with other pea *ccd8* mutant lines, and after inoculation with another arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora rosea* (data not

shown). Supplementation with GR24 restored the capacity of *ccd8* mutant plants to develop arbuscular mycorrhizal symbiosis and did not affect mycorrhization of wild-type plants (Fig. 1c). Together, these observations indicate an important role for strigolactones in the arbuscular mycorrhizal interaction.

Strigolactone analysis

The nine strigolactones identified so far share a common four-ring backbone (Fig. 2a) and differ from one another by the degree of saturation of rings A and B and the combinations of substituents that they carry²⁹.

Using liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS-MS), we searched for molecules that on fragmentation yield a daughter ion at m/z 97 (D ring), characteristic of strigolactones, by using the precursor ion mode. This method allowed detection of two strigolactones in wild-type pea root exudate extracts (Supplementary Fig. 1). Compound 1 comprised ions at m/z 411 [M + Na]⁺, m/z 389 [M + H]⁺ and m/z 347 [M + H - CH₂CO]⁺ (Fig. 2a), suggesting that this compound is orobanchyl acetate (C₂₁H₂₄O₇)³⁰, a major strigolactone reported recently in pea³¹. Co-chromatography of an orobanchyl acetate standard and the endogenous compound was observed using LC/MS-MS in the multiple reaction monitoring (MRM) mode (Fig. 2b). Furthermore, accurate mass MS and MS-MS data determined by ultra-performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC/QTOFMS) for compound 1 in the sample match that of the orobanchyl acetate standard (Fig. 2c, d), and all ions are within 30 parts per million (p.p.m.) of the corresponding theoretical masses. We conclude that compound 1 is orobanchyl acetate.

The second compound was characterized by ions at m/z 422, 405 and 345 (Fig. 2e). In UPLC/QTOFMS, this compound showed ions at m/z 405.1555 and m/z 427.1377 (Fig. 2f). These masses were within 2 p.p.m. of the theoretical masses for the proton and sodium adducts of a molecule of elemental composition M = C₂₁H₂₄O₈ (404 Da). This compound could correspond to a putative strigolactone recently reported in pea root exudates with a molecular mass of 404 Da³¹. The accurate masses of the daughter ions after MS-MS (Fig. 2f) were equivalent (with a difference of one oxygen atom) to those produced by collision-induced dissociation of orobanchyl acetate³⁰ (Fig. 2c). The daughter ions at m/z 97.0285 ([D ring]⁺) and 248.1058 ([M + H - D ring - CH₃COOH]⁺) support the identification of this compound as an acetylated strigolactone. Although its exact structure could not be determined, it can be speculated that this compound corresponds to an acetylated strigolactone with an epoxy or hydroxyl function.

Subsequently, we analysed samples by LC/MS-MS in the MRM mode to maximize sensitivity. Characteristic transitions (precursor ion > daughter ion) for orobanchyl acetate and the second strigolactone were monitored. No other known strigolactones could be detected (data not shown). Strigolactones were analysed in the root exudates of wild-type pea, the SMS synthesis mutant *ccd8*, and in the SMS response mutant *rms4*. Both strigolactones were detected in wild-type and *rms4* exudates but were undetectable in *ccd8* exudates (Fig. 3). Analyses of root tissue extracts gave similar results (data not shown). Strigolactone deficiency in *P. sativum ccd* mutant root exudates was confirmed with independent alleles of *ccd8* and of *ccd7* (data not shown), demonstrating that the effect was due to the *ccd* mutations. The depleted strigolactone content in these *ccd8* mutant exudates (Fig. 3) combined with the reduced mycorrhizal colonization in *ccd8* plants, which can be restored by exogenous strigolactone (Fig. 1c), supports the hypothesis that CCD8 in pea controls strigolactone content and arbuscular mycorrhizal interactions.

Strigolactone application inhibits shoot branching

If SMS is a strigolactone in pea, then outgrowth of buds in *P. sativum ccd8* plants should be inhibited by an active strigolactone whereas those of *rms4* should not. By applying the synthetic strigolactone

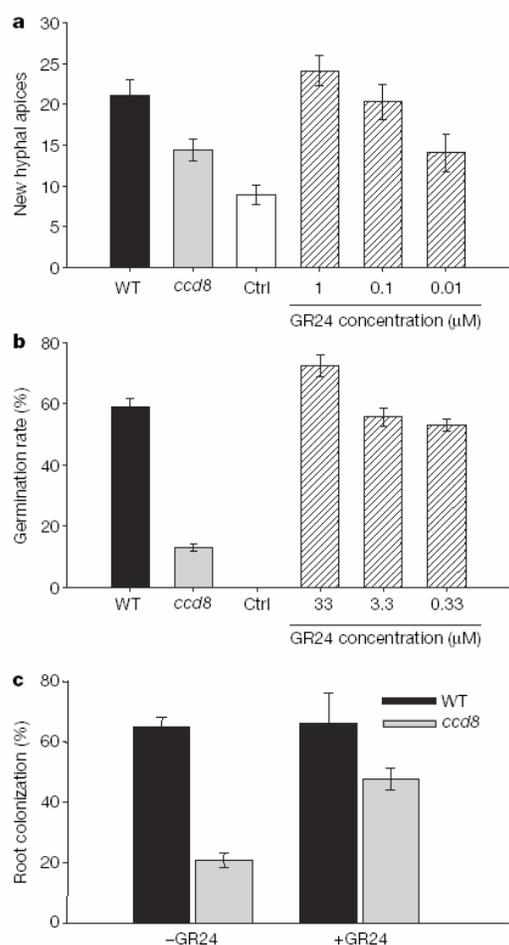


Figure 1 | Mycorrhizae and parasitic plant responses in pea *ccd8* mutants. **a**, Branching response of germinated spores of *Gigaspora rosea* to wild-type (WT) or *rms1-10* (*ccd8*) root exudate extracts, 10% acetonitrile only (Ctrl) or GR24. **b**, Germination rate of *Orobanche crenata* seeds 7 days after treatment with root exudate extracts, water (Ctrl) or GR24. **c**, Percentage of root colonization by *Glomus intraradices* of wild-type and *rms1-3* (*ccd8*) mutant plants, treated or not with 10 nM GR24. Data are means ± s.e.m. (**a**, $n > 10$; **b**, $n = 3$ with 80–100 seeds per replicate; **c**, $n = 4$).

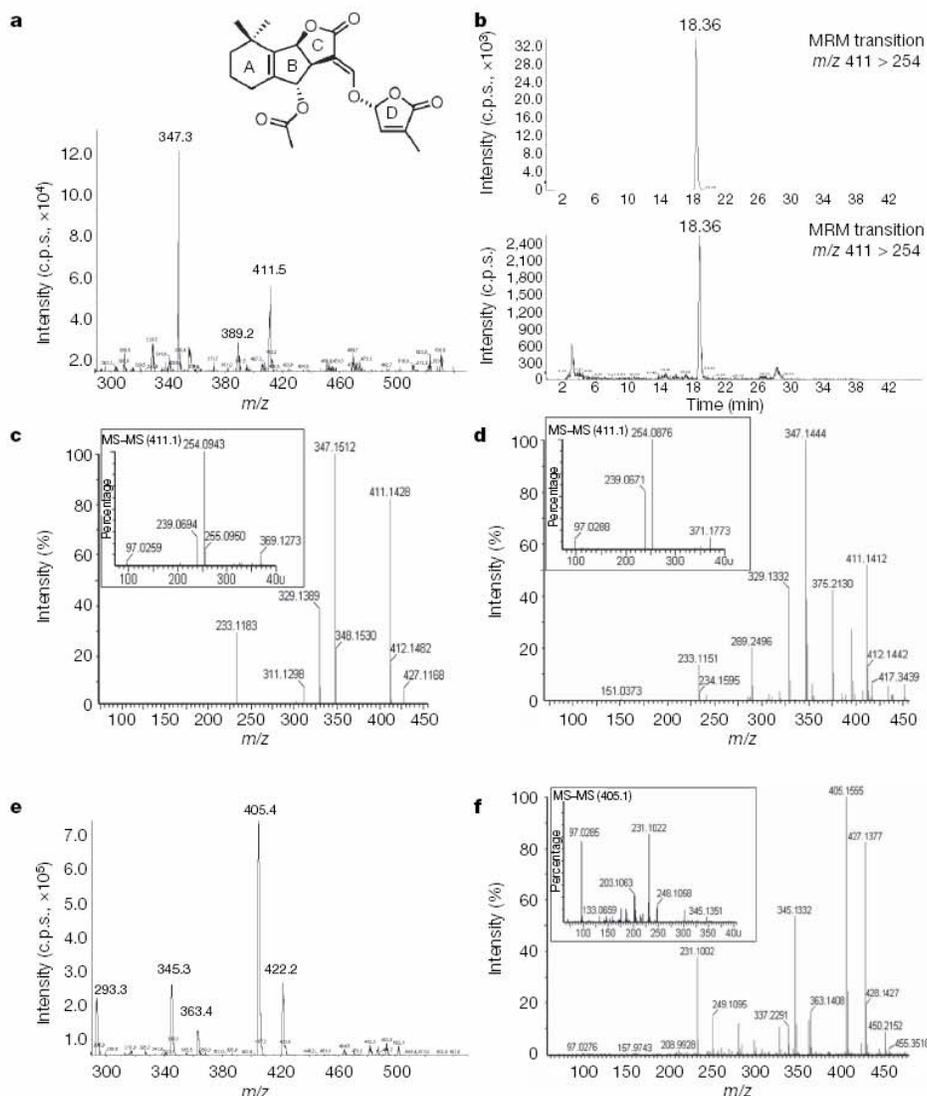


Figure 2 | Detection of two strigolactones in pea by LC/MS-MS. **a**, Positive ion mass spectrum of compound 1 extracted from the precursor ion contour plot, and structure of orobanchyl acetate. c.p.s., counts per second. **b**, One-channel MRM chromatogram of an orobanchyl acetate standard (top) and wild-type root exudate extract (bottom). **c**, **d**, UPLC/QTOFMS and MS-MS

spectra obtained for an orobanchyl acetate standard (**c**) and compound 1 in wild-type root exudate extract (**d**). **e**, Positive ion mass spectrum of compound 2 extracted from the precursor ion contour plot. **f**, UPLC/QTOFMS and MS-MS spectra obtained for compound 2 in the wild-type root exudate extract.

analogue GR24 directly to the axillary buds of *ccd8* and *rms4* plants we observed the expected result that the SMS-deficient *ccd8* plants responded to the treatment, whereas the SMS-insensitive *rms4* plants did not (Fig. 4a). Direct application of a greater strigolactone dose (500 nM GR24) also failed to inhibit outgrowth in *rms4* plants (data not shown). Axillary buds of *ccd8* plants were greatly inhibited by only one 10 μ l application of 100 nM GR24 supplied directly to the bud. In contrast, buds of control *ccd8* plants grew 14 mm over 8 days (Fig. 4a).

As SMS is known to act as a long-distance signal and move acropetally in shoots⁴ we developed a method to feed GR24 to the vascular stream of shoots (see Methods). Ten nanomolar or higher concentrations of GR24 were sufficient to inhibit bud outgrowth in *P. sativum ccd8* plants at the two nodes above the feeding site (Fig. 4b; data not shown). *ccd7* plants showed a similar response as *ccd8* plants (data not shown). As the pulse of solution supplied was diluted into the endogenous transport stream and transported widely throughout

the shoot system above (dye studies; data not shown), it is probable that GR24 is highly active, consistent with the expected properties of SMS based on interstock grafting experiments^{1,4,7}.

To test whether other plant species are able to respond to strigolactone-mediated shoot branching inhibition, we tested the response of *Arabidopsis thaliana* branching mutants to application of GR24 to leaf axils and axillary buds before and during bolting (Fig. 5). In *A. thaliana ccd8* mutant plants, shoot branching decreased in response to GR24. In addition, the *max1* mutant of *Arabidopsis*, which acts downstream of *ccd8* in the synthesis of SMS¹⁸, responded to GR24 (Fig. 5). Moreover, branching in the SMS response mutant *max2* (refs 15, 32) was not inhibited by GR24. These results are expected if the SMS in *Arabidopsis* is a strigolactone.

As individual buds were treated in pea, the repression by GR24 may be reinforced by dominance from non-treated buds³³. In contrast, all *Arabidopsis* buds were treated simultaneously, possibly nullifying this effect. Alternatively, *Arabidopsis* plants may require earlier

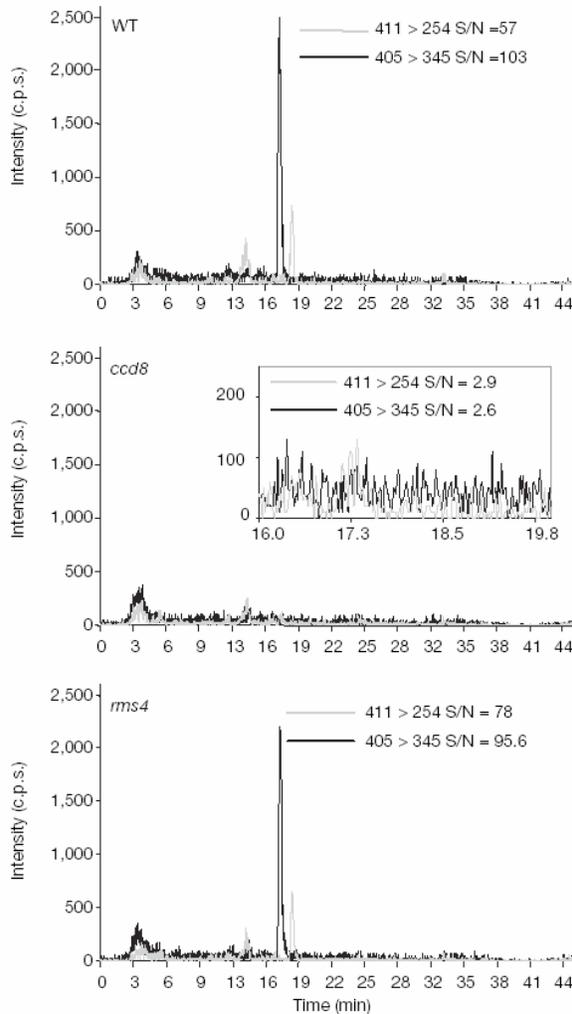


Figure 3 | *ccd8* mutant root exudates of pea are deficient in strigolactones compared to wild-type and *rms4* plants. Characteristic transitions for orobanchyl acetate (grey line) and the second strigolactone (black line) were monitored in the MRM mode. The relevant part of the *rms1-10* (*ccd8*) chromatogram is enlarged in the inset; no significant peaks are seen. Signal-to-noise (S/N) ratios are given for both peaks observed in wild-type (WT) and *rms4* plants and for signals measured at the same retention times in *ccd8* plants.

applications for a full response. The increase in branching seen in *max2*-treated plants, but not in *rms4* plants (Figs 4a and 5), may be due to the different treatment methods or to differences in feedback regulation between the two species³. Indeed, the *max2*-increased branching response is not observed under all treatment conditions (data not shown).

The response of *ccd8* and *rms4* mutants to strigolactone therefore spans the classical criteria expected for hormone action. These include removal via genetic approaches and replacement by exogenous hormone treatment, as well as sensitivity, specificity and long-distance signalling. We observed reduced strigolactone content in *P. sativum ccd8* mutants compared to wild-type plants (Fig. 3), and branching is suppressed when strigolactone is supplied directly to the bud or supplied within the stem below the bud (Fig. 4). The branching inhibition response when strigolactone is supplied within the stem below a bud is consistent with the expectation that SMS moves acropetally and can act at a distance^{4,34}. Moreover, the ability of GR24 to inhibit branching when added directly to buds implies that it may

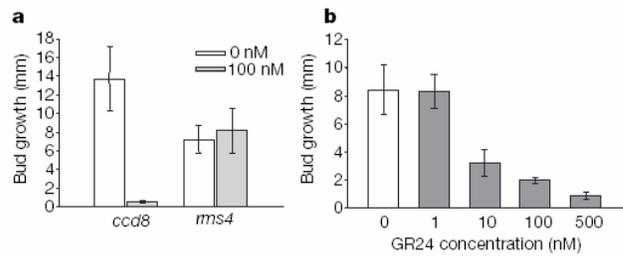


Figure 4 | GR24 inhibits bud outgrowth in pea. **a**, Axillary buds of *rms1-10* (*ccd8*) plants respond to GR24 whereas those of *rms4-3* do not. GR24 (0 or 100 nM) was applied directly to the bud at node 4. **b**, GR24 inhibits bud outgrowth of *rms1-10* plants at low concentrations and can move acropetally in shoots. GR24 and control solutions were supplied to the vascular stream between nodes 3 and 4. **a, b**, Bud growth was measured at node 4, 8 days (**a**) and node 5, 10 days (**b**) after treatment. Data are means \pm s.e.m. (**a**, $n = 9$; **b**, $n = 8$).

act at this site. Furthermore, the dose–response to strigolactone from 10 nM and above is consistent with the dose relationship and sensitivity expected for a plant hormone (Fig. 4b)^{35–37}. *rms4* mutants, characterized as defective in SMS response, do not show shoot branching inhibition in response to strigolactone (Fig. 4a) and do not have reduced strigolactone content (Fig. 3). This is consistent with strigolactones acting downstream of CCD8 and upstream of RMS4 and demonstrates that the effect of strigolactones is specific to the SMS signalling pathway. Consistent with the suggested conservation of the SMS biosynthesis and signalling pathway in plants^{3,13,14}, strigolactone application also inhibited branching in SMS synthesis mutants (*ccd8* and *max1*) but not in the SMS response mutant (*max2*) of *Arabidopsis*. Other than the effects on shoot branching, we observed no other effects of our strigolactone treatments to shoots, again consistent with the non-pleiotropic phenotype of these mutants.

These data raise several possibilities. Either the novel hormone SMS is a strigolactone or closely related molecule, strigolactones regulate the level of SMS, or SMS regulates the level of strigolactones, which in turn inhibit branching. Many plant hormones act in tandem with other hormones. Indeed, auxin may control shoot branching by regulating SMS³⁸. Nevertheless, strigolactones are now the strongest candidate for SMS and adhere to the criteria expected for a plant hormone. Future studies will focus on confirming the identity of the active molecule(s) *in planta*, and on their biosynthesis, reception and signal transduction pathways. This will require purified or synthetic strigolactones identical to the naturally occurring molecules with and without isotope labelling, and the identification of active and inactive analogues. In the absence of multiple biosynthetic and metabolic mutants on the SMS pathway, conclusive evidence for the identity

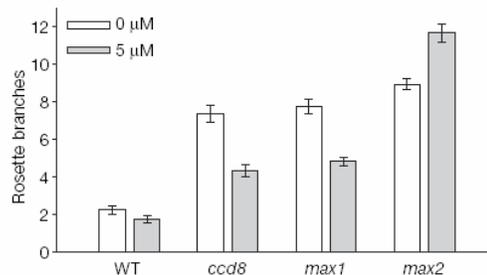


Figure 5 | GR24 inhibits bud outgrowth in *Arabidopsis*. Treatments of 0 or 5 μ M GR24 were applied to the rosette axillary buds and leaf axils of wild-type, *max4-1* (*ccd8*), *max1-1* and *max2-1* plants (Columbia ecotype). Plants were treated every third day for 20 days from 23 days of age. The number of branches was counted on 48-day-old plants. Data are means \pm s.e.m. ($n = 25-41$).

of SMS may involve the binding of a molecule to a putative receptor target, perhaps RMS4/MAX2, known to act in buds or the adjacent stem to inhibit branching.

Implications

This discovery provides the basis for applications in forestry, horticulture and crop science where these natural compounds, unlike other hormones such as cytokinin and auxin, may be used to specifically regulate shoot branching with minimal side effects and without the need for transgenic technology.

Our data provide the first genetic evidence for the importance of strigolactones in two very different interactions with plants—one beneficial (arbuscular mycorrhizal symbiosis) and the other detrimental (plant parasitism)—as well as evidence that the novel hormone that controls shoot branching may belong to the strigolactone family. Thus, strigolactones may act as internal as well as rhizosphere signals. Interestingly, both shoot branching and mycorrhizal colonization of plants date to the very early development of land plants. Arbuscular mycorrhizal fungi arose at a time when the land flora consisted mostly of bryophytes and it is likely that they had a crucial role in facilitating the colonization of the land by plants³⁹. The emergence of axillary meristems and branching in vascular plants was critical for the development of large plants⁴⁰. Genes probably encoding CCD7 and CCD8 occur in the moss *Physcomitrella patens*, indicating that the strigolactone biosynthetic pathway may have developed concomitantly with these two major innovations. In mycotrophic plants, strigolactone levels in root exudates are markedly affected by nutrient supply, which may relate to a putative control by plants of their degree of colonization by arbuscular mycorrhizal fungi according to their needs^{25,41}. Whether plants have evolved mechanisms to control strigolactone synthesis and localization independently for the stimulation of symbiosis and the control of shoot architecture deserves further investigation.

The fact that only three genes so far, *CCD7*, *CCD8* and *MAX1*, have been identified as potentially encoding strigolactone biosynthetic enzymes is not unlike auxin and cytokinin biosynthetic pathways where genetic redundancy has greatly hampered the isolation of mutants from phenotypic screens^{42,43}. Indeed, *MAX1* is represented by multiple copies in other species investigated, including pea and rice (data not shown). Strigolactone application combined with microarray studies will be useful for the isolation and characterization of branching mutants.

Notwithstanding the possibility that new roles for strigolactones are yet to be discovered, strigolactones may differ from other plant hormones by their apparent specific action in plants, as shown by the phenotype of the strigolactone-related mutants and the non-pleiotropic response to strigolactone application. Highly pleiotropic plant hormones, such as auxin⁴⁴, can mask the role of other more specific hormones. Indeed, this was the case for strigolactones, as for many years auxin, cytokinin and abscisic acid were thought to be the only hormones that control branching². For shoot branching, grafting was an essential tool to demonstrate the existence of a novel long-distance signal, and to separate its role from other hormones^{2,45}. This report of the inhibitory effect of a strigolactone on axillary bud outgrowth, together with the availability of genetic and biochemical tools, should allow the determination of the mode of action of strigolactones in this process and help resolve the debate on how auxin affects shoot branching^{13,46}. Such progress will be an important step towards a deeper understanding of plant development and its complex regulation.

METHODS SUMMARY

For the collection of root exudates, 4-week-old plants were removed from pots, their roots were rinsed and the plants were kept for 24 h in phosphate-free Long Ashton nutrient solution (LANS)⁴⁷. Root exudates were extracted with one volume of ethyl acetate and dried. *Gigaspora rosea* hyphal branching bioassays were performed as described²⁴ with partially purified root exudate samples. The

number of newly formed hyphal apices was determined 48 h after treatment. *Orobanche crenata* seed germination bioassays were carried out as described²⁸; seeds were treated with 50 µl exudate extracts corresponding to 4 mg root dry weight. For the determination of mycorrhizal capacity, germinated pea seeds were planted in pots containing 300 spores of *Glomus intraradices* or 30 spores of *Gigaspora rosea*. The percentage of root length colonized by the fungus, that is, showing arbuscules, vesicles or both, was determined after 6 weeks in culture by the gridline intersection method⁴⁸, after staining with Schaeffer black ink⁴⁹. Strigolactone detection was performed using a 4000 Q Trap mass spectrometer coupled to a high performance liquid chromatography (HPLC) system. Accurate masses were acquired with a UPLC/QTOF device. For shoot branching in pea, GR24 treatments were performed on 10-day-old plants. Axillary buds at node 4 were treated with 10 µl of 0 or 100 nM GR24. For vascular supply, a thread submerged in GR24 solution was passed through the stem between nodes 3 and 4 using a needle; the outgrowth of the bud at node 5 was measured. *Arabidopsis* plants were treated every third day for 20 days from 23 days of age (pre-bolting). Treatments were applied to the axillary buds or leaf axils with 50 µl per plant of 0 or 5 µM GR24. The number of rosette branches (≥5 mm) was counted on 48-day-old plants.

Full Methods and any associated references are available in the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Received 17 June; accepted 18 July 2008.

Published online 10 August 2008.

- Napoli, C. Highly branched phenotype of the petunia *dad1-1* mutant is reversed by grafting. *Plant Physiol.* **111**, 27–37 (1996).
- Beveridge, C. A., Symons, G. M., Murfet, I. C., Ross, J. J. & Rameau, C. The *Rms1* mutant of pea has elevated indole-3-acetic acid levels and reduced root-sap zeatin riboside content but increased branching controlled by graft transmissible signal(s). *Plant Physiol.* **115**, 1251–1258 (1997).
- Beveridge, C. A. Axillary bud outgrowth: sending a message. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**, 35–40 (2006).
- Foo, E., Turnbull, C. G. & Beveridge, C. A. Long-distance signaling and the control of branching in the *Rms1* mutant of pea. *Plant Physiol.* **126**, 203–209 (2001).
- Morris, S. E., Turnbull, C. G., Murfet, I. C. & Beveridge, C. A. Mutational analysis of branching in pea. Evidence that *Rms1* and *Rms5* regulate the same novel signal. *Plant Physiol.* **126**, 1205–1213 (2001).
- Dodd, I. C., Ferguson, B. J. & Beveridge, C. A. Apical wilting and petiole xylem vessel diameter of the *Rms2* branching mutant of pea are shoot controlled and independent of a long-distance signal regulating branching. *Plant Cell Physiol.* **49**, 791–800 (2008).
- Booker, J. et al. MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Curr. Biol.* **14**, 1232–1238 (2004).
- Auldridge, M. E. et al. Characterization of three members of the *Arabidopsis* carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family. *Plant J.* **45**, 982–993 (2006).
- Bouvier, F., Isner, J. C., Dogbo, O. & Camara, B. Oxidative tailoring of carotenoids: a prospect towards novel functions in plants. *Trends Plant Sci.* **10**, 187–194 (2005).
- Sorefan, K. et al. MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in *Arabidopsis* and pea. *Genes Dev.* **17**, 1469–1474 (2003).
- Johnson, X. et al. Branching genes are conserved across species. Genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals. *Plant Physiol.* **142**, 1014–1026 (2006).
- Schwartz, S. H., Qin, X. & Loewen, M. C. The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. *J. Biol. Chem.* **279**, 46940–46945 (2004).
- Mouchel, C. F. & Leyser, O. Novel phytohormones involved in long-range signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 473–476 (2007).
- Doust, A. N. Grass architecture: genetic and environmental control of branching. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 21–25 (2007).
- Stimberg, P., van De Sande, K. & Leyser, H. M. MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Development* **129**, 1131–1141 (2002).
- Ishikawa, S. et al. Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice. *Plant Cell Physiol.* **46**, 79–86 (2005).
- Beveridge, C. A., Ross, J. J. & Murfet, I. C. Branching in pea (action of genes *Rms3* and *Rms4*). *Plant Physiol.* **110**, 859–865 (1996).
- Booker, J. et al. MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Dev. Cell* **8**, 443–449 (2005).
- Cook, C. E. et al. Germination stimulants. 2. The structure of strigol — a potent seed germination stimulant for witchweed (*Striga lutea* Tour.). *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 6198–6199 (1972).
- Bouwmeester, H. J., Roux, C., Lopez-Raez, J. A. & Becard, G. Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends Plant Sci.* **12**, 224–230 (2007).
- Brachmann, A. & Parniske, M. The most widespread symbiosis on Earth. *PLoS Biol.* **4**, e239 (2006).

22. Smith, S. E. & Read, D. J. *Mycorrhizal Symbiosis* (Academic Press, 1997).
23. Akiyama, K., Matsuzaki, K. & Hayashi, H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**, 824–827 (2005).
24. Besserer, A. et al. Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol.* **4**, e226 (2006).
25. Yoneyama, K., Yoneyama, K., Takeuchi, Y. & Sekimoto, H. Phosphorus deficiency in red clover promotes exudation of orobanchol, the signal for mycorrhizal symbionts and germination stimulant for root parasites. *Planta* **225**, 1031–1038 (2007).
26. Yoneyama, K. et al. Nitrogen deficiency as well as phosphorus deficiency in sorghum promotes the production and exudation of 5-deoxystrigol, the host recognition signal for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasites. *Planta* **227**, 125–132 (2007).
27. Goldwasser, Y., Yoneyama, K., Xie, X. & Yoneyama, K. Production of strigolactones by *Arabidopsis thaliana* responsible for *Orobanche aegyptiaca* seed germination. *Plant Growth Regul.* **55**, 21–28 (2008).
28. Matusova, R. et al. The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanche* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiol.* **139**, 920–934 (2005).
29. Xie, X. et al. 2'-epi-orobanchol and solanacol, two unique strigolactones, germination stimulants for root parasitic weeds, produced by tobacco. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 8067–8072 (2007).
30. Xie, X. et al. Isolation and identification of alectrol as (+)-orobanchyl acetate, a germination stimulant for root parasitic plants. *Phytochemistry* **69**, 427–431 (2008).
31. Yoneyama, K. et al. Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from Fabaceae plants. *New Phytol.* **179**, 484–494 (2008).
32. Störnberg, P., Furner, I. J. & Leyser, H. M. O. MAX2 participates in an SCF complex which acts locally at the node to suppress shoot branching. *Plant J.* **50**, 80–94 (2007).
33. Li, C. J. & Bangerth, F. Autoinhibition of indoleacetic acid transport in the shoots of two-branched pea (*Pisum sativum*) plants and its relationship to correlative dominance. *Physiol. Plant.* **106**, 415–420 (1999).
34. Turnbull, C. G., Booker, J. P. & Leyser, H. M. Micrografting techniques for testing long-distance signalling in *Arabidopsis*. *Plant J.* **32**, 255–262 (2002).
35. Cowling, R. J., Kamiya, Y., Seto, H. & Harberd, N. P. Gibberellin dose-response regulation of GA4 gene transcript levels in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **117**, 1195–1203 (1998).
36. Booker, J., Chatfield, S. & Leyser, O. Auxin acts in xylem-associated or medullary cells to mediate apical dominance. *Plant Cell* **15**, 495–507 (2003).
37. Nemhauser, J. L., Mockler, T. C. & Chory, J. Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* **2**, e258 (2004).
38. Foo, E. et al. The branching gene *RAMOSUS1* mediates interactions among two novel signals and auxin in pea. *Plant Cell* **17**, 464–474 (2005).
39. Remy, W., Taylor, T. N., Hass, H. & Kerp, H. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 11841–11843 (1994).
40. Kenrick, P. & Crane, P. R. The origin and early evolution of plants on land. *Nature* **389**, 33–39 (1997).
41. Lopez-Raez, J. A. et al. Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytol.* **178**, 863–874 (2008).
42. Strader, L. C. & Bartel, B. A new path to auxin. *Nature Chem. Biol.* **4**, 337–339 (2008).
43. Miyawaki, K. et al. Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 16598–16603 (2006).
44. Berleth, T., Krogan, N. T. & Scarpella, E. Auxin signals-turning genes on and turning cells around. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 553–563 (2004).
45. Beveridge, C. A., Symons, G. M. & Turnbull, C. G. N. Auxin inhibition of decapitation-induced branching is dependent on graft-transmissible signals regulated by genes *Rms1* and *Rms2*. *Plant Physiol.* **123**, 689–697 (2000).
46. Dun, E. A., Ferguson, B. J. & Beveridge, C. A. Apical dominance and shoot branching. Divergent opinions or divergent mechanisms? *Plant Physiol.* **142**, 812–819 (2006).
47. Hewitt, E. J. *Sand and Water Culture: Methods Used in the Study of Plant Nutrition* 2nd edn (London and Reading: Commonwealth Agricultural Bureau, The Eastern Press, 1966).
48. Giovannetti, M. & Mosse, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular infection in roots. *New Phytol.* **84**, 489–500 (1980).
49. Vierheilig, H., Coughlan, A. P., Wyss, U. & Piche, Y. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 5004–5007 (1998).

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Acknowledgements V.G.-R. was supported by the French Ministry of Research and Higher Education. S.F. was supported by a grant from ANR. H. B. and R. M. were supported by a grant from The Netherlands Organisation for Scientific Research (NWO; VICI-grant). The authors are grateful to A. Marion-Poll for discussions, H. M. O. Leyser for supply of the *Arabidopsis max4* seed, K. Yoneyama for the gift of orobanchyl acetate, and D. M. Joel for providing *O. crenata* seeds. The UPLC/QTOF mass spectrometer was made available to us by the Institut des Technologies Avancées du Vivant (Toulouse, France). We thank K. Condon for plant husbandry, the ARC Centre of Excellence for Integrative Legume Research and the European Union FP6 Grain Legumes Integrated Project for financial support.

Author Information Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.R. (rameau@versailles.inra.fr) or G.B. (becard@scsv.ups-tlse.fr).

METHODS

Plant materials and growth conditions. Pea mutants are described in refs 50, 51. Before root exudate collection, plants were grown in autoclaved sand:sepiolite (2:1 v:v) potting mix and fertilized weekly with LANS, then watered with phosphate-free LANS for 2 days. Plants grown for the determination of mycorrhizal activity were grown in an autoclaved sand:sepiolite (2:1 v:v) potting mix at 24 °C with a 16 h photoperiod at 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. They were fertilized three times a week with a modified LANS containing 15 μM sodium phosphate, with 0 nM or 10 nM GR24. Water was supplied as needed on other days.

For shoot branching bioassays, two pea plants were grown per two-litre pot in potting mix containing peat with clay pellets in a heated glasshouse (mean 15 °C night/22 °C day) with the natural photoperiod extended to 16 h with sodium lamps (or supplemented during the day when necessary). Nodes were numbered acropetally from the first scale leaf (node 1). Lateral branches were removed from nodes 1 and 2 to encourage the outgrowth of axillary buds at nodes above. *Arabidopsis* plants were grown in a mixture of 60% University of California potting mix type C and 40% vermiculite (v/v). After sowing in punnets, seeds were vernalized by incubation at 4 °C for 2 days, and then transferred to a growth room at 21 ± 3 °C under a 16 h photoperiod with a light intensity of 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provided by white fluorescent tubes.

Strigolactone treatments. For direct application on pea buds, GR24 was supplied in a solution of polyethylene glycol (PEG) 1450 (4%), ethanol (25%) and acetone (0.5%). For vascular supply, GR24 was diluted in water to the concentrations 1 nM, 10 nM, 100 nM and 500 nM. For *Arabidopsis*, GR24 was supplied in Tween20 (0.1%) and acetone (0.5%). For all treatments, control plants were treated with the same solutions without GR24.

Preparation of root exudates. For the *Gigaspora rosea* hyphal branching bioassay, exudates produced by the equivalent of 120 mg root dry weight and resuspended in 20% acetonitrile were fractionated on a 1 ml C18 Mega Bond Elut column (Varian) using an acetonitrile/water gradient (20% to 100% v:v). Fractions were dried and resuspended in 1 ml acetonitrile:water (10% v:v). Fractions corresponding to 50% and 70% acetonitrile, containing all the detectable activity, were pooled for the bioassays.

Chromatography and mass spectrometry. Root exudate extracts were dissolved in acetonitrile:water (1:1 v:v) and cleared through a 0.2 μm nylon filter. Strigolactone detection was performed using a 4000 Q Trap mass spectrometer (Applied Biosystems), with a Turbo V ESI source in the positive mode, coupled

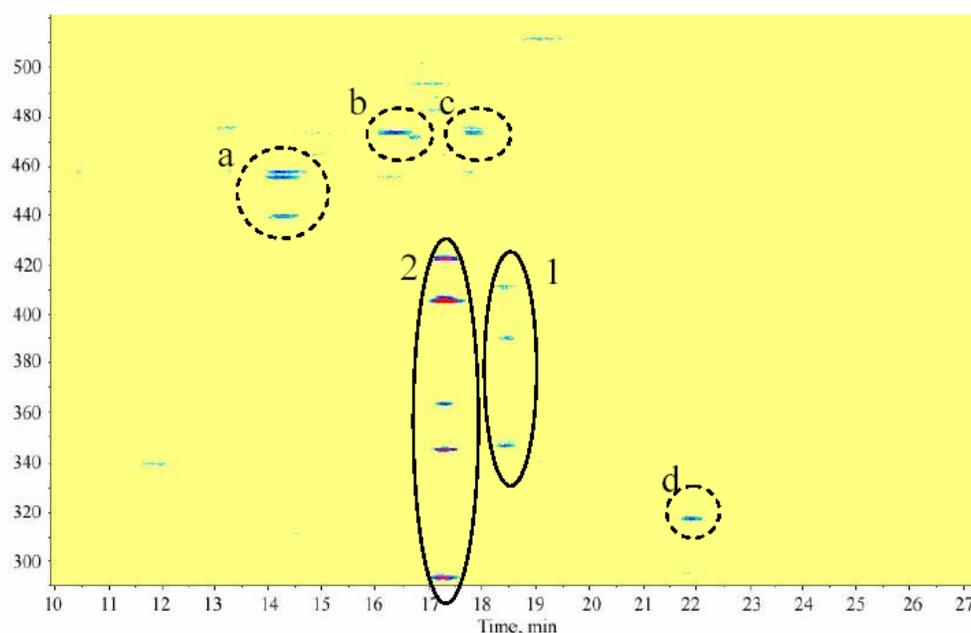
to an Agilent 1100 series HPLC system (Agilent Technologies). A C18 column (5 μm , 2.1 \times 250 mm, PepMap, Dionex) was used for chromatographic separation. Solutions of formic acid:water (1:10³ v:v; A) and formic acid:acetonitrile (1:10³ v:v; B) were pumped at 0.2 ml min⁻¹. The gradient was: 50% B for 5 min, 50%–70% B in 5 min, 70% B for 10 min, 70%–100% B in 10 min and 100% B for 20 min.

Synthetic GR24 and sorgolactone standards (Chiralix) were used to optimize mass spectrometry parameters to the following values: nebulizer gas flow 100 l h⁻¹, desolvation gas flow 500 l h⁻¹, capillary voltage 4,000 V, source temperature 250 °C; collision gas: nitrogen, collision energy 21 V. Ten-microlitre samples produced by the equivalent of 900 mg (precursor ion mode) or 150 mg (MRM mode) root dry weight were analysed. The MRM mode was used to detect with high sensitivity the two strigolactones seen in the precursor ion mode, and also to search for previously known strigolactones. Transitions monitored in the MRM mode were the following: orobanchol and isomers, *m/z* 347 > 250 and 369 > 272; 5-deoxy-strigol, *m/z* 331 > 234 and 353 > 256; sorgolactone, *m/z* 317 > 220 and 339 > 242; solanacol, *m/z* 343 > 246 and 365 > 268; didehydro-orobanchol (strigol), *m/z* 367 > 270; orobanchyl acetate, *m/z* 389 > 233 and 411 > 254; and second pea strigolactone, *m/z* 405 > 97, 405 > 345, 405 > 248 and 427 > 270. Data were analysed with Analyst 1.4.1 software (Applied Biosystems).

Accurate masses were acquired with a QTOF Premier device (Waters) with an ESI source in the positive mode coupled to a UPLC system (Acquity UPLC, Waters). Chromatographic separation was performed on a BEH C18 column (1.7 μm , 2.1 \times 100 mm, Acquity UPLC, Waters) applying a gradient equivalent to that used for HPLC for a duration of 9 min at a flow rate of 0.6 ml min⁻¹. Parameters were the following: nebulization gas 750 l h⁻¹ at 450 °C, cone gas 301 l h⁻¹, source temperature 150 °C, capillary voltage 3 kV, cone voltage 25 V, MCP detector voltage 1,650 V; collision gas: argon, scan range 80–1,000 *m/z*, data collection in centroid mode. Data were acquired using the lock spray for accurate mass using leucine-enkephalin as the lock mass, and analysed with Micromass MassLynx application manager.

50. Arumingtyas, E. L., Floyd, R. S., Gregory, M. J. & Murfet, I. C. Branching in *Pisum*: inheritance and allelism tests with 17 *ramosus* mutants. *Pisum Genet.* 24, 17–31 (1992).
51. Symons, G. M. & Murfet, I. C. Inheritance and allelism tests on six further branching mutants in pea. *Pisum Genet.* 29, 1–6 (1997).

SUPPLEMENTARY INFORMATION



Supplementary Figure 1. Extracted ion chromatogram contour plot of a Precursor Ion scan for m/z 97 obtained with wild-type pea root exudate extracts using LC/MS-MS.

The values on the y axis represent m/z -values of molecules that yield upon dissociation a daughter ion at m/z 97 ± 0.5 (unit resolution). The values on the x axis correspond to retention times. This method detected six major compounds in the whole chromatogram. Further analyses by QTOF-MS, with excellent mass accuracy, were necessary to determine whether the molecules yielded a daughter ion within 50 ppm of the accurate mass of the D ring: m/z 97.0290.

Compound 1 is orobanchyl acetate (see Results and Fig. 3). Compound 2 is a new strigolactone (see Results and Fig. 3).

For compounds a, b and c, the accurate mass of the ion at m/z 97 does not correspond to that of the D ring (mass difference > 300 ppm). In addition, accurate masses of the parent ions do not correspond to known strigolactones, and proposed elemental compositions do not fit with hypothetical new strigolactones. Characteristic daughter ions (e. g. loss of D ring) are not present. We conclude that these compounds are not strigolactones.

Compound d (Rt 22 min) shows a mass similar to that of sorgolactone (m/z 317). The retention time of this compound, however, did not correspond to that of standard sorgolactone (Rt 19 min). Neither did its accurate mass (317.2087 instead of 317.1389 for the standard). Finally, the ion at m/z 97.1007 does not correspond to the D ring (mass difference > 700 ppm). Together, these data rule out the possibility that compound d is sorgolactone or another strigolactone.

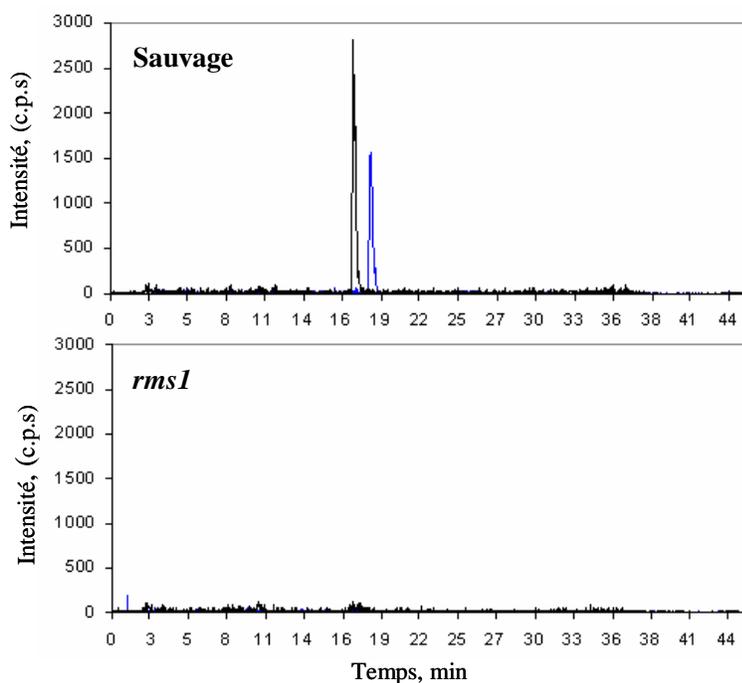


Fig. 24. Strigolactones dans les broyats de racines de plantes sauvages de pois et du mutant *rms1* (*ccd8*). Les broyats de racines de plantes sauvages de pois (Terese, en haut) ou du mutants *rms1* (*rms1-10*, en bas) ont été séparés par HPLC. La fraction contenant les strigolactones (fraction 40) a été analysée en LC/MS-MS en suivant respectivement les transitions m/z 405>345 (bleu) et m/z 411>254 (noir) caractéristiques de l'orobanchyl acétate et d'une deuxième strigolactone incomplètement identifiée.

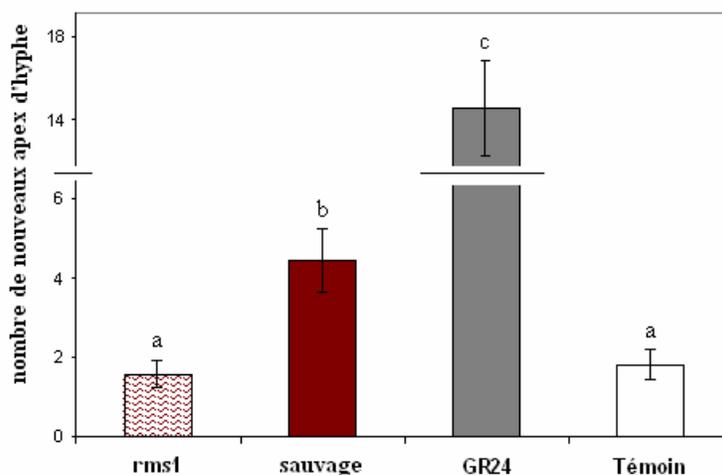


Fig. 25. Test d'activité des exsudats racinaires du mutant *rms1* sur *Gigaspora gigantea*. Le nombre de nouveaux apex d'hyphes formés par *G. gigantea* est compté après 24h de traitement avec les exsudats du mutant *rms1* (*rms1-10*), ceux de la plante sauvage (Terese), le GR24 à 10^{-7} M (GR24) et le témoin (solvant, 10% acétonitrile dans l'eau). L'histogramme représente la moyenne \pm SEM ($n > 12$). Les histogrammes avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différents (test ANOVA, $P \leq 0.05$).

2.3. Résultats additionnels et discussion

2.3.1. Analyses complémentaires obtenus avec le mutant *rms1* (*ccd8*)

Présence de strigolactones dans les broyats racinaires de *rms1*

Nous avons montré que le mutants *rms1* du pois ne produisait plus de strigolactones (détectables) dans ses exsudats racinaires (Gomez-Roldan et al., 2008). Afin de vérifier que la synthèse des strigolactones, et non pas seulement leur exsudation, était déficientes dans les mutants *rms1*, nous avons analysé la présence de strigolactones dans les broyats semi-purifiés des racines de pois sauvage et dans ceux des mutants ramosus *rms1*. Les deux strigolactones observées dans les exsudats racinaires des plantes sauvages (l'orobanchyl acétate et la deuxième strigolactone incomplètement identifiée) ont été détectées dans les broyats racinaires des plantes sauvages mais pas dans ceux du mutant *rms1* (Fig. 24). Les transitions correspondantes aux autres strigolactones connues dans la littérature ont été suivies mais aucun signal n'a été détecté ni dans les broyats des racines des plantes sauvages ni dans ceux des plantes mutantes. Ces résultats confirment que l'absence de strigolactones dans les exsudats racinaires du mutant *rms1* n'était pas due à un problème dans le mécanisme d'exsudation racinaire des strigolactones mais bien à un défaut de leur synthèse lié à la mutation du gène codant pour l'enzyme *CCD8* impliquée dans le clivage des caroténoïdes.

Activité des exsudats racinaires des mutants *rms1* sur la croissance pré-symbiotique d'une autre espèce de champignon MA (*Gigaspora gigantea*)

Nous avons montré que les exsudats racinaires des mutants *rms1* présentaient une activité plus faible que les exsudats des plantes sauvages sur les spores du champignon MA, *Gigaspora rosea* (Gomez-Roldan et al., 2008). Or les champignons MA peuvent avoir des réactions espèce-dépendantes en réponse à certaines molécules, par exemple les flavonoïdes (Scervino et al., 2005). Afin de déterminer si le phénotype observé chez *G. rosea* n'était pas liée à une réponse spécifique, nous avons testé les exsudats racinaires du mutant *rms1* sur un autre champignon MA, *G. gigantea* (Fig. 25). Ceux-ci se sont montrés également moins actifs sur la réponse de

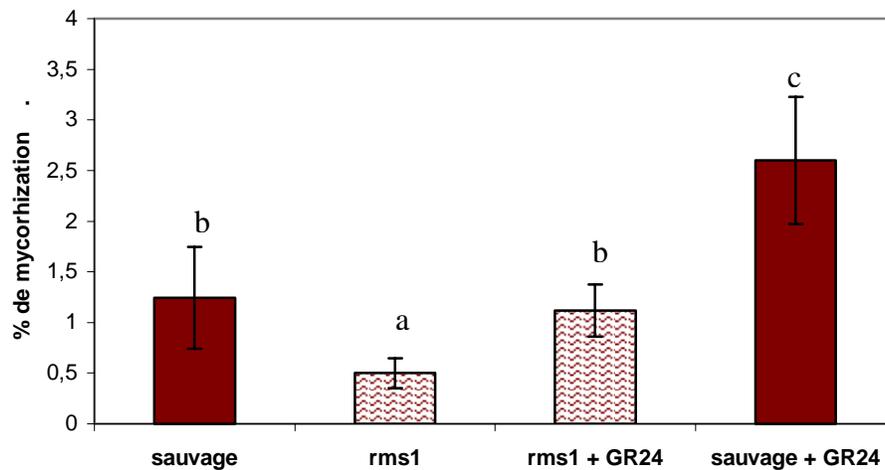


Fig. 26. Phénotype mycorhizien de *rms1* en présence de *Gigaspora rosea*. Phénotype mycorhizien (nombre de points d'infection par cm de racine) du mutant *rms1* (*rms1-3*) comparé à celui de la plante sauvage (Raman) après 6 semaines d'inoculation, en utilisant comme inoculum *G. rosea*, en absence (-GR24) ou en présence (+GR24) de GR24 à 10^{-8} M. L'histogramme représente la moyenne \pm SEM ($n = 3$). Les histogrammes avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différents (test ANOVA, $P \leq 0.5$).

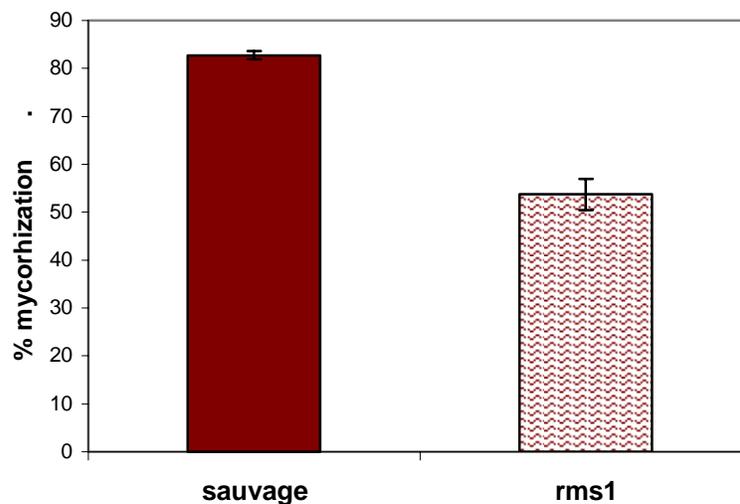


Fig. 27. Taux de mycorrhization de *rms1* à 10 semaines d'infection. Pourcentage de mycorrhization du mutant *rms1* (*rms1-10*) comparé à celui de la plante sauvage (Terese) après 10 semaines d'inoculation avec *Glomus intraradices*. Les histogrammes représentent des moyennes \pm SEM ($n = 4$) significativement différentes (test du *t*-student $P \leq 0.05$).

« branching » de *G. gigantea*, suggérant que le phénotype observé chez *G. rosea* n'est pas exclusif à l'espèce de champignon utilisé.

Phénotype mycorhizien des mutants *rms1* (inoculation avec *G. rosea*)

Nous avons montré que le pourcentage de mycorhization des mutants *rms1* inoculés avec des spores de *Glomus intraradices* était très inférieur à celui observé chez le pois sauvage (Gomez-Roldan et al., 2008). Afin de vérifier que le faible taux de mycorhization observé n'était pas lié à l'espèce de champignon MA utilisée, nous avons choisi d'étudier la capacité des mutants *rms1* à rentrer en symbiose avec un autre champignon MA, *G. rosea*, un organisme phylogénétiquement distant de *G. intraradices*. Le pourcentage de mycorhization des mutants *rms1* en présence de spores de *G. rosea* a, là encore, été réduit (d'environ 60 %) par rapport à celui observé chez les plantes sauvages. L'ajout exogène de GR24 a permis aux plantes mutantes d'atteindre le même niveau de mycorhization que les plantes sauvages (non traitées par le GR24). La mycorhization de ces dernières a aussi été stimulée par l'apport de GR24 (Fig. 26). Lors des expériences antérieures avec *G. intraradices*, la mycorhization des plantes sauvages n'avait pas été stimulée par le GR24 mais les taux de mycorhization obtenus étaient globalement plus élevés (Gomez-Roldan et al., 2008). Il est possible qu'en condition de faible colonisation l'ajout du GR24 ait un effet stimulateur plus net sur la mycorhization, y compris chez les plantes normalement productrices de strigolactones.

Cinétique de colonisation mycorhizienne des mutants *rms1*

Les mutants *rms1* étaient environ 65% moins mycorhizés que les plantes sauvages après 6 semaines d'inoculation avec *G. intraradices* (Gomez-Roldan et al., 2008). Afin de caractériser d'avantage ce phénotype mycorhizien, nous avons quantifié le pourcentage de mycorhization des plantes sauvages et des mutants après 10 semaines d'inoculation. Le taux de mycorhization des mutants *rms1* a continué à être significativement inférieur à celui des plantes sauvages (Fig. 27). Ce résultat nous permet de confirmer que le temps de co-culture de 6 semaines que nous avons choisi nous permettait d'établir correctement le phénotype mycorhizien des mutants *rms1*.

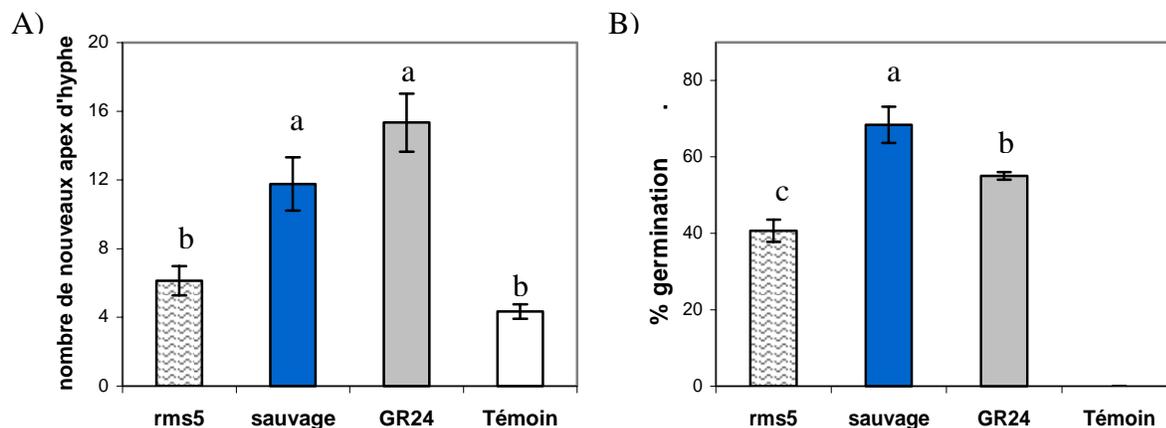


Fig. 28. Activité des exsudats du mutant *rms5* (*ccd7*) sur les champignons MA et les plantes parasites. **A)** Nombre d'apex d'hyphes formés (pendant 48h) par des spores pré-germées de *Gigaspora rosea* en réponse aux exsudats racinaires du mutant *rms5* (*rms5-2*) et des plantes sauvages (Paloma). Les témoins positifs sont traités au GR24 à 10^{-7} M et les témoins négatifs avec le solvant dans lequel les échantillons ont été dissous (10% acétonitrile) ($n > 10$). **B)** Pourcentage de germination des graines d'*Orobanchaceae* en réponse aux exsudats des mutants *rms5* (*rms5-2*) et des plantes sauvages. Les témoins positifs sont traités au GR24 (3×10^{-7} M) et les témoins négatifs avec de l'eau ($n = 3$, 80-100 graines par répétition). Les histogrammes (moyenne \pm SEM) avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différents (test ANOVA, $P \leq 0.05$).

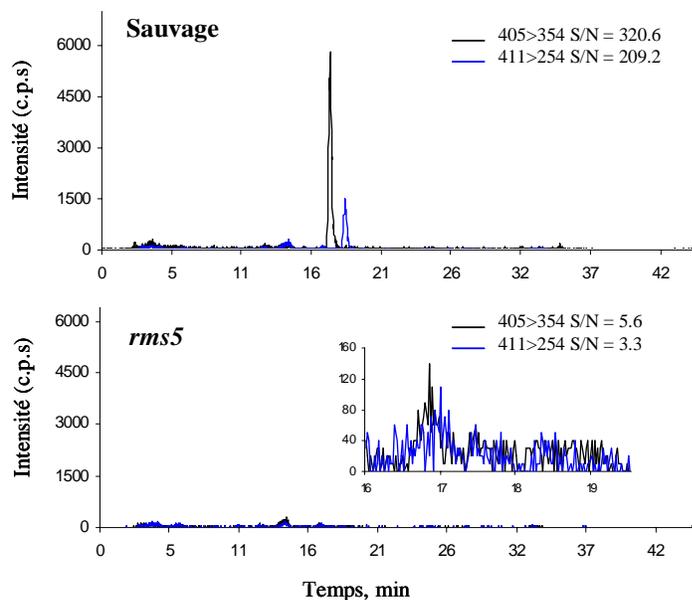


Fig. 29. Chromatogrammes MRM des strigolactones dans les exsudats racinaires des plantes *rms5* et sauvage. La présence d'orobanchyl acétate (transition spécifique m/z 411 > 254, bleu) et d'une deuxième strigolactone (transition m/z 405 > 345, noir) a été détectée dans les exsudats racinaires de plantes sauvages (Paloma). Dans les exsudats de *rms5* (*rms5-2*) aucun pic n'a été détecté aux temps de rétention attendus (18.2 et 17.2 min, respectivement). L'intensité de chaque pic est donnée avec le rapport signal/ bruit de fond (S/N = signal to noise).

2.3.2. Analyse du phénotype mycorhizien du mutant *rms5* (*ccd7*)

Activité des exsudats racinaires des mutants *rms5* sur les champignons MA et les plantes parasites

Afin de déterminer l'implication de l'enzyme CCD7 dans la synthèse des strigolactones nous avons testé les exsudats racinaires du mutant *rms5* pour leur capacité à stimuler la ramification des hyphes des champignons MA et la germination des graines d'*Orobanche* (expériences réalisées en collaboration avec l'équipe de Harro Bouwmeester). Les exsudats racinaires des mutants *rms5* (*rms5-2*) ont été significativement moins actifs que ceux des exsudats des plantes sauvages correspondantes (Fig. 28). Les exsudats racinaires d'un autre mutant allélique (*rms5-1*) ont donné des résultats similaires (non présentés). Ces résultats suggèrent que les mutants *rms5* produisent des quantités moins importantes de molécules stimulatrices des champignons MA et de la germination des graines d'*Orobanche*. L'enzyme CCD7 a été proposée comme agissant en amont de l'enzyme CCD8, en clivant le β -carotène, afin de synthétiser le précurseur hypothétique de l'hormone SMS (Morris et al., 2001; Schwartz et al., 2004). Nos résultats suggèrent que l'enzyme CCD7, comme l'enzyme CCD8, est impliquée dans la synthèse des strigolactones.

Analyse de la présence de strigolactones chez les mutants *rms5*

L'analyse de la présence des deux strigolactones identifiées dans les exsudats racinaires des plantes du pois sauvage a été réalisée sur les exsudats du mutant *rms5* (*rms5-2*). Aucun signal de strigolactones n'a pu être détecté (Fig. 29). Cela a été confirmé chez un autre mutant allélique de *rms5* (*rms5-1*, données non présentées). Comme décrit précédemment, l'enzyme CCD7 serait impliquée, comme CCD8, dans la synthèse des strigolactones.

Capacité des mutants *rms5* à établir la symbiose MA

Les résultats précédents nous ont permis d'établir que les mutants *rms1* (*ccd8*) et *rms5* (*ccd7*) sont déficients dans la synthèse des strigolactones. L'étude du phénotype mycorhizien du mutant *rms1* nous a permis d'observer qu'il présentait une diminution importante du taux de

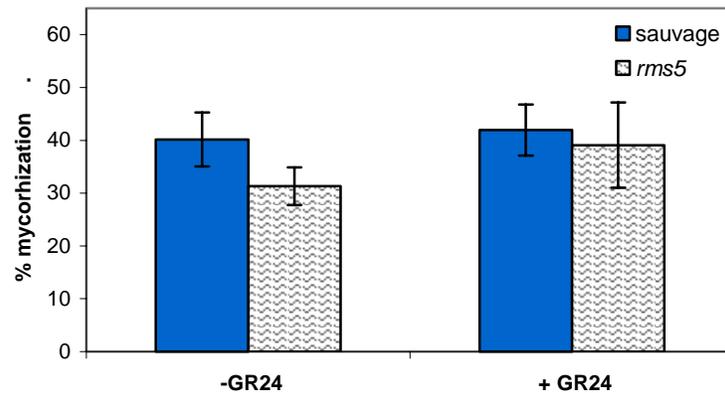


Fig. 30. Phénotype mycorhizien du mutant *rms5* en présence d'un fort inoculum de *Glomus intraradices*. Pourcentage de colonisation des racines des plantes sauvages (Porta) et des mutants *rms5* (*rms5-1*) traités ou non avec une solution de GR24 à 10^{-8} M (traitement 3 fois par semaine avec 25 ml de solution par plante). L'inoculum utilisé contenait environ 300 spores de *G. intraradices*. Les histogrammes représentent des moyennes \pm SEM (n = 5). Ces moyennes ne sont pas significativement différents (test ANOVA, $P \leq 0.05$).

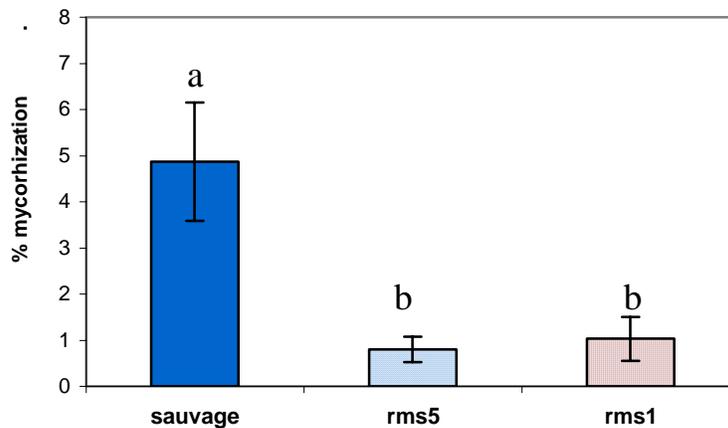


Fig. 31. Phénotype mycorhizien des mutant *rms5* et *rms1* en présence d'un faible inoculum de *Glomus intraradices* Pourcentage de mycorrhization des plantes sauvages (Paloma), des mutants *rms5* (*rms5-2*) et *rms1* (*rms1-4*) après 6 semaines de co-culture avec un inoculum d'environ 60 spores de *G. intraradices*. Les histogrammes représentent des moyennes \pm SEM (n = 8). Les histogrammes avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différents (test ANOVA, $P \leq 0.05$).

mycorhization (Gomez-Roldan et al., 2008). Afin d'étudier la capacité des mutants *rms5* à être mycorhizés nous les avons inoculés avec un inoculum composé d'environ 300 spores de *G. intraradices* par plante (mêmes conditions que dans le cas du mutant *rms1*). Le pourcentage de mycorhization du mutant *rms5* (*rms5-1*) a présenté une forte variabilité selon les répétitions réalisées. Dans certaines expériences le taux de mycorhization du mutant, même s'il était inférieur à celui de la plante sauvage, n'était pas significativement différent (Fig. 30). Des résultats très variables ont aussi été observés avec un mutant allélique (*rms5-2*) en comparaison avec la plante sauvage correspondante. Ces résultats n'étaient pas attendus, puisque comme le mutant *rms1*, le mutant *rms5* est lui aussi déficient en strigolactones.

Afin de comprendre ces différences de comportement entre les deux mutants nous avons modifié un paramètre important de nos conditions expérimentales. Nous avons diminué le nombre de spores de *G. intraradices* (60 spores par plante au lieu de 300) afin de déterminer si à une plus faible concentration d'inoculum le phénotype mycorhizien des mutants *rms5* pouvait être plus marqué. Nous avons utilisé pour cette expérience le fond génétique Paloma, dans lequel les deux mutants *rms1* (*rms1-4*) et *rms5* (*rms5-2*) étaient disponibles. Nous avons observé que le pourcentage de mycorhization des plantes sauvages était environ 7 fois plus faible que dans les expériences réalisées avec 300 spores par plante. Dans ces conditions le mutant *rms5* s'est comporté comme le mutant *rms1* en étant beaucoup moins mycorhizé (autour de 5 fois moins) que la plante sauvage (Fig. 31). Ces résultats suggèrent à nouveau (voir plus haut) que dans des conditions de faible inoculum (sans doute plus couramment rencontrées dans la nature), les mécanismes utilisés par la plante pour attirer son partenaire fongique ont un rôle d'autant plus critique. Inversement quand l'inoculum est plus dense, davantage de spores se trouvent à proximité immédiate des racines : leurs hyphes seraient alors moins dépendants des signaux moléculaires excrétés à distance.

Limite de détection des strigolactones en spectrométrie de masse

Nous avons observé avec différents standards (GR24, sorgolactone, orobanchyl acétate) que notre limite de détection des strigolactones en spectrométrie de masse était de l'ordre de 30 picogrammes. Il n'est donc pas exclu que les mutants *rms5* et *rms1* produisent des strigolactones en quantité inférieure à cette limite de détection. Dans ce cas, le phénotype mycorhizien du mutant *rms5* pourrait être expliqué par une synthèse résiduelle de strigolactones supérieure à celle

Tableau 2. Analyse métabolomique

Total des masses des ions 2 fois différentiellement accumulés dans les exsudats racinaires des mutants *rms1* (*rms1-4*) et *rms5* (*rms5-2*) par rapport aux plantes sauvages (Paloma). L'acquisition des données a été réalisée en UPLC-QTOF et comparés par le logiciel MarkerLynx.

	sauvage / <i>rms5</i>	sauvage / <i>rms1</i>
Total des ions différents détectés	540	570
mut / sauvage > 2 (accumulés dans le mutant)	55	32
sauvage / mut > 2 (accumulés dans le mutant)	31	33
Total des ions 2 fois + ou - différents	86	65

	<i>rms1</i> / <i>rms5</i>
Total des ions différents détectés	454
<i>rms5</i> / <i>rms1</i> > 2 (accumulés dans le mutant <i>rms5</i>)	50
<i>rms1</i> / <i>rms5</i> > 2 (accumulés dans le mutant <i>rms1</i>)	22
Total des ions 2 fois + ou - différents	72

du mutant *rms1*. L'analyse du phénotype mycorhizien de plantes doubles mutantes *rms5rms1* (*ccd7ccd8*) permettrait de savoir si le phénotype mycorhizien de ces mutants peut être additif par rapport à ceux observés dans les simples mutants. Il a par exemple été montré que le phénotype *ramosus* des doubles mutants *rms5rms1* était encore plus ramifié que chez les simples mutants (Morris et al., 2001).

Analyse métabolomique

Le mutant *rms1* présente une forte diminution du taux de mycorhization même avec un inoculum dense (300 spores). La possibilité que ce phénotype soit dû à un effet pléiotropique de la mutation a été exclue puisque l'application exogène du GR24 a permis de rétablir sa capacité à être mycorhizé. Pour expliquer le phénotype mycorhizien atténué du mutant *rms5*, dans les mêmes conditions d'inoculum dense, on peut faire l'hypothèse de la présence chez ce mutant de molécules inhabituellement accumulées et capables de compenser l'absence de strigolactones.

Nous avons donc essayé d'estimer, par une approche métabolomique, les différences qui pourraient exister entre les exsudats racinaires des mutants et de la plante sauvage. Dans le tableau 2 sont présentées les données obtenues en analysant les exsudats racinaires en UPLC-QTOF en mode positif et après traitement avec le logiciel MarkerLynx. Seuls les ions deux fois plus ou deux fois moins abondants chez les mutants, ont été sélectionnés. Ces analyses préliminaires révèlent que plus de 55 ions sont en quantité plus importante dans les exsudats de *rms5* par rapport au sauvage, le nombre d'ions accumulés chez *rms1* étant seulement de 32. Le nombre d'ions moins abondants que chez le sauvage est à peu près similaire dans les mutant *rms1* et *rms5* (respectivement 33 et 31). En comparant le mutant *rms5* avec le mutant *rms1*, nous avons pu constater que 50 ions sont plus abondants chez *rms5*, et 22 autres sont moins abondants. L'ensemble de ces résultats laisse supposer que chez *rms5* le profil métabolique est plus profondément modifié que chez le mutant *rms1*.

Les expériences de greffes et l'analyse biochimique réalisées par Morris et al, (2001) et Schwartz et al, (2004) ont conduit à l'hypothèse selon laquelle l'enzyme CCD7 agirait en amont de l'enzyme CCD8. Il a aussi été proposé que CCD8 soit capable de cliver directement certains caroténoïdes, sans amener pour autant à la synthèse du signal SMS. Il est donc possible d'imaginer que chez *rms5*, l'enzyme CCD8, faute de pouvoir cliver le produit de CCD7, clive certains caroténoïdes pour produire des molécules autres que les strigolactones, mais tout de

même capables d'attirer les champignons MA. La présence d'une ou plusieurs de ces molécules dans les exsudats de *rms5* (parmi les 50 ions accumulés) capables d'induire la symbiose MA pourrait expliquer pourquoi le mutant *rms5* peut être normalement mycorhizé en présence d'un inoculum abondant.

Il a été souvent observé que certains flavonoïdes étaient capables de stimuler la croissance des champignons MA (Steinkellner et al., 2007). Ces effets sont variables d'un champignon à l'autre et en absence totale de flavonoïdes, les plantes sont normalement mycorhizées en condition de laboratoire (Bécard et al., 1995). Dans notre étude métabolomique plusieurs ions présentant des masses très proches de celles de flavonoïdes connues ont été détectés. Un des ions accumulés chez *rms5* présente la masse exacte de la pisatine, flavonoïde caractéristique du pois. L'identification exacte de la pisatine n'a pas été poursuivie dans notre étude (faute de molécule standard) mais l'accumulation anormale de cette molécule dans les exsudats de *rms5* pourrait expliquer son phénotype mycorhizien. De manière intéressante, il a aussi été observé que les flavonoïdes pouvaient être impliqués dans la régulation de la croissance des bourgeons (Booker et al., 2005). Chez le pois, la mutation dans le gène homologue à *MAX1* n'entraîne pas un phénotype *ramosus*, probablement en raison d'une redondance fonctionnelle dans cette espèce (Gomez-Roldan et al., 2008) ou parce qu'il existent des divergences entre le mécanisme de contrôle de la croissance des bourgeons entre *Arabidopsis* et le pois (Dun et al., 2006). Chez le mutant *max1* d'*Arabidopsis*, l'expression de gènes de la synthèse de flavonoïdes est nettement réduite au niveau des bourgeons latéraux. De plus, l'application de flavonoïdes exogènes permettrait de rétablir l'inhibition de la ramification chez le mutant *max1* (Lazar et Goodman, 2006). Même si l'effet des flavonoïdes sur le transport d'auxine n'est encore qu'hypothétique, le travail de Lazar et Goodman, (2006) met en évidence un lien entre la synthèse du SMS et celles des flavonoïdes. Il est donc envisageable de proposer que la mutation chez *rms5* (mais pas chez *rms1*) puisse modifier la quantité de certains flavonoïdes dans la plante et influencer la colonisation des racines par *G. intraradices* (sans inhiber la croissance des bourgeons). Des études supplémentaires approfondies seraient nécessaires pour tester cette hypothèse.

2.4. Conclusions

Pour mieux comprendre le rôle joué par les strigolactones dans la symbiose MA, nous avons réalisé une étude de plantes mutantes déficientes dans le clivage des caroténoïdes. Cette approche a été inspirée par le travail de Matusova et al. (2005) qui proposait que les strigolactones dérivent de caroténoïdes. Nous avons tout d'abord montré par des biotests sur deux champignons MA et sur les graines de la plante parasite *Orobanche crenata* que les exsudats racinaires des mutants *rms5* et *rms1* de pois étaient moins actifs que ceux des plantes sauvages correspondantes.

Une analyse biochimique plus poussée en spectrométrie de masse nous a permis de démontrer que ces deux mutants avaient perdu la capacité de synthétiser les strigolactones (du moins en quantité détectable).

L'étude du phénotype mycorhizien de ces mutants nous a permis de confirmer l'importance des strigolactones dans la mise en place de la symbiose MA et du parasitisme avec *Orobanche crenata*. D'autres molécules présentes dans les exsudats racinaires des plantes peuvent sans doute stimuler la croissance des champignons MA, mais les strigolactones sont les premières dont l'importance est démontrée par des données génétiques. Nous avons mis en évidence que l'absence de strigolactones dans le mutant *rms1* du pois réduisait considérablement la colonisation mycorhizienne (avec deux champignons MA phylogénétiquement distants) et que l'ajout exogène d'un analogue de synthèse des strigolactones permettait de restaurer un taux de mycorhization normal.

Les gènes mutés dans les mutants *rms5* et *rms1* codent pour des enzymes impliquées dans la synthèse d'une nouvelle hormone végétale, appelé SMS, dont l'identité était jusqu'alors inconnue. La mise en évidence d'une déficience de synthèse de strigolactones chez ces mutants nous a permis de démontrer pour la première fois l'implication de deux enzymes dans la voie de biosynthèse des strigolactones. Nous avons mis en évidence par ce moyen que les strigolactones partageaient avec l'hormone SMS certaines étapes de biosynthèse. Le mutant *rms4*, dont on soupçonnait par des études génétiques antérieures qu'il n'était pas déficient dans la synthèse des strigolactones mais dans leur perception (ce que nous avons confirmé), a joué un rôle déterminant dans notre étude. Bien que présentant un phénotype hyper ramifiés comme les mutants *rms1* et *rms5*, le fait qu'il produise normalement les strigolactones permettait de démontrer que l'absence

de strigolactones dans les mutants *rms1* et *rms5* était dû exclusivement à la mutation respectivement dans les enzymes CCD8 et CCD7, et non au phénotype *ramosus*.

Finalement nous avons montré que le traitement des mutants avec un analogue synthétique de strigolactones (le GR24) permettait de restaurer l'inhibition de la croissance des bourgeons latéraux chez les mutants *rms1* et *rms5* mais pas chez le mutant *rms4*. Les concentrations utilisées dans ces traitements (jusqu'à 10nM) étaient en accord avec celles attendues pour une hormone végétale. Les mêmes réponses ont été observées chez les mutants *ccd* d'*A. thaliana*, suggérant ainsi que le mécanisme d'action des strigolactones dans la croissance des bourgeons est conservé dans le règne végétal.

L'ensemble de ces résultats nous a permis de proposer que l'hormone SMS pourrait être une strigolactone ou une molécule ayant une structure chimique très proche.

Discussion et Perspectives

I. Importance des strigolactones dans la symbiose MA

L'objectif initial de notre travail était d'étudier le rôle des strigolactones dans la symbiose MA à l'aide de plantes bloquées dans la synthèse des strigolactones. Avant d'obtenir les mutants de pois, nous avons utilisé des plantes de maïs bloquées dans les premières étapes de la synthèse des caroténoïdes. Nous avons mis en évidence que les plantes de maïs traitées avec l'herbicide fluridone et les mutants $\gamma 9$ présentaient une diminution de leur taux de mycorhization (Gomez-Roldan et al., 2007). Même si le traitement avec la fluridone et la mutation $\gamma 9$ ne touchaient pas uniquement la biosynthèse des strigolactones, des expériences de complémentation avec une strigolactone de synthèse, le GR24, ont permis de restaurer complètement (ou partiellement) l'aptitude à la mycorhization. Nos résultats et ceux de Matusova et al. (2005), montrant que des plantes de maïs $\gamma 9$ ou traitées à la fluridone induisaient moins la germination des graines des plantes parasites, nous permettaient de supposer que la synthèse des strigolactones avait été inhibée dans ces plantes et que cette inhibition avait des conséquences dans la colonisation des racines par le champignon MA.

Cependant, de nombreux métabolites avaient probablement été modifiés dans le mutant $\gamma 9$ ou dans les plantes traitées. Par exemple, la synthèse de mycorradicine ou de l'hormone végétale ABA, toutes les deux impliquées dans la symbiose MA, et dérivant du clivage des caroténoïdes, devait aussi être bloquée. C'est principalement pour cette raison que la recherche de plantes mutantes inhibées plus spécifiquement dans la synthèse des strigolactones était nécessaire.

Nous avons donc utilisé des plantes mutantes de pois fournies par une équipe de Versailles dont on pouvait penser qu'elles seraient touchées plus spécifiquement dans la biosynthèse des strigolactones. Une analyse de spectrométrie de masse, par MRM, nous a permis

d'établir que les deux mutants *rms5* et *rms1* du pois, contrairement au pois sauvage, ne produisaient plus de strigolactones détectables. Les exsudats de ces mutants avaient aussi perdu leur capacité à stimuler la ramification des hyphes (« branching ») du champignon MA *Gigaspora rosea*. Cette ramification intense des hyphes germinatifs en réponse aux strigolactones a été décrite par Besserer et al. (2008) comme résultant d'une activation extrêmement rapide du métabolisme mitochondrial. En absence de signal végétal en provenance d'une plante hôte, le champignon limiterait donc l'utilisation des réserves contenues dans ses spores, ce qui est pour lui un gage de survie. D'autant plus si, comme proposée par Kosuta et al. (2001), la reconnaissance de la plante hôte par le champignon est aussi le principal déclencheur de la production des facteurs *Myc*. Les facteurs *Myc*, dont l'identité chimique n'est pas encore connue, seraient des molécules signal permettant à la plante hôte de mettre en place le processus de mycorhization, sans provoquer de réaction de défense au niveau des racines. Lorsque l'identité des facteurs *Myc* sera connue, il sera intéressant d'étudier la capacité des champignons MA à produire des facteurs *Myc* quand ils sont en présence de racines des mutants *rms5* et *rms1* (déficients en strigolactones), afin de mieux comprendre l'autre élément clé du dialogue permettant d'enclencher les premières étapes de la symbiose MA.

Le mutant *rms1*, déficient en strigolactones et incapable d'induire normalement le phénomène de « branching », perd aussi la capacité à être mycorhizé normalement, ceci pouvant être compensé par la simple application exogène d'une strigolactone de synthèse (GR24). La stimulation des premières étapes de la symbiose MA par les strigolactones est probablement un des mécanismes utilisés par la plante pour stimuler la colonisation de ses racines.

Dans une étude précédente, nous avons montré que les strigolactones stimulaient la croissance pré-symbiotique de trois champignons MA, phylogénétiquement distants (Besserer et al., 2006). Dans cette thèse nous avons montré l'importance des strigolactones pour la colonisation des racines des plantes en utilisant également deux champignons MA différents. La symbiose MA, étant donné son caractère ancestral est largement distribué dans le règne végétale. Cette distribution est partagée avec celle des strigolactones, qui ont été proposées comme pouvant être produites par la plupart des plantes terrestres (monocotylédones et dicotylédones) (Bouwmeester et al., 2007). En accord avec cela, nous pouvons alors proposer que les strigolactones sont les molécules signal utilisées par tous les champignons MA pour reconnaître leur plante hôte.

Dans notre étude nous avons utilisé des mutants de *Pisum sativum*, une plante légumineuse. Or, il existe des mutants dans les gènes homologues à *CCD7* ou *CCD8* du pois chez des plantes non légumineuses et mycotrophes, le pétunia (*dad*) et le riz (*dwarf*). Il est indispensable d'étudier leur phénotype mycorhizien afin de pouvoir généraliser sur l'importance des strigolactones dans la mycorhization des plantes vasculaires.

I.1. Le « branching factor » est un ensemble de molécules

Dans notre étude, nous avons observé qu'en plus des fractions contenant l'orobanchyl acétate et l'autre strigolactone incomplètement identifiée, d'autres fractions dans les exsudats racinaires de plantes sauvages étaient actives sur *G. rosea*. Très dernièrement il a été démontré que le pois exsudait en plus des deux strigolactones que nous avons détectées, du 5-desoxy-strigol et l'orobanchol (Yoneyama et al., 2008). Ces deux dernières molécules n'ont pas été détectées dans notre analyse peut-être à cause de la limite de détection de systèmes analytiques que nous avons utilisés. Par ailleurs, cette limite de détection peut aussi expliquer pourquoi nous avons observé une ramification résiduelle des hyphes de *G. rosea* lors des tests d'activité avec les exsudats racinaires des mutants *rms* et pourquoi nous n'avons jamais observé une absence totale de mycorhization (pourcentage de mycorhization 0%) dans ces mutants. Egalement comme nous l'avons évoqué dans le chapitre 2, il est probable que ce soit aussi cette limite de détection qui nous a empêché d'observer une différence entre les mutants *rms1* et *rms5*. Dans l'article de Umehara et al. (2008) les exsudats du mutant *dwarf1* de riz (orthologue de *rms5*) induisaient d'une manière plus importante la germination des graines des plantes parasites que ceux du mutant *dwarf10* (orthologue de *rms1*). La présence résiduelle d'une ou de plusieurs strigolactones présentes dans les exsudats racinaires mais indétectables en spectrométrie de masse permet d'expliquer ces résultats.

Il a été suggéré que la composition en strigolactones des exsudats racinaires des plantes pourrait être un des facteurs déterminant la préférence manifestée par certains champignons MA pour certaines plantes hôtes (Yoneyama et al., 2008). Dans toutes les plantes étudiées jusqu'à aujourd'hui, un mélange d'au moins deux strigolactones a été identifié. Il semblerait que certains types de végétaux produisent certains types de strigolactones. Par exemple, l'orobanchol et l'orobanchyl acétate ont été systématiquement retrouvées dans les exsudats des plantes légumineuses testées, mais aucune trace de ces deux molécules n'a été détectée chez les plantes

monocotylédones. Chez ces dernières, le sorgho, le maïs et le millet produisent par contre toutes du 5-desoxy-strigol. Dans le cas des plantes parasites, certains éléments sur la spécificité d'hôte sont grossièrement connus. Par exemple les espèces de *Striga* ssp. parasitent principalement les monocotylédones et les *Orobancha* spp. les dicotylédones (Bouwmeester et al., 2003). Pour la symbiose MA, rien n'est connu mais il a été montré que certaines espèces de champignons MA ont des préférences pour certains génotypes de *Medicago truncatula* (Pivato et al., 2007). Il serait alors intéressant de déterminer s'il existe une corrélation entre le type de strigolactones produites dans chaque génotype de *M. truncatula* et les « préférences » que peuvent avoir les partenaires fongiques pour l'un ou l'autre de ces génotypes.

D'autres molécules en plus des strigolactones sont aussi capables de stimuler les champignons MA dans les premières étapes de la symbiose. Il a été montré par exemple que certains flavonoïdes exerçaient une action stimulatrice sur certaines espèces de champignons MA. Cependant, cette action stimulatrice requiert des concentrations beaucoup plus importantes que celles nécessaires pour les strigolactones. De plus, aucun flavonoïde capable de stimuler plusieurs espèces de champignons MA n'a encore été trouvés à ce jour (Bécard et al., 1992; Scervino et al., 2007; Scervino et al., 2005), et des plantes totalement incapables de synthétiser les flavonoïdes ne sont pas modifiées dans leur phénotype mycorhizien (Bécard et al., 1995). Nous ne pouvons néanmoins pas exclure la possibilité que le « branching factor » regroupe un ensemble de molécules actives. En effet il serait logique que différents mécanismes de signalisation aient été développés par les plantes et les champignons MA au cours de l'évolution afin d'optimiser leur chance de former une symbiose.

I.2. D'autres implications des strigolactones dans la symbiose MA

Nous avons montré que les strigolactones étaient importantes pour induire la croissance pré-symbiotique des champignons MA et obtenir un taux de mycorhization satisfaisant lorsque l'inoculum est sous forme de spores (Gomez-Roldan et al., 2008). Cependant, d'autres moyens d'infection de la plante hôte par les champignons MA existent dans la nature. C'est le cas de l'infection des racines par les hyphes, non plus germinatifs, mais extraracinaires, provenant d'une plante voisine, appelée infection secondaire (Harrison, 2005). Le mutant de tomate *pmi* isolé par David-Schwartz et al. (2001) présente une réticence à la mycorhization quand l'inoculum mycorhizien utilisé pour coloniser les plantes est composé principalement de spores, par contre il

est normalement mycorhizé lorsque l'inoculum est composé de racines déjà mycorhizées. La question de savoir si les strigolactones, importantes pour l'infection primaire par les spores, le sont aussi pour l'infection secondaire par les hyphes extraracinaires est une question ouverte. Les mutants *rms* de pois pourraient là encore permettre d'aller plus loin dans la description du rôle joué par les strigolactones, y compris pour stimuler la croissance du mycélium extraracinaire et sa capacité à mycorhizer une autre plante.

On pensait jusqu'à très récemment que les strigolactones étaient synthétisées constitutivement par les racines des plantes (Akiyama et Hayashi, 2006). Cependant, il a été démontré que la disponibilité pour la plante de différents éléments nutritifs a un effet sur l'exsudation des strigolactones (Yoneyama et al., 2007). Une quantité significativement plus importante de strigolactones est produite dans les exsudats racinaires de plantes cultivées en conditions de carence en phosphate (Yoneyama et al., 2007). Cet effet n'a pas été observé en situation de carence en azote, potassium ou magnésium. La capacité pour la plante de pouvoir contrôler la quantité de strigolactones exsudées doit alors représenter un avantage pour stimuler la mise en place de la symbiose MA en situation de carence en phosphate. On peut même proposer que cette régulation de la synthèse de strigolactones par le phosphate soit spécifique des plantes mycotrophes, puisqu'il a été démontré que le lupin, une plante non mycotrophe, est capable de produire des strigolactones indépendamment du niveau de phosphate (Yoneyama et al., 2008).

L'existence, dans la plante, d'un mécanisme systémique pour autocontrôler le taux de colonisation des racines par les champignons MA a été suggérée (Vierheilig et al., 2000). C'est principalement grâce à l'utilisation d'une méthodologie appelée « split-root » que le mécanisme d'autocontrôle a été mis en évidence. Cette méthode consiste à séparer en deux le système racinaire d'une plante pour pouvoir mycorhizer une seule partie et observer les effets sur l'autre. Il a été observé que les exsudats provenant de la moitié des racines non mycorhizées sont incapables d'induire la réponse de « branching » sur les spores pré-germées de champignons MA (Piniór et al., 1999). De plus, il a été observé, aussi en split-root, que l'inoculation de la moitié des racines d'une plante déjà mycorhizée inhibait fortement une éventuelle colonisation par des champignons MA de l'autre moitié du système racinaire (Vierheilig et Piche, 2002). Finalement, il a été observé qu'une plante mycorhizée était moins infestée par les plantes parasites (Lendzemo et al., 2005). Il a donc été proposé qu'une fois mycorhizée, la plante produirait moins

de strigolactones, ce qui expliquerait en partie la plus grande résistance contre les plantes parasites (Lendzemo et al., 2007).

Tout ces données ont permis de proposer l'hypothèse selon laquelle les strigolactones joueraient un rôle dans le mécanisme utilisé par les plantes pour autocontrôler leur taux de mycorhization (Akiyama et Hayashi, 2006; Paszkowski, 2006b; Bouwmeester et al., 2007; Lendzemo et al., 2007). Une étude biochimique de la quantité de strigolactones produites par des plantes mycorhizées et non mycorhizées permettrait de confirmer cette hypothèse. De plus, l'analyse des mutants super-mycorhizables (absence d'autocontrôle de la mycorhization) (Meixner et al., 2005) permettrait de savoir si une dérégulation de la synthèse de strigolactones peut expliquer leur phénotype. Par ailleurs, ces mutants super-mycorhizables sont aussi super-nodulables, indiquant que probablement certains aspects du mécanisme d'autocontrôle sont partagés entre la symbiose MA et la nodulation (Meixner et al., 2005). L'implication des strigolactones dans la symbiose fixatrice d'azote serait aussi à approfondir.

La stimulation de la synthèse des caroténoïdes en général a été associée à la symbiose MA, principalement pour procurer les précurseurs de deux apocaroténoïdes, la mycorradicine et la blumenine (« yellow pigment ») (Fester et al., 2002). Même si le rôle du « yellow pigment » reste encore à clarifier il semblerait qu'il intervienne dans la protection des cellules racinaires lors de la sénescence des arbuscules, c'est-à-dire principalement dans les étapes tardives de symbiose MA (Strack et al., 2003). Nous avons démontré que les strigolactones étaient aussi des apocaroténoïdes, synthétisés par l'action des enzymes CCD7 et CCD8. Or il a été proposé très récemment qu'une forte induction de l'expression du gène *ZmCCD1* (impliqué dans la synthèse du « yellow pigment ») dans les racines mycorhizées de maïs pourrait entraîner une diminution de la production de strigolactones (Zhongkui et al., 2008). Il se pourrait donc que la synthèse du « yellow pigment » et des strigolactones soient bien synchronisées par la plante à plusieurs étapes de la symbiose MA. L'identification complète des précurseurs de la voie de synthèse des strigolactones et du « yellow pigment » et l'étude de la régulation des gènes impliqués, nous permettront de mieux comprendre le rôle des apocaroténoïdes dans la symbiose MA. Il est aussi intéressant de noter que la synthèse des caroténoïdes, précurseurs des strigolactones et du « yellow pigment », est réalisée au niveau des plastes dont on sait qu'ils sont issus d'une cyanobactérie ancestrale. Le champignon *Geosiphon pyriformes*, rapproché de l'ordre des Gloméromycètes par des études phylogénétiques, est capable de former une symbiose

intracellulaire avec une cyanobactérie du genre *Nostoc* (Schüßler et al., 2001). De plus, chez *Nostoc punctiforme* 5 différentes CCDs ont été dernièrement identifiées, parmi lesquelles l'une d'entre elles présente une forte homologie avec AtCCD7, tant dans la séquence que dans l'activité enzymatique (Marasco et al., 2006). Cet exemple unique d'une symbiose endomycorhizienne plus simple pourrait aussi être utilisé pour comprendre l'implication des caroténoïdes dans la symbiose MA.

I.3. Régulation hormonale de la symbiose MA

Avant tout contact physique, le champignon MA réagit à la présence de strigolactones par une ramification intense de ses hyphes (Akiyama et al., 2005; Besserer et al., 2006). Les arbuscules sont aussi des structures fongiques extrêmement ramifiées présentes à l'intérieur des racines des plantes. Il a été alors envisagé que les strigolactones pourraient avoir aussi un rôle dans la formation et la fonction des arbuscules (Andreas et Martin, 2006). Concernant la formation des arbuscules, ni la morphologie des arbuscules ni les autres structures fongiques dans les plantes mutantes (*rms1* ou *rms5*) se sont avérées différentes de celles de la plante sauvage. Cependant, il serait utile d'approfondir les observations et voir si les arbuscules présents dans les mutants sont encore actifs. Par exemple, la quantification histochimique de l'activité phosphatase alcaline du champignon dans les mutants de tomate bloqués dans la synthèse de l'ABA a permis de proposer que cette hormone végétale pourrait être impliquée dans la fonctionnalité des arbuscules (Herrera-Medina et al., 2007).

Par ailleurs, la concentration des autres hormones végétales dans la plante (les cytokinines, l'acide jasmonique, l'auxine et l'éthylène) varie pendant les différentes étapes de la symbiose MA (révisé par Hause et al., 2007) et aussi lors des interactions avec d'autres organismes (Fester et Hause, 2007). Dans notre étude, nous avons démontré que les strigolactones jouent aussi un rôle hormonal dans la plante. Il est donc probable que les strigolactones agissent, en tant qu'hormone végétale (endogène), sur la symbiose MA, les plantes parasites et éventuellement sur d'autres endophytes.

II. Les strigolactones, une nouvelle classe d'hormones végétales

Nos travaux ont été considérablement renforcés grâce à une équipe de chercheurs japonais qui est arrivée, comme nous et de façon indépendante, à la conclusion que les strigolactones étaient cette nouvelle hormone recherchée depuis plusieurs années et responsable chez les plantes de l'inhibition des bourgeons latéraux (Umehara et al., 2008). Alors que nous avons utilisé le pois, une dicotylédone, l'équipe japonaise a utilisé le riz, une monocotylédone. Dans ce travail, les mutants *dwarf1* (*ccd7*) et *dwarf10* (*ccd8*) se sont avérés très diminués dans la production des strigolactones, contrairement à la plante sauvage ou au mutant de perception *dwarf3* (orthologue de *rms4*). De plus, les auteurs ont démontré que l'arrosage au niveau des racines des plantes mutantes *dwarf1* et *dwarf10* avec une solution contenant des strigolactones (GR24 à 1µM) suffisait pour inhiber la croissance des bourgeons, alors qu'un tel effet n'était pas visible dans le mutant *dwarf3*.

Nos expériences et celles de l'équipe japonaise conduisent à conclure que les strigolactones présentent toutes les caractéristiques d'une hormone végétale : active à très faible concentration et pouvant être transportée jusqu'à son site d'action. Le fait que des résultats similaires aient été obtenus avec 3 espèces de plante, dont une monocotylédone et deux dicotylédones, renforcent l'idée que les strigolactones représentent une nouvelle classe d'hormones végétales utilisés par l'ensemble des plantes vasculaires pour contrôler la croissance de leurs bourgeons.

II.1. Apports dans la caractérisation et la biosynthèse de strigolactones

L'identification des strigolactones est difficile du fait de leur production en très faible quantité par les plantes. Les spectromètres de masses étant de plus en plus sensibles, de nouvelles strigolactones sont depuis peu régulièrement découvertes. Les strigolactones produites par le pois n'étant pas connues au moment où nous commençons notre étude, nous avons mis en place une méthode d'analyse optimisée pour leur recherche, basée sur la perte du cycle D (suivi sous forme d'ion à $m/z = 97$). La méthode choisie, appelée PI, a été appliquée en utilisant seulement quelques mg de racines séchées de Pois. Cette méthode s'est avérée adaptée pour notre étude, même si d'autres méthodes étaient suggérées dans la littérature pour la recherche de

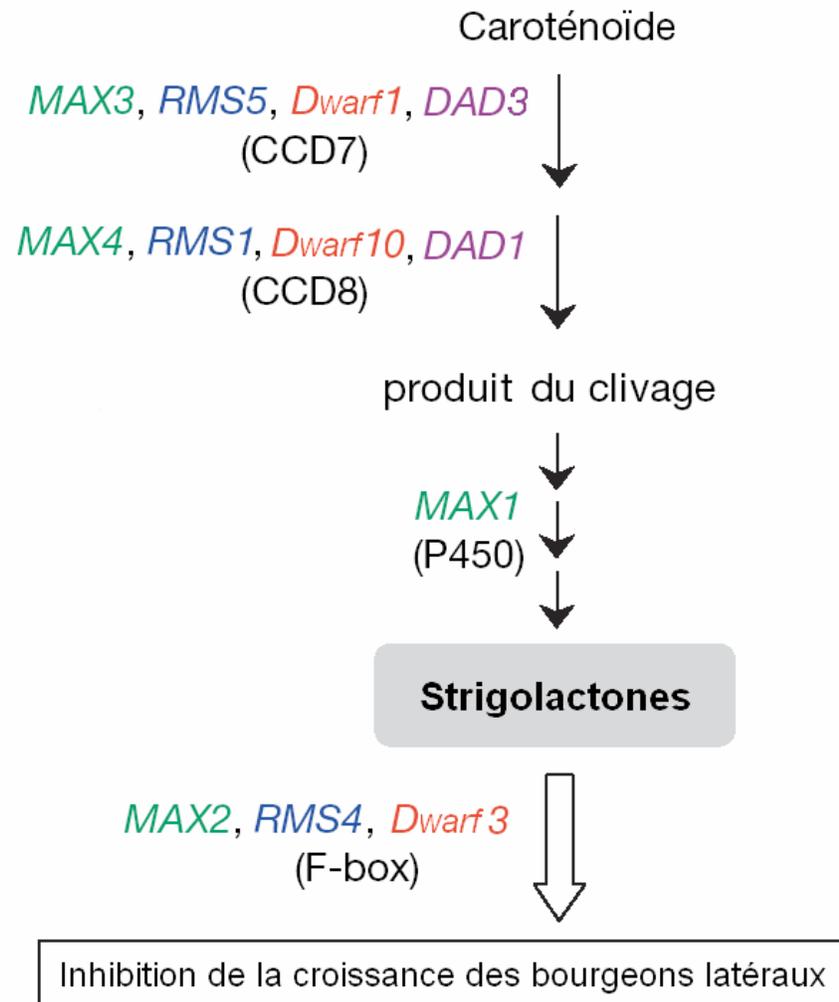


Fig. 32. Voie de biosynthèse hypothétique des strigolactones. Les enzymes CCD7, CCD8 et P450 sont impliquées dans la synthèse des strigolactones, ayant toutes les propriétés d'une nouvelle classe d'hormones végétales contrôlant la croissance des bourgeons latéraux chez *Arabidopsis* (gènes en vert), le pois (gènes en bleu), le riz (gènes en rouge) et le pétunia (gènes en mauve). Modifié d'après Umahara et al., 2008.

nouvelles strigolactones, par exemple la méthode NLoss (Neutral Loss) proposée par Sato et al. (2003). Le principal avantage de la méthode PI est qu'elle apporte une meilleure sensibilité, atout important pour l'étude des strigolactones qui sont des molécules exsudées seulement à l'état de trace. En complément de la méthode PI, l'analyse des exsudats racinaires du pois sauvage avec un spectromètre de masse haute résolution nous a permis de caractériser deux strigolactones: l'orobanchyl acétate, et une nouvelle strigolactone pouvant être un orobanchyl acétate (ou un isomère) mais avec un atome d'oxygène en plus (hydroxyl ou époxy).

Même si l'identification de la première strigolactone, le strigol, date des années 1960, (Cook et al., 1966) la voie de biosynthèse de ces molécules restait hypothétique. Nous avons, pour la première fois, mis en évidence l'implication de deux enzymes (CCD7 et CCD8) dans la voie de biosynthèse des strigolactones (Fig. 32). Ces résultats ont été fortement confirmés par ceux obtenus par Umehara et al. (2008) sur le riz.

Le 5-desoxy-strigol a été détecté dans les exsudats de toutes les plantes dicotylédones et monocotylédones étudiées (Yoneyama et al., 2008). Il a été alors proposé comme précurseur biosynthétique des strigolactones lesquelles peuvent ensuite être hydroxylées, acétylées, oxydées ou/et décarboxylées. De telles modifications structurales et d'autres modifications éventuelles amenant à la formation de nouvelles strigolactones, pourraient faire intervenir l'action des cytochromes P450 (Rani et al., 2008). Les cytochromes P450 sont en effet impliquées dans l'époxydation, l'hydroxylation ou la conjugaison de certaines hormones (végétales et animales) et vraisemblablement aussi du signal SMS (Moise et al., 2005). Le gène *MAX1* chez *Arabidopsis*, codant pour une cytochrome P450 de type III, agit en aval des enzymes CCD7 et CCD8 dans la synthèse de l'hormone SMS (Booker et al., 2005). Il serait intéressant d'analyser les strigolactones dans les exsudats racinaires du mutant *max1* pour identifier plus précisément le rôle de cette P450.

Les autres étapes de la synthèse des strigolactones (et du SMS) restent à élucider. Une des étapes clés est l'identification du ou des caroténoïde(s) précurseur(s) servant de substrat pour le clivage et la synthèse des strigolactones. Cette étape est compliquée par l'absence de connaissances sur les caroténoïdes synthétisés au niveau des racines. L'analyse métabolomique préliminaire réalisée dans le chapitre 2 de la thèse a permis de repérer plusieurs ions différentiellement accumulés dans les mutants *rms* par rapport aux plantes sauvages. Si on suppose que les mutations dans CCD7 et CCD8, enzymes impliquées dans la synthèse des

strigolactones, amènent à l'accumulation du caroténoïde précurseur et de certains intermédiaires, l'analyse structurale de ces ions pourrait permettre de les identifier. Cependant, il faut préciser que l'identification des métabolites n'est pas triviale, et représente l'étape limitante de ce type d'approche. En effet, les bases de données des métabolites végétaux disponibles sont encore loin d'être exhaustives et les standards synthétiques peuvent souvent ne pas être disponibles dans le commerce (Allwood et al., 2008). L'origine biosynthétique du cycle D des strigolactones est une autre question ouverte. Il a été proposé comme issu du dimethylallyl diphosphate (DMAPP) synthétisé par la voie des terpènes cytoplasmiques (voie MVA) mais ceci demande à être confirmé (Humphrey et Beale, 2006).

Dans l'étude utilisant l'expression de l'enzyme recombinante CCD7 chez *E.coli*, il a été montré que CCD7 était capable de cliver différents caroténoïdes (principalement du β -carotène au niveau des carbones 9-10) (Schwartz et al., 2004). Le produit de clivage du β -carotène amène à la production d'une molécule composée de 18 carbones après l'action subséquente de l'enzyme CCD8. Cette réaction n'est toutefois pas en accord avec l'hypothèse proposée par Matusova et al (2005). Le caroténoïde précurseur proposé par ces derniers serait le 9-(Z)- β -carotène qui, après clivage au niveau des carbones 11-12 par des enzymes du type NCED, produirait une molécule composée de 15 carbones. En collaboration avec l'équipe d'Harro Bouwmeester nous avons étudié l'implication des enzymes NCED dans la synthèse des strigolactones. Nous avons montré que la stimulation de la germination des graines de plantes parasites en présence des exsudats racinaires d'un mutant de tomate, *notabilis*, bloqué dans l'enzyme NCED1, était diminuée (Lopez-Raez et al., 2008). Aucune corrélation directe entre ce phénotype et l'absence de strigolactones dans les exsudats du mutant (par exemple, une analyse biochimique ou/et des expériences de complémentation) n'a été apportée. Néanmoins, l'implication des enzymes NCED à une autre étape de la synthèse de strigolactones ne peut pas être exclue.

L'identification et la caractérisation d'autres mutants, criblés initialement par rapport à leur phénotype hyper-ramifié, devraient nous permettre de progresser dans la compréhension des différentes étapes de synthèse des strigolactones, leur mode d'action, leur régulation, entre autres. Parmi les organismes les mieux adaptés pour de tels travaux, les plantes modèles comme *Arabidopsis thaliana*, *Lotus japonicus*, *Oryza sativa* ou *Medicago truncatula* s'imposent naturellement. Chez les trois premières plantes, les strigolactones produites dans les exsudats racinaires ont déjà été déterminées : l'orobanchol, le 5-desoxy-strigol et le 2'-*epi*-5-desoxy-

strigol (Goldwasser et al., 2008; Akiyama et al., 2005; Umehara et al., 2008). Les strigolactones produites par *M. truncatula* restent à être identifiées, mais l'utilisation des écotypes les plus sensibles aux plantes parasites, supposés être surproducteurs de strigolactones (Fernandez-Aparicio et al., 2008) pourrait faciliter cette étape. Un autre organisme pouvant présenter de multiples avantages est la mousse *Physcomyrella patens*. *P. patens* est devenu un modèle très attractif pour étudier la biosynthèse et l'implication des phytohormones dans le développement des plantes, puisque les différents stades de développement de la mousse semblent être contrôlés par des hormones végétales comme l'auxine, les cytokinines et l'acide abscissique (révisé par Decker et al., 2006). Des techniques de cultures standardisées, un génome entièrement séquencé, une architecture simplifiée avec un nombre et des types de cellules plus limités que dans les plantes supérieures, sont les principaux atouts de *P. patens*. Les gènes *CCD7*, *CCD8* et *RMS4* ont été identifiés dans son génome et un mutant knock-out du gène *PsCCD8* a été généré par recombinaison homologue, technique relativement facile à réaliser dans cette espèce (C. Rameau, communication personnelle).

II.2. Rôle des strigolactones dans l'inhibition de croissance des bourgeons latéraux

La croissance d'un bourgeon dans la plante s'opère en trois stades : un stade de dormance, un stade de transition et un stade de croissance. Le stade de transition semble être le stade dans lequel le bourgeon est le plus réceptif aux différents facteurs qui peuvent stimuler ou inhiber sa croissance. Ces facteurs sont, entre autres, les changements environnementaux, l'âge de la plante, la position du bourgeon dans la tige et finalement l'action des hormones (Ongaro et Leyser, 2007). La découverte des strigolactones comme facteurs impliqués dans la régulation de croissance des bourgeons permettra dans les années à venir d'élucider leur mode précis d'action dans le contrôle de l'architecture des plantes.

Dans notre travail nous avons démontré que l'application directe de strigolactones sur les bourgeons permettait de contrôler la ramification des tiges dans les mutants de pois (*rms1* et *rms5*) (Gomez-Roldan et al., 2008). Cependant, nous ne pouvons pas exclure que ce soit une molécule avec une structure proche de celle des strigolactones (par exemple, simplement les cycles ABC des strigolactones) qui contrôle *in planta* la croissance des bourgeons. Des analogues de synthèse (il en existe déjà plusieurs pour les strigolactones) plus ou moins tronqués ou modifiés pourront être testés sur leur capacité à contrôler la croissance des bourgeons, l'objectif

étant d'identifier la ou les molécules actives dans la plante. Le marquage de ces molécules permettra ensuite d'étudier sous quelle forme elles sont stockées dans la plante, comment elles sont transportées jusqu'aux bourgeons et quels sont les mécanismes de leur perception. Sur ce dernier point, nous avons montré que le mutant *rms4* du pois n'était pas inhibé dans la synthèse des strigolactones et que l'application du GR24 sur les bourgeons ne permettait pas d'inhiber sa croissance. Des résultats similaires ont été obtenus dans le mutant *dwarf3* chez le riz (Umehara et al., 2008). Ces résultats démontrent que le gène *RMS4* peut être impliqué dans la perception des strigolactones comme précédemment décrit pour la perception du SMS. *RMS4* est exprimé au niveau des bourgeons et code pour une protéine à motif F-box. Cette famille de protéines fait partie principalement du complexe d'ubiquitination et peut aussi agir comme récepteurs d'hormones telles que l'auxine (Johnson et al., 2006). Il est donc possible d'imaginer que le produit du gène *RMS4* intervienne en tant que récepteur des strigolactones au niveau des bourgeons pour déclencher la cascade de signalisation intervenant dans le processus d'inhibition de la ramification des tiges. Les strigolactones sont actives à de très faibles concentrations sur la germination des graines de plantes parasites et sur les champignons MA, suggérant l'implication de récepteurs spécifiques à ces molécules. Il serait alors intéressant de rechercher si un mécanisme de perception similaire à celui des plantes pourrait exister dans ces deux organismes du sol.

Plusieurs gènes associés à la dormance ou à la croissance des bourgeons ont été caractérisés en utilisant principalement des plantes avant et après décapitation. Cependant, cette approche, peut ne pas représenter exactement la régulation de croissance des bourgeons d'une plante intacte (Dun et al., 2006). L'identification du mode d'action des strigolactones permettra d'identifier leurs cibles génétiques et cellulaires dans la plante intacte. Pour l'instant, il a été observé chez les champignons MA que les mitochondries étaient des cibles précoces des strigolactones (Besserer et al., 2006; Besserer et al., 2008). Même si la réponse finale semble opposée dans ces deux organismes - inhibition de la ramification dans les plantes et stimulation de la ramification des hyphes dans le champignon - il est possible que des éléments de la cascade de signalisation chez ces deux organismes soient conservés. Des études comparatives de transcriptomes et de protéomes de plantes (graines de plantes parasites ou bourgeons) et de champignon traités ou non avec du GR24, permettront d'avancer dans cette recherche des mécanismes d'action des strigolactones.

Dans l'article d'Umehara et al. (2008) les auteurs ont montré que l'application exogène de strigolactones inhibe l'expression du gène *CCD8* chez les mutants *dwarf10* (*ccd8*). Cette observation est en accord avec l'existence d'un phénomène de rétrocontrôle suggéré dans le modèle hypothétique d'action du signal SMS (voir Fig. 22, chapitre 2). Dans ce phénomène, un nouveau signal mobile, celui-ci transporté des tiges vers les racines, serait induit quand le signal SMS est faible (ex. dans les mutants *ccd8*) et stimulerait la production du SMS *via* le gène *CCD8* (Foo et al., 2005). Ainsi, au-delà des strigolactones et des hormones comme l'auxine et les cytokinines, d'autres molécules régulatrices contrôlent l'architecture des plantes, processus de développement dont on ne fait que découvrir la complexité.

Finalement, il a été observé que l'addition exogène de strigolactones chez les plantes sauvages d'*Arabidopsis*, de pois et de riz, ne provoquait pas d'effets pléiotropiques visibles sur les plantes (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008). Cependant, il est possible d'imaginer que, comme d'autres hormones végétales (par exemple, l'ABA qui régule la réponse de la plante à plusieurs stress biotiques et abiotiques et est impliqué dans la germination des graines), les strigolactones ou des molécules proches interviennent dans d'autres étapes du développement de la plante. On connaît l'effet des strigolactones sur la germination des graines des plantes parasites *Striga* et *Orobanche* et il serait intéressant d'examiner si des effets similaires ne pourraient pas être observés sur les graines de plantes non parasites comme *Arabidopsis*. De plus, il a été récemment démontré qu'une molécule appelée d'orenone, serait impliquée dans la croissance polarisée des poils absorbants de la racine. Cette molécule, issue du clivage des caroténoïdes, présente une structure très proche du produit de clivage hypothétique de *CCD8* (cétone composée de 18 carbones), molécule intermédiaire dans la synthèse des strigolactones (Schlicht et al., 2008).

III. Strigolactones, molécules avec une triple fonction

La triple action des strigolactones sur des organismes phylogénétiquement distants, et avec des finalités extrêmement différentes, est probablement un des rares exemples répertoriés dans la littérature.

Au niveau évolutif, une question se pose de savoir quelle a été la fonction ancestrale des strigolactones pour les plantes. L'occurrence de la symbiose MA chez la plupart des espèces végétales, des datations moléculaires et des observations de fossiles suggèrent fortement que l'apparition des mycorhizes s'est faite en même temps que celle des premières plantes terrestres (Remy et al., 1994). Les premières plantes terrestres, probablement très proches des mousses ou des lycopodes d'aujourd'hui, avaient une architecture aérienne très simple et peu diversifiée. Les mousses et les lycopodes qui, aujourd'hui, sont toujours capables de rentrer en symbiose avec les champignons MA, sont des modèles intéressants pour essayer de comprendre laquelle des deux fonctions, hormonale ou mycotrophe, a initialement prévalu. Pour cela, l'identification des strigolactones des mousses ou des lycopodes et l'étude de leur importance pour la symbiose MA ou pour l'architecture des thalles, seront nécessaires.

Les plantes parasites (certaines espèces d'*Orobanche*, principalement) sont devenues un de pathogènes majeurs de grandes cultures européennes (bassin méditerranéen essentiellement) et du Moyen-Orient (Fernandez-Aparicio et al., 2008). En France c'est principalement l'espèce d'*Orobanche ramosa* L. qui cause considérables dégâts dans de nombreuses cultures. De plus, une enquête nationale réalisée sur les trois principales cultures (chanvre, colza, tabac) a établi que sur les 96 départements de France métropolitaine, 20 étaient contaminés par cette orobanche. L'identification de deux gènes (*CCD7* et *CCD8*) impliqués dans la biosynthèse des strigolactones permet d'envisager dans le futur la sélection par marqueurs de variétés de plantes moins productrices de strigolactones et donc probablement plus résistantes aux plantes parasites. De plus, on peut penser que la symbiose MA est directement impliquée dans la diminution de la synthèse des strigolactones (Lendzemo et al., 2007; Lendzemo et al., 2005; Zhongkui et al., 2008). Même si le lien entre la symbiose MA, les strigolactones et les plantes parasites n'est encore qu'hypothétique, une méthode de lutte très écologique contre les plantes parasites pourrait passer par l'exploitation de la symbiose mycorhizienne. Comme Umehara et al. (2008) l'ont démontré, l'absence de strigolactones n'est pas le seul facteur qui procure une résistance aux plantes parasites. Il sera alors indispensable de proposer les stratégies mentionnées plus haut, en combinaison avec d'autres approches, afin d'apporter des méthodes de contrôle économiques et efficaces contre les plantes parasites *Striga* et *Orobanche*.

Comme décrit par Sawers et al. (2008) la symbiose MA est une interaction très complexe et la balance entre les coûts et bénéfices que peuvent apporter les champignons MA pour la

plante hôte peut être très fragile. Une éventuelle utilisation des strigolactones dans l'agriculture pour stimuler la symbiose MA afin d'améliorer la nutrition phosphatée des plantes et obtenir de meilleurs rendements impliquera donc de sélectionner les combinaisons entre plantes hôtes et partenaires fongiques les mieux adaptées pour chacune des pratiques agricoles.

Les connaissances que notre travail a commencé à apporter sur le rôle hormonal des strigolactones pourraient aussi conduire à contrôler le degré de ramifications des plantes d'intérêt agronomique. Les céréales comme le maïs, le riz et le blé, par exemple, constituent un large pourcentage de l'apport énergétique dans la nutrition humaine. Ils sont également nécessaires à l'alimentation des animaux domestiqués par l'homme (Doust, 2007). Depuis des milliers d'années, l'homme a sélectionné les variétés agronomiques céréalières les plus intéressantes, souvent faiblement ramifiées pour augmenter la richesse en amidon des graines de l'épi. L'avenir nous dira si les strigolactones ont eu une utilisation agronomique pour contrôler encore davantage ce paramètre de croissance. Le contrôle de la ramification par l'application de strigolactones peut aussi avoir un intérêt en sylviculture, où les arbres destinés à la production du bois doivent être le moins ramifiés possible. En revanche, dans le domaine de l'horticulture, l'intérêt est autre : en inhibant la synthèse de strigolactones, la plante aura plus de ramifications et donc d'inflorescences. On pourrait trouver également intéressant de stimuler le nombre de tiges des plantes fourragères pour augmenter leur biomasse. Toutes ces utilisations n'impliquent pas forcément la création de plantes génétiquement modifiées. Les strigolactones sont des molécules biodégradables, naturelles et capables d'agir à très faibles concentrations : leur exploitation agronomique pourrait se faire sans effets négatifs sur l'environnement moyennant une bonne compréhension et optimisation de leur mode d'action.

Tableau 3. Mutants de pois utilisés dans le chapitre 2 de cette thèse.

Gène muté	Allèle	Mutation (Référence)	Fond génétique
<i>RMS1</i> (<i>CCD8</i>)	<i>rms1-3</i> <i>rms1-4</i> <i>rms1-10</i> <i>rms1-11</i>	Délétion (Sorefan <i>et al.</i> , 2003) G218A (Foo <i>et al.</i> , 2005) G218A (Foo <i>et al.</i> , 2005)	Raman Paloma Terese Terese
<i>RMS5</i> (<i>CCD7</i>)	<i>rms5-1</i> <i>rms5-2</i>	Y593D (Johnson <i>et al.</i> , 2006) T170STOP (Johnson <i>et al.</i> , 2006)	Porta Paloma
<i>RMS4</i>	<i>rms4-3</i>	Q126STOP (Johnson <i>et al.</i> , 2006)	Terese

Méthodologie

Matériel végétal

Les variétés de maïs (*Zea mays*) utilisés dans le premier chapitre de la thèse sont : B73 et W23. Les graines W23 sont produites par Laborde Jacques (INRA, St Martin de Hinx, France). Les graines du mutant de maïs y9 sont fournies par Elene Wurtzel (The City University of New York, USA). Les graines sont stérilisées en surface avec 70% d'éthanol pendant 0.5 min puis avec une solution à 10% de Chloramine T (Sigma, France). Après trois rinçages à l'eau stérile, les graines sont transférées aseptiquement dans un milieu solide à base de dextrose de pomme de terre (PDA, Sigma) et mise à germer pendant quatre jours (25°C à l'obscurité).

Les différents mutants de pois (*Pisum sativum* L.) utilisés dans le deuxième chapitre de la thèse sont *rms1-3*, *rms1-10*, *rms1-11*, *rms1-4* (Foo et al., 2005), *rms4-3*, *rms5-1* et *rms5-2* (Johnson et al., 2006). Le gène muté et le site de mutation de chaque mutant sont connus, ils dérivent de différentes variétés (Raman, Terese, Porta et Paloma) comme indiqué dans le tableau 3. Les graines de pois sont stérilisées avec 3.2% d'hypochlorite de sodium pendant 10 min et 95% d'éthanol pendant 2 min, puis rincées 4 fois avec de l'eau stérile. Elles sont mises à germer pendant 4 jours dans un milieu eau/agar (0.7 % p/v), à 25°C sous une photopériode de 16h. Les graines pré-germées sont utilisées pour les expériences de mycorhization et d'exsudation.

Matériel fongique

Les trois espèces de champignons MA utilisés pour les tests d'activité et pour les expériences de mycorhization sont les suivantes : *Gigaspora rosea*, *G. gigantea* et *Glomus intraradices*. Les spores de *G. rosea* et *G. gigantea* sont produites et stérilisées comme décrit par Besserer et al. (2006). Les spores stériles de *G. intraradices* proviennent de Premier Tech Ltée (Rivière du Loup, Québec, Canada).

Préparation des exsudats racinaires

La récupération et la semi-purification des exsudats des plantes pour les tests d'activité et l'analyse biochimique de strigolactones se font comme décrit par Gomez-Roldan et al. (2008,

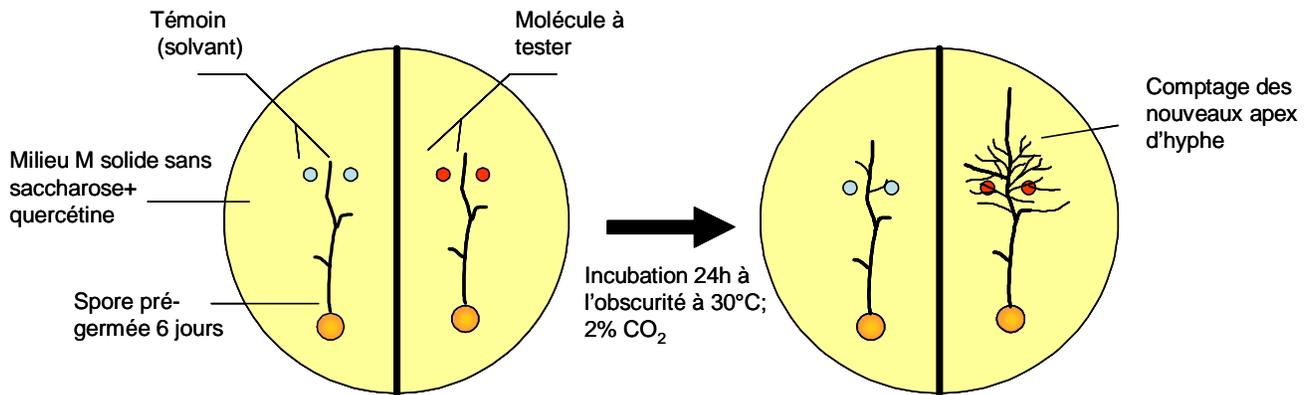


Fig. 33. Principe du test d'activité de molécules sur le champignon mycorhizien *Gigaspora rosea*. Le nombre de nouvelles branches d'hyphes formées est compté 24h ou 48h après ajout des molécules de part et d'autre des tubes germinatifs et comparé à celui déterminé dans le témoin négatif.

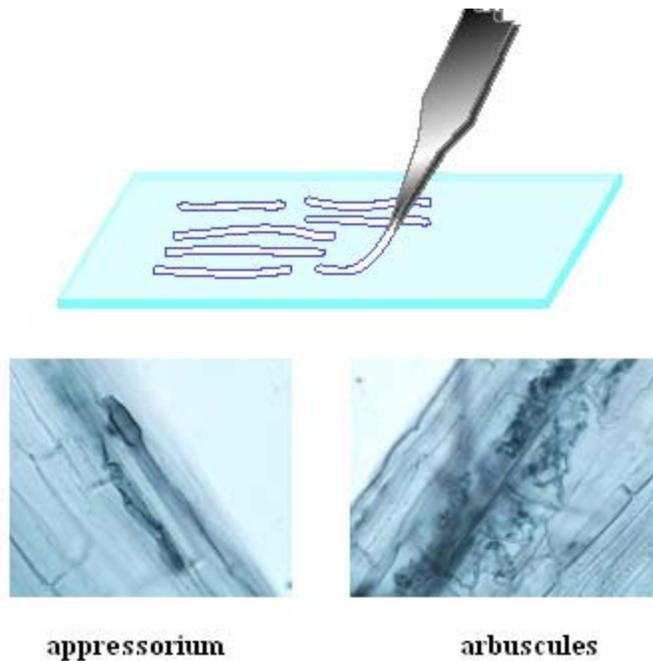


Fig. 34. Méthode microscopique de quantification du taux de mycorhization, donné en nombre de points d'infection par centimètre de racine. Les racines sont découpées en segments d'environ 2 cm, éclaircies au KOH 10%, colorées au Chlorazole Black E, et le nombre de sites d'infection présentant des arbuscules par centimètre de racine est compté sous le microscope (Obj. 10X)

pages 45-46 de cette thèse). Après l'extraction des exsudats racinaires à l'acétate d'éthyle, la phase organique est récupérée et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le résidu sec est remis en solution dans l'acétone et stockés à -20°C avant d'être utilisé pour les tests d'activité ou pour l'analyse en spectrométrie de masse.

Test d'activité sur les champignons MA

Le principe du test d'activité sur les champignons MA est représenté dans la figure 33. Les tests d'activités avec *G. rosea* suivent le protocole utilisé par Besserer et al. (2006). Les spores sont placées sur un milieu M (Bécard et Fortin, 1988) gélosé sans saccharose, avec ajout, après autoclavage, de quercétine (10µM). Pour les tests d'activité avec *G. gigantea* (Chap. 2) le milieu de culture est composé de 0,1% MgSO₄ et de phytigel à 0,5%.

Pour tester l'effet de l'herbicide fluridone sur la croissance de *G. rosea*, une solution mère de fluridone (Sigma-Aldrich) est préparée dans 100% éthanol, puis ajoutée au milieu M (après autoclavage) afin d'obtenir des milieux contenant 5, 25, 50, 100 ou 250 mM de fluridone. Le volume d'éthanol est ajusté pour être identique dans tous les milieux (témoin et contenant la fluridone). Le nombre total d'apex d'hyphes formés pendant 7 jours de croissance dans les différents milieux avec la fluridone, est utilisé comme marqueur de la toxicité de l'herbicide sur le champignon. La solution de GR24 à 10⁻⁸ M pour traiter les hyphes de *G. rosea* est préparée dans 10% acetonitrile-eau.

Expériences de mycorhization

Mycorhization du maïs, chapitre 1 de la thèse : dans chaque pot contenant le substrat (sable : sépiolite, 1 : 2) une graine pré-germée de maïs est inoculée avec 20 spores de *G. rosea*. Les plantules sont exposées à une faible lumière (20µmol photon s⁻¹ m⁻²) et arrosées tous les 2 jours avec 15 ml d'eau ou avec une solution de GR24 à 10⁻⁸M (solution mère à 10⁻⁴M dans l'acétone). Les plantes ont été récoltées au bout de 3 semaines de culture et préparées pour la quantification du taux de mycorhization, mesuré par la méthode microscopique de Trouvelot et Kough, (1986), adaptée aux faibles niveaux de mycorhization (Fig. 34). Le nombre de points d'infection (présence d'un appressorium) où l'on observe des arbuscules au niveau du cortex

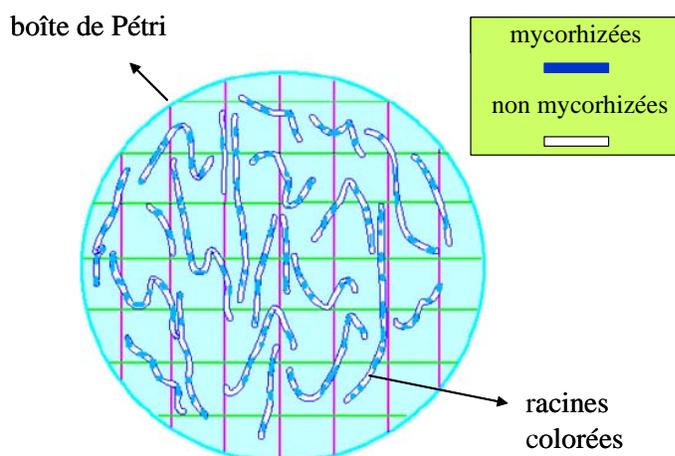


Fig. 35. Représentation de la Gridline Intersect Method. Cette méthode permet d'estimer le pourcentage de colonisation des racines par des champignons MA. Le nombre d'intersections de la grille avec des racines mycorhizées est divisé par le nombre total d'intersections, permettant d'établir une valeur (en pourcentage) du taux de mycorhization de chaque échantillon.

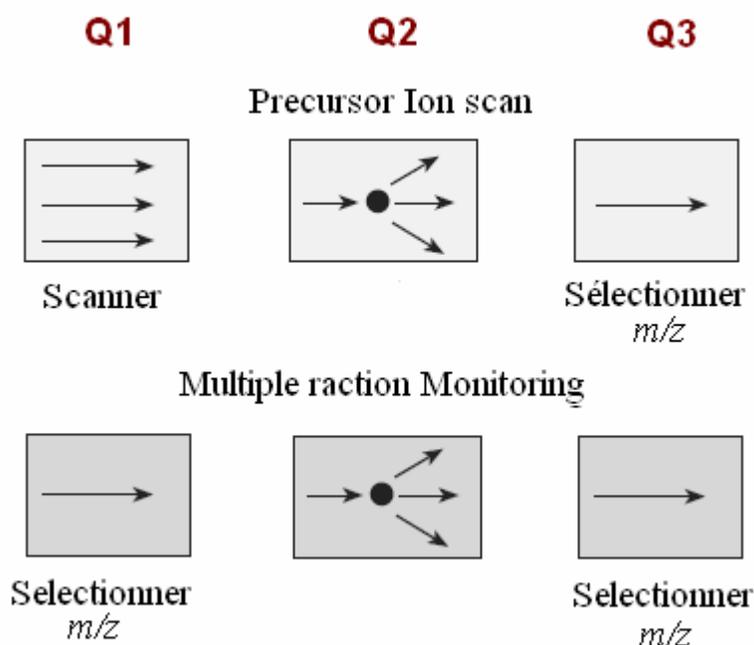


Fig. 36. Représentation des modes de sélection des ions dans les quadripôles (Q) utilisés avec le QTRAP. Le mode Precursor Ion Scan (PI) permet de scanner tous les ions parents dans le Q1 qui produisent un même ion fils, sélectionné dans la trappe à ions (Q3). Dans le mode MRM un seul un ion parent est sélectionné dans le Q1 et un seul de ses fragments est conservé dans la trappe.

racinaire est quantifié et le taux de mycorhization est donné en points d'infection par centimètre de racine observé.

Mycorhization du pois, chapitre 2 de la thèse : les conditions de culture (substrat, solution d'arrosage et lumière) des plantules de pois pour les expériences de mycorhization sont détaillées dans l'article de (Gomez-Roldan et al., 2008). Environ 250ml de substrat est mélangé avec 2/3 d'inoculum de *G. intradices* (300 ou 60 spores au final par pot). A côté de la graine pré-germée du pois est déposé le reste de l'inoculum. Après 6 semaines de co-culture, les plantes sont retirées du substrat pour déterminer leur pourcentage de mycorhization. La méthode utilisée dans le chapitre 2 pour quantifier le taux de mycorhization des plantes est la Gridline intersect method (Fig. 35) (Giovannetti et Mosse, 1980). Cette méthode permet d'analyser rapidement un grand nombre d'échantillons, bien adaptée pour les plantes inoculées avec le champignon *G. intraradices*, présentant des taux de mycorhization importants. Pour les expériences d'inoculation avec *G. rosea*, cette même méthode est aussi utilisée.

Analyse des strigolactones par chromatographie et spectrométrie de masse

Les exsudats racinaires utilisés pour la caractérisation et la quantification des strigolactones du pois dans le deuxième chapitre de la thèse sont préparés comme décrit par (Gomez-Roldan et al., 2008). Deux appareils de spectrométrie de masse sont utilisés. Premièrement, le QTRAP, appareil caractérisé pour permettre une haute sensibilité et idéal pour la quantification de molécules connues. Il est composé d'un premier quadropole (Q1), d'une cellule de collision (Q2) puis d'une trappe à ions (Q3). Avec cette technologie, les deux modes d'acquisition de données utilisés dans cette thèse (PI, Precursor Ion scan et MRM, Multiple Reaction Monitoring) sont possibles (Fig. 36). L'autre appareil masse est un Q-TOF qui permet une meilleure résolution, indispensable pour confirmer l'identification des strigolactones. Tous les paramètres concernant l'utilisation de l'HPLC-QTRAP et l'UPLC-QTOF sont décrits dans l'article de Gomez-Roldan et al. (2008) (pages 45-46).

Les mêmes conditions de cultures décrites par Gomez-Roldan et al. (2008) sont appliquées aux plantes utilisées pour les quantifications de strigolactones dans les tissus racinaires. Les racines de plantes d'environ 4 semaines sont broyées à l'azote liquide et extraites à l'acétate d'éthyle. Une étape de purification en HPLC est réalisée avant injection en HPLC-

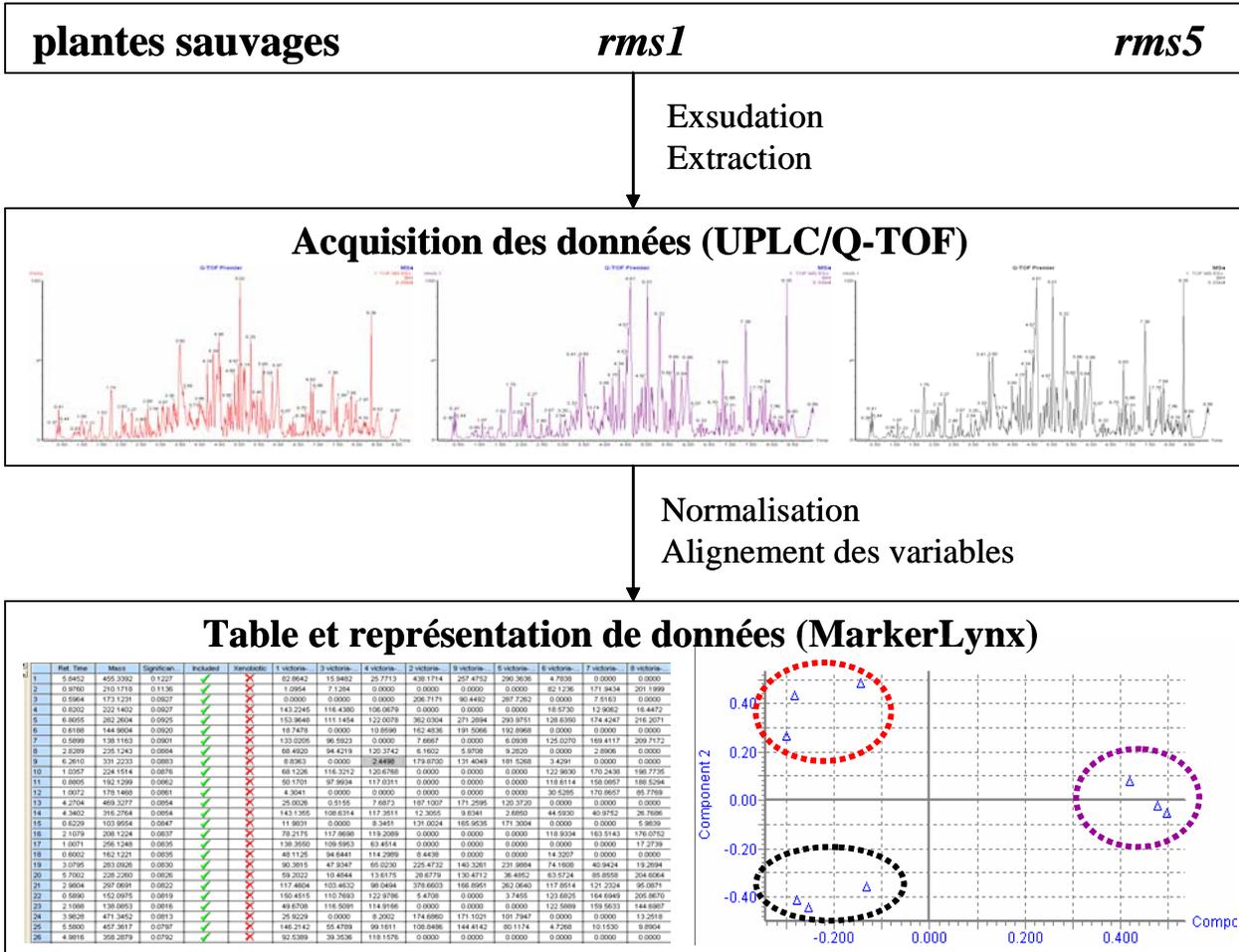


Fig. 37. Schéma représentant l'acquisition des données de métabolomique. L'obtention et l'extraction des échantillons représentent une étape importante dans cette approche. Les exsudats extraits des plantes de pois sauvages ou mutées (*rms1* et *rms5*) sont analysés par UPLC-Q-TOF sur colonne C18. La comparaison des chromatogrammes et des spectres associés pour chaque échantillon est réalisée avec un logiciel spécialisé (MarkerLynx) adapté pour analyser des mégadonnées. Les variations quantitatives de molécules sont présentées dans un tableau.

QTRAP afin d'éliminer des composés pouvant affecter l'ionisation des strigolactones. Environ 200 μ L (correspondant à 3g de poids de racines sèches) de chaque échantillon sont injectés dans une colonne HPLC C18 (5 μ m, 10 x 250 mm, Inertsil ODS-3). Les solvants utilisés sont : solvant A : eau, solvant B : acétonitrile à un débit de 4 ml min⁻¹. Le gradient HPLC utilisé pour la séparation des molécules est le suivant : rampe linéaire de 20% à 40% (B) en 10min, isocratique 40% (B) pendant 5min, passage linéaire de 40 à 50% (B) en 10min, isocratique 50% (B) pendant 5min, rampe linéaire de 50 à 70% en 5 min, isocratique 70% (B) pendant 5 min, rampe de 70 à 100% (B) en 3 min et isocratique 100% (B) pendant 8 min. Les fractions HPLC sont collectées toutes les 2 min et séchées à l'évaporateur rotatif. Chaque fraction est récupérée dans 30 μ L d'un mélange acétonitrile/eau (50%) pour être injectée dans l'HPLC-QTRAP.

Analyse métabolomique

L'objectif final d'une analyse métabolomique est d'identifier et quantifier les molécules pouvant être différentiellement accumulées (sous- ou sur-accumulées) dans des conditions données (Fig. 37) (révisé par Allwood et al., 2008). Elle fournit des données complémentaires à celles obtenues par les analyses génomiques, transcriptomiques et protéomiques, permettant d'avoir une compréhension plus globale des systèmes biologiques.

Les exsudats racinaires utilisés pour l'analyse métabolomique sont générés suivant le même protocole d'extraction décrit par (Gomez-Roldan et al., 2008). Cinq microlitres d'exsudats correspondant à 30 mg de poids sec de racines sont injectés 3 fois dans l'UPLC-QTOF avec le gradient et les paramètres d'ionisation décrits par Gomez-Roldan et al. (2008). Les données obtenues sont analysées avec le logiciel MarkerLynx (Waters) avec les paramètres suivants : temps de rétention comparés, 0.7 à 7min ; fenêtre de masses, de 80 à 800 m/z ; erreur de masse tolérée 0.05 Da ; nombre des masses maximales par temps de rétention détecté, 20 ; intensité minimale du pic, 40 BPI (base peak intensity). La comparaison des profils réalisés par le logiciel MarkerLynx est contrôlée manuellement pour extraire seulement les masses des ions deux fois exprimées dans les exsudats des mutants par rapport aux plantes sauvages.

Références bibliographiques

- Akiyama, K. and Hayashi, H. (2006) Strigolactones: chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. *Ann Bot (Lond)*, **97**, 925-931.
- Akiyama, K., Matsuzaki, K. and Hayashi, H. (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, **435**, 824-827.
- Albrecht, C., Geurts, R. and Bisseling, T. (1999) Legume nodulation and mycorrhizae formation; two extremes in host specificity meet. *Embo J*, **18**, 281-288.
- Al-Karaki, G., McMichael, B. and Zak, J. (2004) Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. *Mycorrhiza*, **14**, 263-269.
- Allwood, J.W., Ellis, D.I. and Goodacre, R. (2008) Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant-host interactions. *Physiol Plant*, **132**, 117-135.
- Aly, R. (2007) Conventional and biotechnological approaches for control of parasitic weeds. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, **43**, 304-317.
- Andreas, B. and Martin, P. (2006) The most widespread symbiosis on Earth. *PLoS Biol*, **4**, e239.
- Arite, T., Iwata, H., Ohshima, K., Maekawa, M., Nakajima, M., Kojima, M., Sakakibara, H. and Kyojuka, J. (2007) DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant J*, **51**, 1019-1029.
- Auldridge, M.E., McCarty, D.R. and Klee, H.J. (2006) Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr Opin Plant Biol*, **9**, 315-321.
- Bais, H.P., Park, S.W., Weir, T.L., Callaway, R.M. and Vivanco, J.M. (2004) How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Sci*, **9**, 26-32.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S. and Vivanco, J.M. (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol*, **57**, 233-266.
- Balestrini, R. and Lanfranco, L. (2006) Fungal and plant gene expression in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*, **16**, 509-524.
- Bangerth, F. (1994) Response of cytokinin concentration in the xylem exudate of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants to decapitation and auxin treatment and relationship to apical dominance. *Planta*, **194**, 439-442.
- Bécard, G., Douds, D. and Pfeffer, P.E. (1992) Extensive in vitro hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols. *Appl Environ Microbiol*, **58**, 821-825.
- Bécard, G. and Fortin, J. (1988) Early events of vesicular arbuscular mycorrhiza formation on Ri T6DNA transformed roots. *New Phytol*, **108**, 211-218.
- Bécard, G., Kosuta, S., Tamasloukht, M., Sejalon-Delmas, N. and Roux, C. (2004) Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. *Can J Bot*, **82**, 1186-1197.

- Bécard, G. and Piche, Y. (1990) Physiological factors determining vesicular-arbuscular mycorrhizal formation in host and non-host Ri T-DNA transformed roots. *Can J Bot*, **68**, 1260-1264.
- Bécard, G. and Piché, Y. (1989) Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Appl Environ Microbiol*, **55**, 2320-2325.
- Bécard, G., Taylor, L.P., Douds, D.D.J., Pfeffer, P.E. and Doner, L.W. (1995) Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbioses. *Mol Plant Microbe Interact*, **8**, 252-258.
- Bertin, C., Yang, X. and Weston, L. (2003) The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil*, **256**, 67-83.
- Besserer, A., Becard, G., Jauneau, A., Roux, C. and Sejalon-Delmas, N. (2008) GR24, a synthetic analogue of strigolactones, stimulates the mitosis and growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* by boosting its energy metabolism. *Plant Physiol*, **148**, 402-413.
- Besserer, A., Puech-Pages, V., Kiefer, P., Gomez-Roldan, V., Jauneau, A., Roy, S., Portais, J.C., Roux, C., Becard, G. and Sejalon-Delmas, N. (2006) Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol*, **4**, e226.
- Beveridge, C. (2006) Axillary bud outgrowth: sending a message. *Curr Opin Plant Biol*, **9**, 35-40.
- Beveridge, C., Ross, J. and Murfet, I. (1996) Branching in pea. Action of genes *Rms3* and *Rms4*. *Plant Physiol*, **110**, 859-865.
- Beveridge, C., Symons, G., Murfet, I., Ross, J. and Rameau, C. (1997) The *rms1* mutant of pea has elevated indole-3-acetic acid levels and reduced root-sap zeatin riboside content but increased branching controlled by graft-transmissible signal(s). *Plant Physiol*, **115**, 1251-1258.
- Beveridge, C., Symons, G. and Turnbull, C. (2000) Auxin inhibition of decapitation-induced branching is dependent on grafttransmissible signals regulated by genes *Rms1* and *Rms2*. *Plant Physiol*, **123**, 689-697.
- Booker, J., Sieberer, T., Wright, W., Williamson, L., Willett, B., Stirnberg, P., Turnbull, C., Srinivasan, M., Goddard, P. and Leyser, O. (2005) MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Dev Cell*, **8**, 443-449.
- Bouvier, F., Isner, J.-C., Dogbo, O. and Camara, B. (2005a) Oxidative tailoring of carotenoids: a prospect towards novel functions in plants. *Trends Plant Sci*, **10**, 187-194.
- Bouvier, F., Rahier, A. and Camara, B. (2005b) Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog Lipid Res*, **44**, 357-429.
- Bouwmeester, H.J., Matusova, R., Zhongkui, S. and Beale, M.H. (2003) Secondary metabolite signalling in host-parasitic plant interactions. *Curr Opin Plant Biol*, **6**, 358-364.
- Bouwmeester, H.J., Roux, C., Lopez-Raez, J.A. and Becard, G. (2007) Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends Plant Sci*, **12**, 224-230.

- Brown, B.T., Foster, C., Phillips, J.N. and Rattigann, B.M. (1979) The indirect role of 2,4-D in the maintenance of apical dominance in decapitated sunflower seedlings (*Helianthus annuus* L.). *Planta*, **146**, 475–480.
- Bucher, M. (2007) Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytol*, **173**, 11-26.
- Buée, M., Rossignol, M., Jauneau, A., Ranjeva, R. and Becard, G. (2000) The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Mol Plant Microbe Interact*, **13**, 693-698.
- Busch, M., Seuter, A. and Rudiger, H. (2002) Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in Tobacco. *Plant Physiol*, **128**, 439–453.
- Camara, B. and Bouvier, F. (2004) Oxidative remodeling of plastid carotenoids. *Arch Biochem Biophys*, **430**, 16-21.
- Cardenas, L., Holdaway-Clarke, T.L., Sanchez, F., Quinto, C., Feijo, J.A., Kunkel, J.G. and Hepler, P.K. (2000) Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors. *Plant Physiol*, **123**, 443-452.
- Chow, B. and McCourt, P. (2006) Plant hormone receptors: perception is everything. *Genes Dev*, **20**, 1998-2008.
- Cook, C.E., Whichard, L.P., Turner, B., Wall, M.E. and Egley, G.H. (1966) Germination of Witchweed (*Striga lutea* Lour.): Isolation and Properties of a Potent Stimulant. *Science*, **154**, 1189-1190.
- David-Schwartz, R., Badani, H., Smadar, W., Levy, A.A., Galili, G. and Kapulnik, Y. (2001) Identification of a novel genetically controlled step in mycorrhizal colonization: plant resistance to infection by fungal spores but not extra-radical hyphae. *Plant J*, **27**, 561-569.
- Debelle, F., Moulin, L., Mangin, B., Dénarié, J. and Boivin, C. (2001) Nod genes and Nod signals and the evolution of the rhizobium legume symbiosis. *Acta Biochim Pol*, **48**, 359–365.
- Decker, E.L., Frank, W., Sarnighausen, E. and Reski, R. (2006) Moss systems biology en route : phytohormones in *Physcomitrella* development. *Plant Biol (Stuttg)*, **8**, 397-406.
- Doust, A. (2007) Architectural evolution and its implications for domestication in grasses. *Ann Bot (Lond)*, **100**, 941-950.
- Dun, E.A., Ferguson, B.J. and Beveridge, C.A. (2006) Apical dominance and shoot branching. Divergent opinions or divergent mechanisms? *Plant Physiol*, **142**, 812–819.
- Everat-Bourbouloux, A. and Bonnemain, J.-L. (1980) Distribution of labelled auxin and derivatives in stem tissues of intact and decapitated broad-bean plants in relation to apical dominance. *Physiol Plant*, **50**, 145–152.
- Fernandez-Aparicio, M., Perez-de-Luque, A., Prats, E. and Rubiales, D. (2008) Variability of interactions between barrel medic (*Medicago truncatula*) genotypes and *Orobanche* species. *Ann Appl Biol*, **153**, 117–126.
- Fester, T. and Hause, B. (2007) Drought and symbiosis – why is abscisic acid necessary for arbuscular mycorrhiza? *New Phytol*, **175**, 383-386.

- Fester, T., Schmidt, D., Lohse, S., Walter, M., Giuliano, G., Bramley, P., Fraser, P., Hause, B. and Strack, D. (2002) Stimulation of carotenoid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots. *Planta*, **216**, 148-154.
- Fitter, A. (1996) *Characteristics and functions of root systems*. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Foo, E., Bullier, E., Goussot, M., Foucher, F., Rameau, C. and Beveridge, C. (2005) The branching gene RAMOSUS1 mediates interactions among two novel signals and auxin in Pea. *Plant Cell*, **17**, 464-474.
- Foo, E., Turnbull, C. and Beveridge, C. (2001) Long-distance signaling and the control of branching in the *rms1* mutant of pea. *Plant Physiol*, **126**, 203-209.
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P. and Barker, D.G. (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell*, **17**, 3489-3499.
- Giovannetti, M. and Mosse, B. (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular infection in roots. *New Phytol*, **84**, 489-500.
- Giovannetti, M., Sbrana, C., Avio, L., Citernesi, A.S. and Logi, C. (1993) Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytol*, **125**, 587-593.
- Giovannetti, M., Sbrana, C., Citernesi, A.S. and Avio, L. (1996) Analysis of factors involved in fungal recognition responses to host-derived signals by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol*, **133**, 65-71.
- Goldwasser, Y., Yoneyama, K., Xie, X. and Yoneyama, K. (2008) Production of Strigolactones by *Arabidopsis thaliana* responsible for *Orobancha aegyptiaca* seed germination. *J Plant Growth Regul*, **55**, 21-28.
- Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P.B., Puech-Pages, V., Dun, E.A., Pillot, J.P., Letisse, F., Matusova, R., Danoun, S., Portais, J.C., Bouwmeester, H., Becard, G., Beveridge, C.A., Rameau, C. and Rochange, S.F. (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, **455**, 189-194.
- Gomez-Roldan, V., Roux, C., Girard, D., Bécard, G. and Puech-Pages, V. (2007) Strigolactones, promising plant signals. *Plant Signal & Behav*, **2**, 163-164.
- Harrison, M.J. (2005) Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Microbiol*, **59**, 19-42.
- Hauck, C., Müller, S. and Schildknecht, H. (1992) A germination stimulant for parasitic flowering plants from *Sorghum bicolor*, a genuine host plant. *J Plant Physiol*, **139**, 474-478.
- Hause, B. and Fester, T. (2005) Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Planta*, **221**, 184-196.
- Hause, B., Mrosk, C., Isayenkov, S. and Strack, D. (2007) Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochemistry*, **68**, 101-110.

- Helber, N. and Requena, N. (2008) Expression of the fluorescence markers DsRed and GFP fused to a nuclear localization signal in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol*, **177**, 537-548.
- Herrera-Medina, M.J., Steinkellner S, Vierheilig, H., Ocampo-Bote, J.A. and García-Garrido, J.M. (2007) Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in tomato arbuscular mycorrhiza. *New Phytol*, **175**, 554–564.
- Hirsch, A.M., Bauer, W.D., Bird, D.M., Cullimore, J., Tyler, B. and Yoder, J.I. (2003) Molecular signals and receptors: Controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecology*, **84**, 858–868.
- Hoffland, E., Findenegg, G. and al, e. (1992) Biosynthesis and root exudation of citric and malic acids in phosphate-starved rape plants. *New Phytol*, **122**, 675-680.
- Humphrey, A.J. and Beale, M.H. (2006) Strigol: biogenesis and physiological activity. *Phytochemistry*, **67**, 636-640.
- Humphrey, A.J., Galster, A.M. and Beale, M.H. (2006) Strigolactones in chemical ecology: waste products or vital allelochemicals? *Nat Prod Rep*, **23**, 592-614.
- Ishikawa, S., Maekawa, M., Arite, T., Onishi, K., Takamura, I. and Kyojuka, J. (2005) Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice. *Plant Cell Physiol*, **46**, 79-86.
- Johnson, J.F., Allan, D.L. and Vance, C.P. (1994) Phosphorus stress-induced proteoid roots show altered metabolism in *Lupinus albus*. *Plant Physiol*, **104**, 657-665.
- Johnson, X., Brcich, T., Dun, E.A., Goussot, M., Haurogne, K., Beveridge, C.A. and Rameau, C. (2006) Branching genes are conserved across species. Genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals. *Plant Physiol*, **142**, 1014-1026.
- Keyes, W.J., O'Malley, R.C., Kim, D. and Lynn, D.G. (2000) Signaling organogenesis in parasitic angiosperms: xenognosin generation, perception, and response. *J Plant Growth Regul*, **19**, 217–231.
- Kistner, C. and Parniske, M. (2002) Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *Trends Plant Sci*, **7**, 511-518.
- Kosuta, S., Chabaud, M., Lougnon, G., Gough, C., Denarie, J., Barker, D.G. and Becard, G. (2003) A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol*, **131**, 952-962.
- Kuhn, G., Hijri, M. and Sanders, I.R. (2001) Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, **414**, 745-748.
- Lazar, G. and Goodman, H.M. (2006) MAX1, a regulator of the flavonoid pathway, controls vegetative axillary bud outgrowth in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 472-476.
- Lenzemo, V., Kuyper, T.W., Matusova, R., de Vos, C.H., Bouwmeester, H.J., Narvaez, L. and van Ast, A. (2007) Colonization by arbuscular mycorrhizal fungi of sorghum leads to reduced germination and subsequent attachment and emergence of *Striga hermonthica*. *Plant Signal Behav*, **2**, 58–62.

- Lenzemo, V.W., Kuypers, T.W., Kropff, M.J. and van Ast, A. (2005) Field inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi reduces *Striga hermonthica* performance on cereal crops and has the potential to contribute to integrated *Striga* management. *Field Crops Research*, **91**, 51–61.
- Lopez-Raez, J.A., Charnikhova, T., Gomez-Roldan, V., Matusova, R., Kohlen, W., De Vos, R., Verstappen, F., Puech-Pages, V., Becard, G., Mulder, P. and Bouwmeester, H. (2008) Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytol*, **178**, 863-874.
- Mangnus, E.M. and Zwanenburg, B. (1992) Tentative molecular mechanism for germination stimulation of *Striga* and *Orobanche* seeds by strigol and its synthetic analogues. *J Agric Food Chem*, **40**, 1066–1070.
- Marasco, E.K., Vay, K. and Schmidt-Dannert, C. (2006) Identification of carotenoid cleavage dioxygenases from *Nostoc* sp. PCC 7120 with different cleavage activities. *J Biol Chem*, **281**, 31583-31593.
- Marsh, J.-F. and Schultze, M. (2001) Analysis of arbuscular mycorrhizas using symbiosis-defective plant mutants. *New Phytol*, **150**, 525–532.
- Matusova, R. and Bouwmeester, H.J. (2006) Chemical ecology : from gene to ecosystem. In Dicke, M. and Takken, W. (eds.), The Netherlands, pp. 39-54.
- Matusova, R., Rani, K., Verstappen, F.W., Franssen, M.C., Beale, M.H. and Bouwmeester, H.J. (2005) The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanche* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiol*, **139**, 920-934.
- Meixner, C., Ludwig-Muller, J., Miersch, O., Gresshoff, P., Staehelin, C. and Vierheilig, H. (2005) Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supernodulating soybean mutant nts1007. *Planta*, **222**, 709-715.
- Moise, A.R., von Lintig, J. and Palczewski, K. (2005) Related enzymes solve evolutionarily recurrent problems in the metabolism of carotenoids. *Trends Plant Sci*, **10**, 178-186.
- Morris, S., Turnbull, C., Murfet, I. and Beveridge, C. (2001) Mutational Analysis of Branching in Pea. Evidence That *Rms1* and *Rms5* Regulate the Same Novel Signal. *Plant Physiol*, **126**, 1205–1213.
- Mosse, B. and Hepper, C. (1975) Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. *Physiol Plant Pathol*, **5**, 215-223.
- Nagahashi, G. and Douds, D. (2004) Isolated root caps, border cells, and mucilage from host roots stimulate hyphal branching of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora gigantea*. *Mycol Res*, **108**, 1079-1088.
- Nagahashi, G. and Douds, D.D. (1999) A rapid and sensitive bioassay with practical application for studies on interactions between root exudates and arbuscular mycorrhizal fungi. *Biotechnol Tech*, **13**, 893-897.
- Navazio, L., Moscattello, R., Genre, A., Novero, M., Baldan, B., Bonfante, P. and Mariani, P. (2007) A diffusible signal from arbuscular mycorrhizal fungi elicits a transient cytosolic calcium elevation in host plant cells. *Plant Physiol*, **144**, 673-681.

- Ohmiya, A., Kishimoto, S., Aida, R., Yoshioka, S. and K., S. (2006) Carotenoid Cleavage Dioxygenase (CmCCD4a) contributes to white color formation in Chrysanthemum petals. *Plant Physiol*, **142**, 1193–1201.
- Olah, B., Briere, C., Becard, G., Denarie, J. and Gough, C. (2005) Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *Plant J*, **44**, 195-207.
- Ongaro, V. and Leyser, O. (2007) Hormonal control of shoot branching. *J Exp Bot*, **59**, 1-8.
- Parniske, M. (2004) Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr Opin Plant Biol*, **7**, 414-421.
- Paszkowski, U. (2006a) A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses 2006. *New Phytol*, **172**, 35-46.
- Paszkowski, U. (2006b) Mutualism and parasitism: the yin and yang of plant symbioses. *Curr Opin Plant Biol*, **9**, 1-7.
- Paszkowski, U., Jakovleva, L. and Boller, T. (2006) Maize mutants affected at distinct stages of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant J*, **47**, 165-173.
- Pawlowska, T.E. and Taylor, J.W. (2004) Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, **427**, 733-737.
- Penuelas, J. and Munne-Bosch, S. (2005) Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. *Trends Plant Sci*, **10**, 166-169.
- Perry, J., Weir, T.L., Prithviraj, B., Paschke, M.W. and Vivanco, J.M. (2006) Root exudation and Rhizosphere Biology : Multiple functions of a Plant Secondary Metabolite. In Buluska, F., Mancuso, S. and Volkmann, D. (eds.), *Communication in Plants*. Springer, Berlin, pp. 403-417.
- Perry, L.G., Thelen, G.C., Ridenour, W.M., Callaway, R.M., Paschke, M.W. and Vivanco, J.M. (2007) Concentrations of the Allelochemical (+/-)-catechin IN *Centaurea maculosa* soils. *J Chem Ecol*, **33**, 2337-2344.
- Piniór, A., Wyss, U., Piche, Y. and Vierheilig, H. (1999) Plants colonized by AM fungi regulate further root colonization by AM fungi through altered root exudation. *Can J Bot*, **77**, 891–897.
- Pivato, B., Mazurier, S., Lemanceau, P., Siblot, S., Berta, G., Mougél, C. and van Tuinen, D. (2007) *Medicago* species affect the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with roots. *New Phytol*, **176**, 197-210.
- Powell, C.L. (1976) Development of mycorrhizal infection from endogene spores and infected root segments. *Trans Br Mycol Soc*, **66**, 438-445.
- Pozo, M.J. and Azcon-Aguilar, C. (2007) Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Curr Opin Plant Biol*, **10**, 393–398.
- Rani, K., Zwanenburg, B., Sugimoto, Y., Yoneyama, K. and Bouwmeester, H. (2008) Biosynthetic considerations could assist the structure of host plant produced rhizosphere signalling compounds (strigolactones) for abuscular mycorrhizal fungi and parasitic plants. *Plant Physiol Biochem*, **46**, 617-626.

- Reinhardt, D. (2007) Programming good relations — development arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr Opin Plant Biol*, **10**, 1–8.
- 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.
- Requena, N., Serrano, E., Ocon, A. and Breuninger, M. (2006) Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry*, **68**, 33-40.
- Rispail, N., Dita, M.-A., González-Verdejo, C., Pérez-de-Luque, A., Castillejo, M.-A., Prats, E., Román, B., Jorrín, J. and Rubiales, D. (2007) Plant resistance to parasitic plants: molecular approaches to an old foe. *New Phytol*, **173**, 703–712.
- Sato, D., Awad, A.A., Chae, S.H., Yokota, T., Sugimoto, Y., Takeuchi, Y. and Yoneyama, K. (2003) Analysis of strigolactones, germination stimulants for striga and orobanche, by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, **51**, 1162-1168.
- Sawers, R., Gutjahr, C. and Paszkowski, U. (2008) Cereal mycorrhiza: an ancient symbiosis in modern agriculture. *Trends Plant Sci*, **13**, 93-97.
- Scervino, J.M., Ponce, M.A., Erra-Bassells, R., Bompadre, J., Vierheilig, H., Ocampo, J.A. and Godeas, A. (2007) The effect of flavones and flavonols on colonization of tomato plants by arbuscular mycorrhizal fungi of the genera *Gigaspora* and *Glomus*. *Can J Microbiol*, **53**, 702-709.
- Scervino, J.M., Ponce, M.A., Erra-Bassells, R., Vierheilig, H., Ocampo, J.A. and Godeas, A. (2005) Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth of *Gigaspora* and *Glomus*. *Mycol Res*, **109**, 789-794.
- Schachtschabel, D., Schimek, C., Wostemeyer, J. and Boland, W. (2005) Biological activity of trisporoids and trisporoid analogues in *Mucor mucedo* (-). *Phytochemistry*, **66**, 1358-1365.
- Schlicht, M., Samajova, O., Schachtschabel, D., Mancuso, S., Menzel, D., Boland, W. and Baluska, F. (2008) D'orenone blocks polarized tip growth of root hairs by interfering with the PIN2-mediated auxin transport network in the root apex. *Plant J*, **55**, 709-717.
- Schmid, H., Kurtzer, R., Eisenreich, W. and Schwab, W. (2006) The Carotenase AtCCD1 from *Arabidopsis thaliana* is a Dioxygenase. *J Biol Chem*, **281**, 9845-9851.
- Schreiner, R.P. and Koide, R.T. (1993) Stimulation of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi by Mycotrophic and Nonmycotrophic Plant Root Systems. *Appl Environ Microbiol*, **59**, 2750-2752.
- Schüßler, A., Schwarzott, D. and Walker, C. (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res*, **105**, 1413-1421.
- Schwartz, S., Qin, X. and Loewen, M.C. (2004) The biochemical characterization of two Carotenoid Cleavage Enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. *J Biol Chem*, **279**, 46940-46945.
- Smith, S.S. and Read, D.J. (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press.

- Sorefan, K., Booker, J., Haurogne, K., Goussot, M., Bainbridge, K., Foo, E., Chatfield, S., Ward, S., Beveridge, C., Rameau, C. and Leyser, O. (2003) MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in Arabidopsis and pea. *Genes Dev*, **17**, 1469–1474.
- Steinkellner, S., Lenzemo, V., Langer, I., Schweiger, P., Khaosaad, T., Toussaint, J.P. and Vierheilig, H. (2007) Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant-fungus interactions. *Molecules*, **12**, 1290-1306.
- Stirnberg, P., Furner, I.J. and Ottoline Leyser, H.M. (2007) MAX2 participates in an SCF complex which acts locally at the node to suppress shoot branching. *Plant J*, **50**, 80-94.
- Strack, D. and Fester, T. (2006) Isoprenoid metabolism and plastid reorganization in arbuscular mycorrhizal roots. *New Phytol*, **172**, 22-34.
- Strack, D., Fester, T., Hause, B., Schliemann, W. and Walter, M.H. (2003) Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical, and molecular aspects. *J Chem Ecol*, **29**, 1955-1979.
- Stukenbrock, E.H. and Rosendahl, S. (2005) Development and amplification of multiple co-dominant genetic markers from single spores of arbuscular mycorrhizal fungi by nested multiplex PCR. *Fungal Genet Biol*, **42**, 73-80.
- Tamasloukht, M., Séjalon-Delmas, N., Kluever, A., Jauneau, A. and Roux, C. (2003) Root factors induce mitochondrial-related gene expression and fungal respiration during the developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Plant Physiol*, **131**, 1468–1478.
- Thimann, K.V. and Skoog, F. (1933) Studies on the growth hormone of plants: III. The inhibiting action of the growth substance on bud development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **19**, 714-716.
- Trouvelot, A. and Kough, J.L. (1986) Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In Gianinazzi-Pearson, V. and Gianinazzi, S. (eds.), *Mycorrhizae: physiology and genetics*. CNRS-INRA, Dijon, p. 217–221.
- Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., Magome, H., Kamiya, Y., Shirasu, K., Yoneyama, K., Kyoizuka, J. and Yamaguchi, S. (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*, **455**, 195-200.
- Vierheilig, H., Maier, W., Wyss, U., Samson, J., Strack, D. and Piché, Y. (2000) Cyclohexenone derivative - and phosphate - levels in split-root systems and their role in the systemic suppression of mycorrhization in precolonized barley plants. *Plant Physiol*, **157**, 593–599.
- Vierheilig, H. and Piche, Y. (2002) Signalling in arbuscular mycorrhiza: facts and hypotheses. *Adv Exp Med Biol*, **505**, 23-39.
- Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E. and Vivanco, J.M. (2003) Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol*, **132**, 44-51.
- Walter, M.H., Fester, T. and Strack, D. (2000) Arbuscular mycorrhizal fungi induce the non-mevalonate methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis correlated with accumulation of the 'yellow pigment' and other apocarotenoids. *Plant J*, **21**, 571-578.

- Walter, M.H., Flo, D.S., Hans, J., Fester, T. and D., S. (2007) Apocarotenoid biosynthesis in arbuscular mycorrhizal roots: Contributions from methylerythritol phosphate pathway isogenes and tools for its manipulation. *Phytochemistry*, **68**, 130–138.
- Weidmann, S., Sanchez, L., Descombin, J., Chatagnier, O., Gianinazzi, S. and Gianinazzi-Pearson, V. (2004) Fungal elicitation of signal transduction-related plant genes precedes mycorrhiza establishment and requires the *dmi3* gene in *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact*, **17**, 1385-1393.
- Wigchert, S.C., Kuiper, E., Boelhouwer, G.J., Nefkens, G.H., Verkleij, J.A. and Zwanenburg, B. (1999) Dose-response of seeds of the parasitic weeds *Striga* and *Orobanche* toward the synthetic germination stimulants GR 24 and Nijmegen 1. *J Agric Food Chem*, **47**, 1705-1710.
- Yao, J. and Allen, C. (2006) Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol*, **188**, 3697-3708.
- Yoder, J.I. (1999) Parasitic plant responses to host plant signals: a model for subterranean plant-plant interactions. *Curr Opin Plant Biol*, **2**, 65-70.
- Yoneyama, K., Takeuchi, Y. and Sekimoto, H. (2007) Phosphorus deficiency in red clover promotes exudation of orobanchol, the signal for mycorrhizal symbionts and germination stimulant for root parasites. *Planta*, **225**, 1031-1038.
- Yoneyama, K., Xie, X., Sekimoto, H., Takeuchi, Y., Ogasawara, S., Akiyama, K. and Hayashi, H. (2008) Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from Fabaceae plants. *New Phytol*, **179**, 484 - 494.
- Zhang, X.H., Lin, A.J., Chen, B.D., Wang, Y.S., Smith, S.E. and Smith, F.A. (2006) Effects of *Glomus mosseae* on the toxicity of heavy metals to *Vicia faba*. *J Environ Sci (China)*, **18**, 721-726.
- Zhongkui, S., Hans, J., Walter, M., Matusova, R., Beekwilder, J., Vestappen, F., Ming, Z., Ehtelt, E., Strack, D., Bisseling, T. and Bouwmeester, H. (2008) Cloning and characterisation of a maize carotenoid cleavage dioxygenase (*ZmCCD1*) and its involvement in the biosynthesis of apocarotenoids with various roles in mutualistic and parasitic interactions. *Planta*, **228**, 789-801.
- Zou, J., Chen, Z., Zhang, S., Zhang, W., Jiang, G., Zhao, X., Zhai, W., Pan, X. and Zhu, L. (2005) Characterizations and fine mapping of a mutant gene for high tillering and dwarf in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, **222**, 604-612.