



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :  
Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

Présentée et soutenue par :  
**Jérôme LAPARRE**

Le 21 septembre 2012

Titre :  
Elaboration d'une stratégie analytique pour l'identification de métabolites clés impliqués dans la symbiose mycorhizienne entre *Rhizophagus irregularis*-*Medicago truncatula*

---

Ecole doctorale et spécialité :  
**ED SEVAB : Interactions plantes-microorganismes**

Unité de recherche :  
**Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales - UMR5546 CNRS-UPS**  
**Laboratoire d'ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (UMR INSA-CNRS**  
**5504, INSA 792, Toulouse)**

Jury :  
**Pr. Guillaume BECARD**  
**Pr. Alain BOUCHEREAU**  
**Dr Eliane DUMAS-GAUDOT**  
**Dr. Annick MOING**  
**Pr. Jean-Charles PORTAIS**

Co-directeurs de thèse : le Pr. Guillaume BECARD et le Pr. Jean-Charles PORTAIS



## **Remerciements**

Je remercie très sincèrement toutes les personnes qui m'ont encadré et soutenu durant cette aventure qu'a été cette thèse. Elle a débuté par un accueil chaleureux des Professeurs Guillaume Bécard et Jean-Charles Portais dans leur équipe respective. Elle s'est poursuivie au cours de ces années par un encadrement au quotidien par Virginie Puech-Pagès et Fabien Létisse. Je tiens à témoigner tout particulièrement ma reconnaissance à mes quatre encadrants pour leur disponibilité, leur rigueur scientifique, leurs précieux conseils et la confiance qu'ils m'ont témoignée tout au long cette thèse me permettant de travailler dans les meilleures conditions possibles. Je tiens à remercier également Saida Danoun et Sylvie Fournier pour leur aide précieuse dans l'utilisation du spectromètre de masse, leur sympathie et nos discussions passionnées sur la spectrométrie de masse. Merci à tous les collègues des deux laboratoires qui m'ont rendu de précieux services et qui m'ont apporté de la bonne humeur au quotidien.

J'exprime également ma reconnaissance aux directrices de recherches Eliane DUMAS-GAUDOT et Annick MOING ainsi que le Professeur Alain BOUCHEREAU pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'évaluer mon travail de thèse.

## **Remerciements**

Je remercie très sincèrement toutes les personnes qui m'ont encadré et soutenu durant cette aventure qu'a été cette thèse. Elle a débuté par un accueil chaleureux des Professeurs Guillaume Bécard et Jean-Charles Portais dans leur équipe respective. Elle s'est poursuivie au cours de ces années par un encadrement au quotidien par Virginie Puech-Pagès et Fabien Létisse. Je tiens à témoigner tout particulièrement ma reconnaissance à mes quatre encadrants pour leur disponibilité, leur rigueur scientifique, leurs précieux conseils et la confiance qu'ils m'ont témoignée tout au long cette thèse me permettant de travailler dans les meilleures conditions possibles. Je tiens à remercier également Saida Danoun et Sylvie Fournier pour leur aide précieuse dans l'utilisation du spectromètre de masse, leur sympathie et nos discussions passionnées sur la spectrométrie de masse. Merci à tous les collègues des deux laboratoires qui m'ont rendu de précieux services et qui m'ont apporté de la bonne humeur au quotidien.

J'exprime également ma reconnaissance aux directrices de recherches Eliane DUMAS-GAUDOT et Annick MOING ainsi que le Professeur Alain BOUCHEREAU pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'évaluer mon travail de thèse.

**Auteur : Jérôme LAPARRE**

**Titre : Elaboration d'une stratégie analytique pour l'identification de métabolites clé impliqués dans la symbiose mycorhizienne entre *Rhizophagus irregularis* et *Medicago truncatula***

Directeurs de thèse : Pr. Guillaume Bécard / Pr. Jean-Charles Portais

### **Résumé.**

La symbiose mycorhizienne à arbuscule (MA) est une interaction bénéfique entre les racines de la plupart des plantes et certains champignons du sol appartenant aux Gloméromycètes. La plante bénéficie d'une meilleure nutrition hydrique et minérale. En échange elle fournit au champignon MA, symbiote obligatoire, sa source de carbone qui lui permet d'accomplir son cycle de vie. Si quelques signaux symbiotiques impliqués dans les phases précoces de la symbiose MA ont été caractérisés ces dernières années, nos connaissances sont très limitées concernant les molécules régulatrices de la symbiose échangées entre les partenaires *in planta*. Dans ce contexte, nous avons élaboré une stratégie analytique dans le but d'identifier des métabolites clés impliqués dans la symbiose mycorhizienne. Nous avons associé une analyse différentielle du métabolome de racines mycorhizées et non mycorhizées à une analyse de l'expression de gènes spécifique de la symbiose mycorhizienne. L'analyse métabolique couplant la chromatographie liquide ultra performante (UPLC) et la spectrométrie de masse haute résolution (Q-TOF) avec des analyses statistiques non supervisées de type OPLS-DA, a permis de mettre en évidence 71 métabolites au moins 10 fois plus présents dans les racines mycorhizées. Parmi ces métabolites une cinquantaine n'avait jamais été identifiée comme caractéristiques de la mycorhization, dont la propionyl-carnitine. Quant à l'analyse transcriptomique, elle avait pour but de sélectionner parmi ces métabolites criblés ceux pouvant avoir un rôle de signaux régulateurs de la symbiose, reflété par leur activité sur le transcriptome du champignon MA. Nous avons réalisé une analyse de l'expression de gènes spécifiques de la symbiose sur des spores de *Rhizophagus irregularis* stimulées par des extraits racinaires fractionnés par HPLC. Par la complémentarité des deux analyses (transcriptomique et métabolique), les métabolites davantage présents dans les racines mycorhizées et détectés dans les fractions HPLC qui modulent l'expression de gènes fongiques sont identifiés comme des candidats potentiels.

## Table des matières

<b>Table des matières</b>	<b>1</b>
<b>1 INTRODUCTION</b>	<b>4</b>
<b>1.1. Présentation générale des Mycorhizes</b>	<b>4</b>
1.1.1. Les plantes et leur environnement	4
1.1.2. La symbiose mycorhizienne à arbuscule	5
<b>1.2. Les différentes phases de la symbiose MA</b>	<b>8</b>
1.2.2. La phase pré-symbiotique	9
1.2.3. La phase symbiotique	14
1.2.3.1. Réorganisation cellulaire	14
1.2.3.2. Modulation de l'expression génique	15
1.2.3.2.1. Chez la plante	15
1.2.3.2.2. Chez le champignon MA	16
1.2.3.3. Le protéome	17
1.2.3.3.1. Chez la plante	17
1.2.3.3.2. Chez le champignon MA	18
1.2.3.4. Modification métabolique	18
1.2.3.4.1. Chez la plante	18
1.2.3.4.2. Chez le champignon MA	23
1.2.3.5. Signaux et facteurs de régulation pendant la symbiose MA	25
1.2.3.5.1. La lyso-phosphatidylcholine	25
1.2.3.5.2. Hormones végétales	25
1.2.3.5.3. Les microARN	26
1.2.3.6. L'autorégulation de la symbiose par la plante	27
1.2.3.6.1. Les CLE peptides	27
<b>1.3. Objectif des travaux de thèse</b>	<b>28</b>
<b>2. CHAPITRE 1 : DEVELOPPEMENT DES METHODES</b>	<b>31</b>
<b>2.1. La culture</b>	<b>31</b>
2.1.1. Choix des organismes	31
2.1.2. Culture de <i>M. truncatula</i> en plante entière ou racines stériles	32
2.1.2.1. Culture de racines stériles de <i>M. truncatula</i>	33
2.1.2.2. Amélioration des conditions de culture	34
2.1.3. Durée de la culture	35
<b>2.2. L'analyse différentielle du métabolome</b>	<b>36</b>
2.2.1. Mise en place de l'extraction et de l'échantillonnage	36
2.2.1.1. Exsudation et extraction liquide-liquide	37
2.2.1.2. Extraction des tissus racinaires au méthanol pur	39
2.2.1.3. L'échantillonnage	40
2.2.2. Mise en place de la méthode analytique	40
2.2.2.1. La plateforme analytique	40
2.2.2.2. La chromatographie liquide	42
2.2.2.2.1. Description des principes chromatographiques	42

2.2.2.2.2.	Optimisation des paramètres chromatographiques	46
2.2.2.2.2.1.	Les solvants et le gradient chromatographique	47
2.2.2.2.2.2.	Le débit chromatographique	48
2.2.2.2.2.3.	La température de la colonne	49
2.2.2.3.	La spectrométrie de masse	49
2.2.2.3.1.	Description du fonctionnement des spectromètres et optimisation des paramètres	49
2.2.2.3.1.1.	La source d'ionisation électrospray (ESI)	49
2.2.2.3.1.1.1.	Principe de l'électrospray	50
2.2.2.3.1.1.2.	Le rendement d'ionisation en fonction du solvant	51
2.2.2.3.1.1.3.	Transfert des ions de la source vers le quadripôle	51
2.2.2.3.1.2.	Les analyseurs (quadripôle et TOF)	52
2.2.2.3.1.2.1.	Le quadripôle	52
2.2.2.3.1.2.2.	Le tube à temps de vol (TOF)	52
2.2.2.3.1.3.	La calibration	54
2.2.2.3.1.4.	Contrôle de la qualité des analyses par injection de standards	55
2.2.3.	Traitement des données	56
2.2.3.1.	Détection des pics chromatographiques et intégration	56
2.2.3.2.	Réalignement des pics chromatographiques	57
2.2.3.3.	Normalisation des données	57
2.2.3.4.	Détermination des ions discriminants	58
2.2.3.6.	Utilisation de Markerlynx	59
2.2.4.	Illustration de la méthode d'analyse différentielle du métabolome	60
<b>3.</b>	<b>CHAPITRE 2 : LES RESULTATS</b>	<b>65</b>
<b>3.1.</b>	<b>L'analyse différentielle du métabolome</b>	<b>65</b>
3.1.1.	Sélection des ions les plus discriminants	67
3.1.1.1.	Elimination des faux positifs et des adduits	67
3.1.1.2.	Elimination des ions les moins caractéristiques de la symbiose	68
3.1.1.3.	Elimination des ions d'origine fongique	68
3.1.1.4.	Validation des ions discriminants de faible intensité	69
3.1.2.	Recherche des ions issus d'un même métabolite	71
3.1.3.	Utilisation d'un appareil de plus haute résolution	75
3.1.4.	Bilan de l'analyse différentielle du métabolome	76
<b>3.2.</b>	<b>Couplage d'une approche de métabolomique et d'une analyse d'expression génique</b>	<b>83</b>
3.2.1.	L'analyse d'expression génique	83
3.2.1.1.	Principes et objectifs	83
3.2.1.2.	La méthodologie utilisée	83
3.2.1.3.	Résultats de l'analyse d'expression génique	85
3.2.1.4.	l'identification des métabolites discriminants dans les fractions	88
3.2.1.5.	La propionyl-carnitine	89
<b>4.</b>	<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>90</b>
<b>4.1.</b>	<b>La méthodologie</b>	<b>91</b>
4.1.1.	L'extraction et l'échantillonnage	91
4.1.2.	La gamme dynamique des concentrations en métabolites	92
4.1.3.	Le traitement des données	93

<b>4.2. Les résultats de l'analyse du métabolome</b>	<b>94</b>
4.2.1. Identification structurale des métabolites, un défi majeur chez les végétaux	95
4.2.1.1. L'apport de la précision de masse	96
4.2.1.2. L'apport du profil isotopique dans la génération de formule brute	97
4.2.1.3. Les différentes difficultés dans l'indentification structurale	98
4.2.2. Utilisation d'une stratégie originale	100
4.2.2.1. La propionyl-carnitine	103
<b>4.3. Les perspectives à plus long terme</b>	<b>104</b>
<b>4.4. Conclusions</b>	<b>105</b>
<b>5. ANNEXES</b>	<b>107</b>
<b>5.1. Matériels et méthodes</b>	<b>107</b>
5.1.1. Culture des racines et mise en germination du champignon MA	107
5.1.1.1. Culture de racines mycorhizées et non mycorhizées	107
5.1.1.2. La germination de spores du champignon MA	107
5.1.2. Extraction et quantification du taux de mycorhization	108
5.1.2.1. Quantification du taux de mycorhization	108
5.1.2.2. Extraction des racines	108
5.1.2.2.1. Pour l'analyse du métabolome	108
5.1.2.2.2. Pour l'analyse transcriptomique	109
5.1.2.3. Extraction de <i>Rhizophagus irregularis</i>	109
5.1.3. Analyse par LC-MS	109
5.1.3.1. Reprise des échantillons	109
5.1.3.2. Analyse par UPLC-Q-TOF (Waters)	110
5.1.3.3. Analyse par UHPLC-Q-TOF (Bruker Daltonics)	111
5.1.3.4. Génération de formules brutes	111
5.1.4. Traitements des données	111
5.1.5. Constitution des fractions par HPLC préparative	112
5.1.6. Stimulation des spores pré germées de <i>Rhizophagus irregularis</i>	112
5.1.6.1. Par les fractions issus des extraits racinaires	112
5.1.6.2. Par la propionyl-carnitine	113
5.1.7. Analyse transcriptomique	113
<b>5.2. Liste des gènes utilisés pour l'analyse transcriptomique</b>	<b>115</b>
<b>5.3. Données des analyses métabolomiques</b>	<b>119</b>
<b>5.4. Références bibliographiques</b>	<b>123</b>

# **1 INTRODUCTION**

## **1.1. Présentation générale des Mycorhizes**

### **1.1.1. Les plantes et leur environnement**

Les plantes sont des organismes phototrophes. Elles produisent leur propre matière organique à partir de dioxyde de carbone fixé par leurs parties aériennes grâce à la photosynthèse et aux sels minéraux puisés dans le sol *via* leurs racines. La disponibilité en eau et en sels minéraux du sol ainsi que la présence de lumière sont donc des facteurs environnementaux essentiels au développement des plantes. Les sols sont en général riches en phosphate mais celui-ci est souvent complexé avec d'autres particules ou éléments comme le fer, le rendant non absorbable par les racines. Afin de rendre le phosphate assimilable, les racines exsudent des acides organiques qui jouent le rôle de chélateurs en se complexant avec les éléments tels que le fer pour libérer le phosphate (Bais *et al.*, 2006). Une caractéristique des végétaux est leur immobilité, et cette inaptitude à se mouvoir est compensée par une grande capacité d'adaptation à l'environnement. Les plantes sécrètent de nombreuses molécules afin de modifier les propriétés physico-chimiques du sol et rendre les nutriments contenus dans celui-ci plus accessibles. La rhizosphère, région du sol à proximité des racines, est très riche en molécules organiques issues des sécrétions de la plante ou de la dégradation de certains tissus (débris cellulaires et mucilage). Ce phénomène, appelé rhizodéposition, profite ainsi à divers organismes et permet la prolifération d'une grande diversité d'espèces : plantes, champignons, bactéries et animaux (Shaw *et al.*, 2006). Une multitude d'interactions est observée entre les plantes et les microorganismes du sol, allant de la symbiose au parasitisme. Les composés exsudés par les racines sont principalement des métabolites secondaires qui représentent plus de 200 000 molécules décrites dans la littérature (Dixon, 2001a). Ces molécules jouent un rôle majeur dans les interactions plantes-microorganismes, notamment dans les processus de défense, certaines ayant des propriétés antifongiques ou antibactériennes (Bais *et al.*, 2004). Parmi les interactions symbiotiques, hautement bénéfiques pour les plantes, les plus connues

sont les symbioses fixatrices d'azote et les symbioses mycorhiziennes. Dans notre étude nous allons nous intéresser plus particulièrement à la symbiose mycorhizienne à arbuscule (MA).

### **1.1.2. La symbiose mycorhizienne à arbuscule**

Une symbiose est une association durable, à bénéfice mutuel, entre deux organismes d'espèces différentes. L'origine étymologique du mot « mycorhize » provient du grec myco (champignon) et rhiza (racine). La symbiose mycorhizienne résulte en effet de l'association entre certains champignons du sol et les racines des plantes. On distingue deux grands types de symbioses mycorhiziennes, définis par les relations physio-anatomiques qui s'établissent entre les deux partenaires. D'abord les ectomycorhizes concernent un grand nombre d'espèces ligneuses et plusieurs milliers d'espèces de champignons, principalement basidiomycètes. Le mycélium du champignon forme un manchon autour de la racine. Ses hyphes pénètrent également dans les tissus racinaires périphériques, en se développant entre les cellules, pour former une interface symbiotique appelé « réseau de Hartig » (Nehls, 2008). Ensuite les champignons ectomycorhiziens ne traversent pas la paroi des cellules végétales contrairement aux champignons endomycorhiziens dont les plus répandus sont les champignons mycorhiziens à arbuscules (MA) (Figure 1-1).

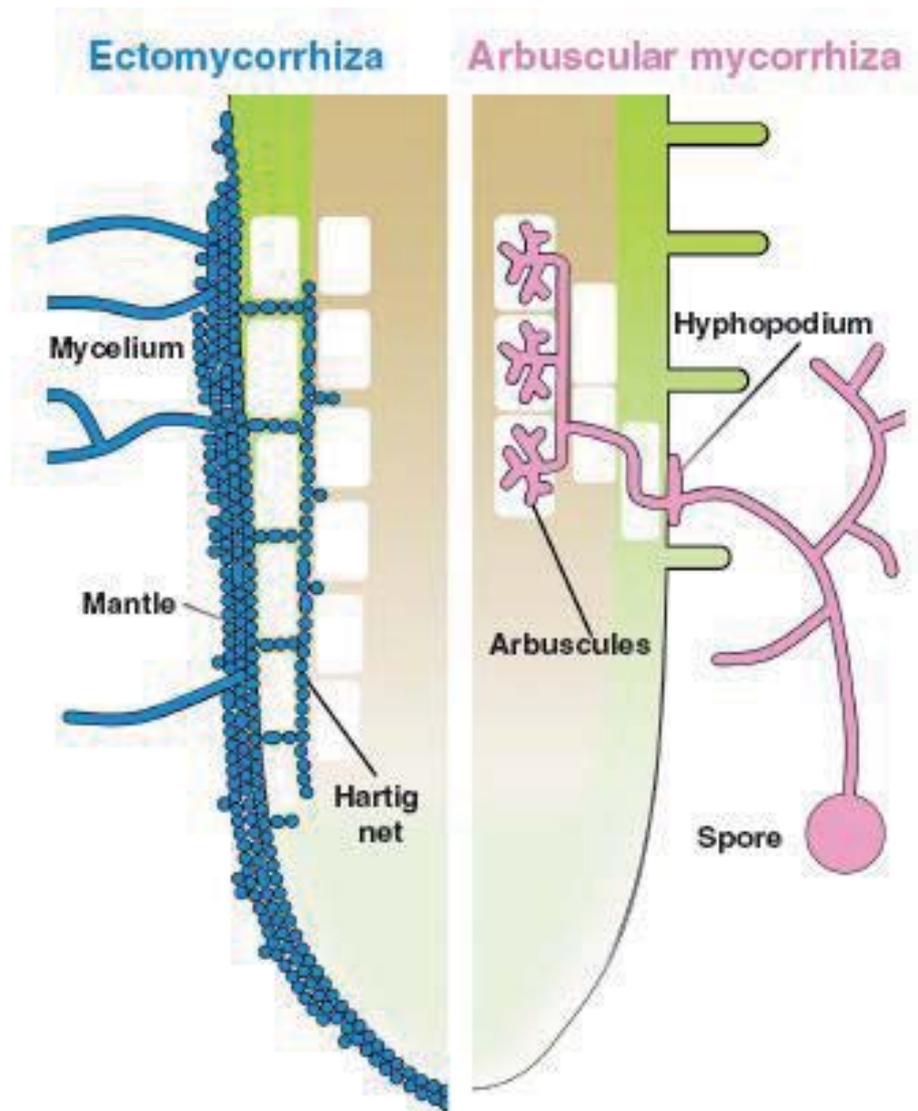


Figure 1-1 Comparaison de la colonisation des racines par les ectomycorhizes (en bleu) et les endomycorhizes à arbuscules (en rose) (Bonfante & Genre, 2010).

Le champignon ectomycorhizien enveloppe la racine en formant un manteau d'hyphes. Entre les cellules de l'épiderme se forme le réseau de Hartig. Le champignon endomycorhizien à arbuscules passe à travers les cellules de l'épiderme pour atteindre le cortex où il forme les arbuscules, des structures très ramifiées.

Les champignons MA appartiennent au groupe des glomérômycètes (Redecker *et al.*, 2006), dont on a décrit à ce jour environ 200 espèces (Schüßler *et al.*, 2001).

Les premières traces de la symbiose MA remontent à 400 millions d'années avec la découverte de fossiles de plantes présentant dans leurs tissus les mêmes structures fongiques que celles observées aujourd'hui dans les racines des plantes contemporaines (Remy *et al.*, 1994). Ces observations confirment une étude moléculaire datant les champignons MA de -353 à -462 millions d'années (Simon *et al.*, 1993). L'apparition des champignons MA et les premières traces de la symbiose

endomycorhizienne coïncideraient avec le début de la colonisation du milieu terrestre par les plantes. Environ 80% des plantes terrestres sont aujourd'hui mycotrophes, une conséquence probable de la coévolution entre plante et champignon MA (Kistner et Parniske, 2002). Chez les familles de plantes non mycotrophes, on trouve les Brassicaceae dont fait partie *Arabidopsis thaliana*. Cette plante modèle ne peut donc pas être utilisée pour l'étude de la symbiose mycorhizienne, par conséquent nos différents travaux ont été effectués avec *Medicago truncatula* une autre plante modèle utilisée pour l'étude des symbioses racinaires.

Après la formation d'un hyphopodium à la surface de la racine, le champignon colonise le cortex racinaire. Il se développe entre les cellules corticales puis les hyphes traversent les parois cellulaires, se ramifient et forment des structures intracellulaires appelées arbuscules (du latin arbusculum : arbuste). C'est le lieu privilégié d'échange de nutriments entre les deux partenaires. Le champignon peut consommer jusqu'à 20% des produits de la photosynthèse sous forme de carbohydrates (Solaimanand et Saito, 1997; Bago et al., 2000; Bago et al., 2003). En contrepartie il fournit à sa plante hôte, grâce à son mycélium extra racinaire (Finlay, 2008), des sels minéraux mais également de l'eau (Harrison, 2005a). Les champignons MA peuvent former jusqu'à 100 mètres d'hyphes par centimètre cube de sol (Miller et al., 1995). En plus d'améliorer considérablement la nutrition hydrique et minérale des plantes, la symbiose MA contribue également à augmenter leur tolérance à différents stress abiotiques comme le stress salin (Aroca et al., 2007; Evelin et al., 2009) et le stress aux métaux lourds (Hildebrandt et al., 2007). Elle leur permet aussi de résister plus efficacement à certains agents pathogènes. Plusieurs études ont montré chez les plantes mycorhizées une diminution des dommages causés par certains microorganismes fongiques et bactériens ainsi que par des nématodes (Whipps, 2004; De La Peña et al., 2006). Ces effets peuvent être associés à une induction locale et systémique de l'expression de certains gènes de défense (Liu et al., 2007), parfois corrélée à une augmentation de la concentration en acide jasmonique (Hause et al., 2002). Les champignons MA stimuleraient les réactions de défense des plantes les rendant ainsi plus résistantes à d'éventuels pathogènes (Pozo et Azcon-Aguilar, 2007). Ces phénomènes de plus grande résistance ou tolérance dépendent cependant (i) des champignons MA qui colonisent la plante (ii) des agents pathogènes (iii) des différentes conditions

environnementales ainsi que de la composition biotique de la rhizosphère (Azcon-Aguilar *et Barea*, 1997; Whipps, 2004).

Une publication récente définit la symbiose endomycorhizienne comme une coopération réciproque, avec des échanges de nutriments et des contrôles bidirectionnels. Les partenaires qui offrent les meilleurs flux d'échange sont récompensés, ceux qui permettent d'apporter le maximum de bénéfices en fonction de l'environnement sont favorisés (Kiers *et al.*, 2011). Selosse et Rousset emploient le terme de "biological markets" pour définir la relation qui unit la plante et le champignon MA et leur capacité à changer de partenaires en fonction des bénéfices apportés (Sélosse *et Rousset*, 2011).

### **1.2. Les différentes phases de la symbiose MA**

L'établissement de la symbiose MA peut se décrire en trois phases distinctes. La phase non symbiotique où les deux partenaires ne sont pas encore en interaction. La phase pré-symbiotique où chaque partenaire perçoit la présence de l'autre, et se prépare à l'association symbiotique. Enfin la phase symbiotique qui conduira à la synthèse des structures d'échanges nutritionnels entre les deux partenaires.

#### **1.2.1. La phase non symbiotique**

Les spores de champignons MA sont capables de germer spontanément, si les conditions physico-chimiques sont favorables, en absence de plante hôte. Mais dans ces conditions, la croissance des hyphes germinatifs sera extrêmement limitée et cessera après quelques jours. Le cytoplasme des hyphes germinatifs se rétractera jusqu'à retourner dans la spore (Logi *et al.*, 1998). Pendant cette phase le champignon a une respiration réduite et consomme très peu ses réserves (Bécard *et al.* 2004). Ce processus permet de maintenir la viabilité et la capacité de la spore à germer à nouveau pour éventuellement coloniser les racines d'une plante à proximité. C'est une manifestation de la biotrophie obligatoire des champignons MA.

Ces organismes ne peuvent en effet se développer significativement qu'à partir de carbone fournit par une plante hôte.

### 1.2.2. La phase pré-symbiotique

Lors de cette phase, les deux partenaires ne sont pas encore en contact physique, mais commencent à interagir. Chaque partenaire décèle la présence de l'autre par l'intermédiaire de signaux moléculaires diffusibles. Ces signaux déclenchent chez les deux partenaires des modifications d'expression de gènes, une reprogrammation génétique nécessaire à l'établissement des structures symbiotiques (Bécard *et al.*, 2004).

Les plantes produisent notamment dans leurs exsudats racinaires des molécules capables de stimuler la germination des spores et/ou la prolifération cellulaire des champignons MA (Buée *et al.*, 2000; Sbrana *et* Giovannetti, 2005). Parmi ces molécules, on trouve les strigolactones (Akiyama *et al.*, 2005; Besserer *et al.*, 2006). Ce sont des apocaroténoïdes à très forte activité biologique capables d'activer en quelques minutes, et à des concentrations inférieures au nano-molaire, le métabolisme mitochondrial du partenaire fongique (Besserer *et al.*, 2006; Besserer *et al.*, 2008; Besserer *et al.*, 2009). Dans ces nouvelles conditions physiologiques le champignon engage véritablement son processus de germination et utilise pleinement ses réserves. La nature labile des strigolactones en fait des molécules facilement hydrolysables avec une durée de vie limitée dans la rhizosphère. Elles sont exsudées en très faible quantité. Les racines de coton par exemple sécrètent environ 15pg de strigol par jour (Sato *et al.*, 2005). L'instabilité des strigolactones fait qu'un gradient de concentration se forme autour de la racine de telle sorte que leur perception par le champignon est un indicateur fiable de la proximité d'une plante hôte (Parniske, 2005). Les strigolactones étaient déjà connues comme signaux racinaires capables d'induire la germination des graines de plantes parasites *Striga* et *Orobanche*. Ces organismes végétaux sont des biotrophes obligatoires comme les champignons MA. Ils doivent, pour leur survie, déceler la présence d'une plante hôte avec la meilleure efficacité possible (Bouwmeester *et al.*, 2007). Outre leurs rôles dans la rhizosphère, les strigolactones jouent aussi dans la plante le rôle d'hormones

végétales, notamment impliquées dans le contrôle architectural de la partie aérienne (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008).

Réciproquement, les champignons MA produisent des signaux diffusibles capables de modifier l'expression des gènes de la plante et de provoquer des réponses racinaires comme des variations calciques cytosoliques ou la production de racines latérales (Weidmann *et al.*, 2004; Oláh *et al.*, 2005; Kosuta *et al.*, 2008; Kuhn *et al.*, 2010). Ils affectent également le métabolisme racinaire des sucres notamment, avec un stockage plus important d'amidon dans certaines cellules du cortex (Gutjahr *et al.*, 2009). Récemment, une famille de lipochitooligosaccharides, appelée Myc-LCOs ou facteur Myc, a été identifiée dans les exsudats du champignon MA *Rhizophagus irregularis*, molécules de même nature chimique que les facteurs Nod produits par les bactéries *Rhizobium* et connues pour le rôle indispensable qu'elles jouent dans la symbiose fixatrice d'azote (Maillet *et al.*, 2011). Des études génétiques ont établi que les Myc-LCOs et les facteurs Nod déclenchent des voies de signalisations symbiotiques induisant respectivement les programmes génétiques de mycorhization et de nodulation. Ces voies Myc et Nod partagent au moins huit protéines impliquées dans la transduction du signal des facteurs Myc et Nod. C'est la "common symbiosis pathway" (CSP) (Bonfante *et Genre*, 2010) (Figure 1-2).

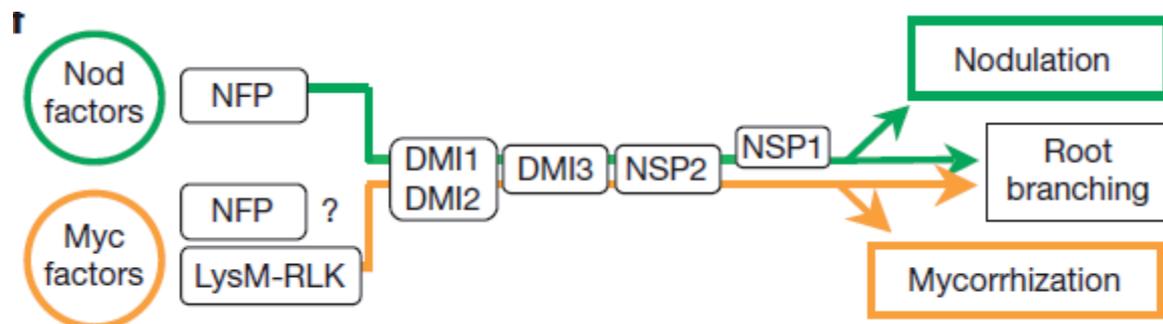


Figure 1-2 La voie de signalisation "common symbiosis pathway" (Maillet *et al.*, 2011).

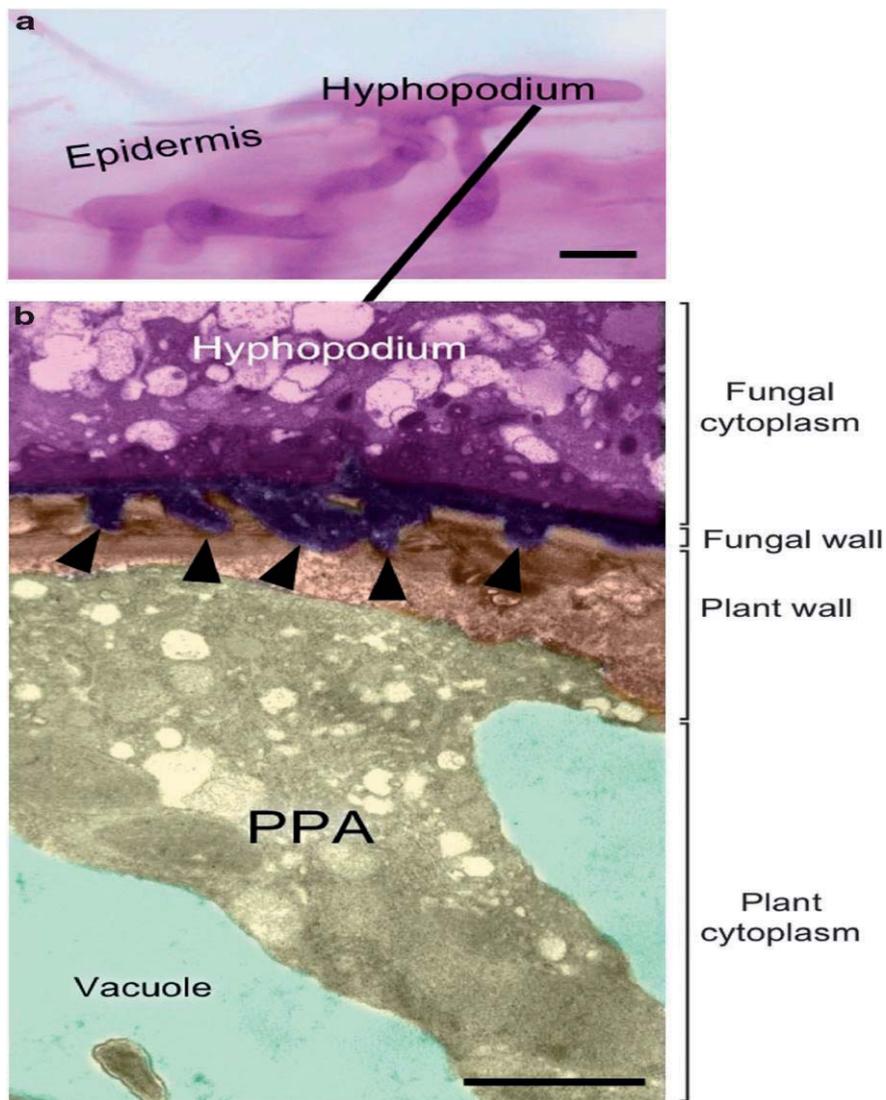
Les facteurs Nod et Myc sont perçus par des récepteurs. La perception des facteurs nod et des facteurs myc active une voie de signalisation faisant intervenir plusieurs protéines. La « common symbiosis pathway » (CSP), identifié chez *Medicago truncatula*, est composé d'un récepteur putatif, DMI2, une kinase possédant des domaines riches en Leu-répétées. CSP est composé d'un canal à cations, DMI1. Pendant les remodelages intracellulaires qui précèdent l'infection, des oscillations calciques faibles sont induites dans les cellules corticales. Ces oscillations calciques deviennent plus importantes lors de l'entrée des deux symbiontes dans l'apoplasme (Sieberer *et al.*, 2009, Chabaud *et al.*, 2011). Cette oscillation calcique est décodée par une kinase calcium / calmoduline-dépendante, codée par DMI3, localisée dans le noyau des poils absorbants de *M. truncatula* (Smit *et al.*, 2005). Le facteur de transcription (NSP2) et d'autres protéines interviennent ensuite pour

mettre en place les programmes symbiotiques. Les facteurs Nod et Myc induisent respectivement la nodulation et la mycorhization et une ramification racinaire.

Il a été proposé que la voie de signalisation Nod a évolué il y a 60 millions d'années chez les légumineuses à partir de la voie de signalisation Myc beaucoup plus ancienne (Parniske, 2008).

La production des strigolactones par les plantes dépend de la disponibilité en phosphate. Dans des conditions de culture avec un faible apport en phosphate, la quantité de strigolactones sécrétée est plus élevée (Yoneyama *et al.*, 2007). Chez des plantes mycorhizées la production de strigolactones est fortement diminuée, conséquence peut être due à une meilleure nutrition en phosphate lors de la symbiose (Lopez-Raez *et al.*, 2011). En ce qui concerne la production des facteurs Myc, il n'existe pas de données faisant référence à certaines conditions préférentielles de production. Par contre, les spores en germination sont capables de sécréter ces molécules sans avoir été en contact avec des exsudats de plante, mais en très faible quantité (Maillet *et al.*, 2011). Actuellement aucune étude ne fait référence à l'effet des strigolactones sur la production de facteurs Myc et inversement.

Quand les deux partenaires rentrent physiquement en contact, l'hyphe du champignon AM peut parcourir quelques millimètres à la surface d'une racine latérale de son hôte et se ramifier, avant de gonfler à son extrémité et de se différencier en hyphopodium. L'hyphopodium adhère à la racine en formant plusieurs protrusions de sa paroi vers la paroi végétale afin de s'y ancrer (Bonfante *et Genre*, 2010) (Figure 1-3 page 12).

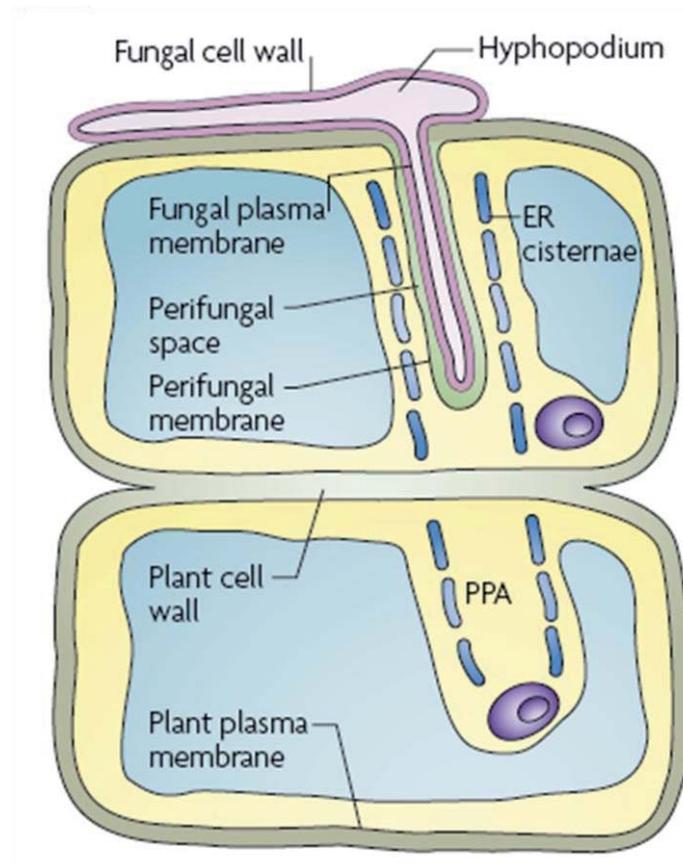


**Figure 1-3 L'adhésion du champignon MA à une racine par l'intermédiaire de sa structure d'attachement : l'hyphopodium (Bonfante & Genre, 2010).**

(a) Photographie d'un hyphopodium de *Gigaspora gigantea* formé à la surface d'une racine de carotte. La racine mycorhizée a été colorée à l'aide de fuchsine acide (barre, 10 $\mu$ m). (b) photographie d'un hyphopodium ancré à la paroi d'une cellule épidermique observé par microscopie électronique à transmission. La paroi du champignon MA forment des protrusions (flèches) permettant ainsi l'adhésion (barre, 2 $\mu$ m).

Les mécanismes mis en jeux lors de l'établissement de cette structure de contact restent encore inconnus. Une fois l'hyphopodium formé, après 4 à 6 heures, l'hyphe pénètre dans la racine (Genre *et al.*, 2008). Pendant ce laps de temps, la cellule épidermique immédiatement sous-jacente se prépare à la colonisation du symbionte. L'expression de nombreux gènes varie, dont une partie est aussi régulée par les signaux diffusibles du champignon MA (Chabaud *et al.*, 2002; Weidmann *et al.*, 2004). La cellule épidermique servant de point d'entrée pour le champignon réorganise son cytoplasme de manière à former une structure spécifique et

indispensable à l'entrée de l'hyphe dans la racine, appelée « prepenetration apparatus » (PPA) (Genre *et al.*, 2005). La membrane cytoplasmique de la cellule épidermique s'invagine créant ainsi un tube dont l'orientation est prédéfinie par le noyau (Genre *et al.*, 2005; Genre *et al.*, 2008). Le cytosquelette et un ensemble d'organites comme le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et des vésicules interviennent activement dans la formation de ce tunnel (Genre *et al.*, 2008) (Figure 1-4).



**Figure 1-4 Schéma détaillant la formation du « PrePenetration Apparatus » (PPA) (Parniske 2008).**

Lors de l'entrée du champignon MA dans la racine, se développe le PPA. Il correspond à la formation d'un chemin que l'hyphe pourra emprunter afin d'atteindre le cortex racinaire. La membrane de la cellule végétale s'invagine, formant un tube bordé par un grand nombre d'organites dont le réticulum endoplasmique nécessaire dans la construction d'un squelette de microfilaments. Le noyau précède cette structure et l'oriente à travers la cellule.

Une fois le PPA constitué, l'hyphe se fraie un chemin vers les cellules du cortex racinaire où le champignon s'étend rapidement à travers l'apoplaste pour former des arbuscules (Parniske, 2004; Paszkowski, 2006).

Lors de l'établissement de la symbiose, un processus moléculaire et cellulaire très précis, et probablement très conservé, se met donc en place pour favoriser et rendre possible l'interaction entre les deux partenaires. Des changements morphologiques

et physiologiques se produisent tels que la formation d'hyphopodia par le champignon et l'élaboration du PPA par la plante ainsi que l'édification d'arbuscules comme lieu privilégié d'échanges. Les facteurs de l'environnement peuvent contrarier ce processus. Par exemple, de nombreuses études ont montré que la disponibilité en phosphate affectait la mycorhization (Smith *et* Read, 2008). Quand le phosphate est abondant, la nutrition phosphatée des racines se fait préférentiellement par la voie nutritionnelle directe, non mycorhizienne, qui est moins coûteuse en énergie (Nagy *et al.*, 2009). De nombreux gènes décrits comme induits lors de la phase pré-symbiotique sont réprimés par de fortes concentrations en phosphate (Breuillin *et al.*, 2010). De même, en condition élevée de phosphate, la formation d'hyphopodium est inhibée malgré l'apport exogène de strigolactones synthétiques ajoutées pour compenser la faible synthèse de strigolactones provoquée par cette condition (Balzergue *et al.*, 2011). Il suffit qu'un des gènes impliqués dans la voie de signalisation CSP soit muté pour que le processus d'établissement de la symbiose se fige après l'étape de formation des hyphopodia et ne puisse se poursuivre par la pénétration du champignon dans la racine (Barker *et al.*, 1998; Catoira *et al.*, 2000; Marsh *et* Schultze, 2001).

### **1.2.3. La phase symbiotique**

On peut considérer que la formation des arbuscules dans le cortex racinaire marque le début de la phase symbiotique, phase pendant laquelle les échanges de nutriments entre les deux partenaires sont opérationnels.

#### **1.2.3.1. Réorganisation cellulaire**

Dans la cellule corticale racinaire, l'hyphe du champignon se ramifie intensément. Autour de cette structure fongique très ramifiée, la membrane plasmique végétale s'invagine et doit se développer considérablement pour former la membrane périarbusculaire (PAM). Un espace périarbusculaire se crée entre les deux organismes, formant une interface d'échange entre les deux partenaires où

transient nutriments et signaux. Cet espace périarbusculaire est une matrice composée essentiellement de molécules retrouvées dans les parois primaires de plante telle que des  $\beta$ -1,4-glucanes, des homogalacturonanes, des xyloglucanes et en arabinogalactanes ainsi que des protéines riches en hydroxyproline (Bonfante *et Perotto*, 1995; Harrison, 1999; Harrison, 2005a). L'élaboration de cette interface symbiotique est associée à de très fortes activations métaboliques. De la même manière que pour la conception du PPA les cellules du cortex racinaire anticipent la création des arbuscules. Autour de la membrane périarbusculaire prolifèrent et se concentrent des organites (réticulum endoplasmique, appareils de Golgi, plastes et vésicules) (Genre *et al.*, 2008; Pumplin *et Harrison*, 2009). La taille du noyau augmente et la chromatine se décondense, signe d'une plus forte activité transcriptionnelle (Genre *et al.*, 2008; Bonfante *et Genre*, 2010). L'arbuscule est une structure éphémère dont la durée de vie n'excède pas quelques jours (4-5 jours). La paroi fongique commence alors à se collapser au niveau des fines ramifications et le cytoplasme se rétracte. Progressivement, ce processus de sénescence s'étend à l'ensemble de l'arbuscule. A sa disparition, la cellule corticale retrouve son organisation cellulaire originelle (Javot *et al.*, 2007; Bonfante *et Genre*, 2010). Il n'y a pas de synchronisation dans la formation des différentes structures symbiotiques : on peut observer simultanément dans une même racine tous les stades de colonisation, depuis les hyphopodia jusqu'aux vésicules intra-racinaires et arbuscules sénescents.

### 1.2.3.2. Modulation de l'expression génique

Cette profonde réorganisation cellulaire lors de la colonisation des racines par le champignon est associée à d'importants changements dans l'expression génique des deux partenaires.

#### 1.2.3.2.1. Chez la plante

Plusieurs études transcriptomiques ont été réalisées chez plusieurs espèces végétales : *M. truncatula* (Liu *et al.*, 2003; Brechenmacher *et al.*, 2004; Hohnjec *et al.*, 2005; Küster *et al.*, 2007; Gomez *et al.*, 2009), *Oryza* (Grunwald *et al.*, 2004;

Güimil *et al.*, 2005) et *Lotus japonicus* (Guether *et al.*, 2009). Ces études ont mis en évidence plus de 500 gènes dont le niveau d'expression est modulé par la symbiose. Parmi les plus significatifs, on retrouve des gènes codant pour des protéines impliquées dans le transport de nutriments, la synthèse de membranes, la dynamique cellulaire, et la signalisation cellulaire. Quelques protéines sont décrites comme essentielles à la symbiose, car la mutation de leur gène ou leur non expression empêche la formation d'arbuscule ou provoque une dégénérescence précoce. Elles se localisent généralement autour des arbuscules, plus particulièrement sur la membrane périarbusculaire comme celles impliquées dans les processus de transport de molécule : le transporteur de phosphate MtPT4 chez *M. truncatula* (Javot *et al.*, 2007), deux transporteurs ABC (Zhang *et al.*, 2010) et un transporteur d'oses MtSuc1 chez *M. truncatula* (Baier *et al.*, 2010). D'autres protéines importantes dans la symbiose aux fonctions encore inconnues ou mal

définies sont localisées dans les zones de colonisation du champignon MA comme le gène de la vapyrin codant pour une protéine cytoplasmique (Pumplin *et al.*, 2010), une famille de subtilases (protéases) (Takeda *et al.*, 2009) et la blue copper protéine (Pumplin *et Harrison*, 2009).

### **1.2.3.2.2. Chez le champignon MA**

Les champignons MA sont des biotrophes obligatoires, l'interaction avec une plante leur est indispensable pour accomplir leur cycle de vie. A l'état symbiotique, ils forment, simultanément, deux types de mycélium: (i) le mycélium extra racinaire qui explorent la rhizosphère, colonise d'autres plantes et sporule, et (ii) le mycélium intra racinaire, qui s'approvisionne en carbone et fournit à la racine l'eau et les éléments minéraux assimilés dans le sol par le mycélium extra racinaire. Ce dernier possède différents transporteurs dont certains ont été bien caractérisés, comme un transporteur de phosphate GiTP (Harrison *et van Buuren*, 1995) dont la transcription du gène est modulée par la quantité de phosphate (Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001). De plus, l'identification des transporteurs d'ammonium de haute affinité GintAMT1 et GintAMT2 (López-Pedrosa *et al.*, 2006; Pérez-Tienda *et al.*, 2011) ainsi que la caractérisation d'une amino acid permease (AAP), protéine dont l'abondance

du transcrit est corrélée avec la quantité d'azote organique disponible (Cappellazzo *et al.*, 2008). Le phosphate absorbé est rapidement transformé en poly-phosphate capable de migrer le long de l'hyphe jusqu'à l'arbuscule par un mécanisme de transport encore inconnu (Hijikata *et al.*, 2010), tandis que l'ammonium est transféré sous forme d'arginine (Govindarajulu *et al.*, 2005). Les hyphes intra racinaires présentent un transporteur de monosaccharides MST2 dont l'expression génique est corrélée à celle du transporteur de phosphate PT4 spécifique de la symbiose pour la plante (Helber *et al.*, 2011).

### **1.2.3.3. Le protéome**

#### **1.2.3.3.1. Chez la plante**

Le développement d'outils d'analyse du protéome de *M. truncatula*, tel que la séparation des protéines sur gel d'acrylamide en deux dimensions suivie d'une identification par spectrométrie de masse (Watson *et al.*, 2003) et l'analyse par chromatographie liquide (LC) couplée à la spectrométrie de masse (Lei *et al.*, 2005) ont permis l'étude de profils protéiques dans la symbiose mycorhizienne. La création d'une base de données protéiques spécifiques des légumineuses, dont *M. truncatula* fait partie, a également facilité l'identification des protéines (Lei *et al.*, 2011). Des travaux basés sur l'analyse différentielle du protéome montrent qu'une vingtaine de protéines sont identifiées comme subissant une régulation consécutivement à trois semaines de colonisation par le partenaire fongique (Bestel-Corre *et al.*, 2002). La présence du champignon MA affecte des protéines qui ont des fonctions dans les processus de réponse au stress oxydatif (comme les peroxydases et la glutathione-S-transférase), dans la respiration et dans la structuration des parois. D'autres travaux effectués sur les protéines membranaires révèlent aussi la régulation d'une vingtaine de protéines, dont la fonction reste inconnue pour une majorité d'entre elles (Valot *et al.*, 2005; Valot *et al.*, 2006).

### **1.2.3.3.2. Chez le champignon MA**

Contrairement à *M. truncatula*, on ne dispose pas de génome séquencé pour *R. irregularis* et ne sont disponibles que des données sur le transcriptome, très récemment publiées (Tisserant *et al.*, 2012). Par conséquent l'identification des protéines par une analyse protéomique est moins aisée. La biotrophie du champignon MA vis-à-vis du carbone fourni par la plante, ne permet pas sa culture pure et la réalisation d'analyses différentielles du protéome entre un état symbiotique et non symbiotique. Cependant, une carte du protéome d'hyphes extra-racinaires de *R. irregularis* cultivés avec des racines de carotte a été réalisée par séparation sur un gel en deux dimensions. 438 spots ont été observés dont 4 ont été identifiés par analyse en spectrométrie de masse (Dumas-Gaudot *et al.*, 2004). D'autres protéines du champignon MA ont été identifiées dans les hyphes intra-racinaire (Valot *et al.*, 2005), dont la fonction est conforme à l'utilisation du carbone par le champignon MA avec l'identification de protéines intervenant dans les processus énergétiques (comme le cycle de Krebs) et dans l'homéostasie du potentiel d'oxydoréduction (Recorbet *et al.*, 2010).

### **1.2.3.4. Modifications métaboliques**

#### **1.2.3.4.1. Chez la plante**

Différentes analyses du métabolome ont déjà été menées sur des racines de plantes mycorhizées, la plupart d'entre elles ont ciblé spécifiquement une famille de métabolites. Les flavonoïdes et isoflavonoïdes sont deux familles métaboliques qui ont été largement étudiées dans la symbiose mycorhizienne. Ces molécules sont associées à la croissance des plantes et à leur développement. On leur confère un rôle dans la protection contre les UV, également dans l'inhibition du transport d'auxine et comme molécules signal dans les interactions entre plantes et microorganismes (Dakora *et al.*, 1993; Harrison *et Dixon*, 1994; Baggett *et al.*, 2002). Il a été démontré que certains flavonoïdes sont présents en plus forte quantité dans des racines mycorhizées comme : la daidzeine, le coumestrol, 4',7-dihydroxyflavone,

la formononétine malonyl glycoside (malonylononine) et la medicarpine malonyl glycoside (Harrison, 1993). Ces molécules appartiennent à la voie des phénylpropanoïdes (Figure 1-5).

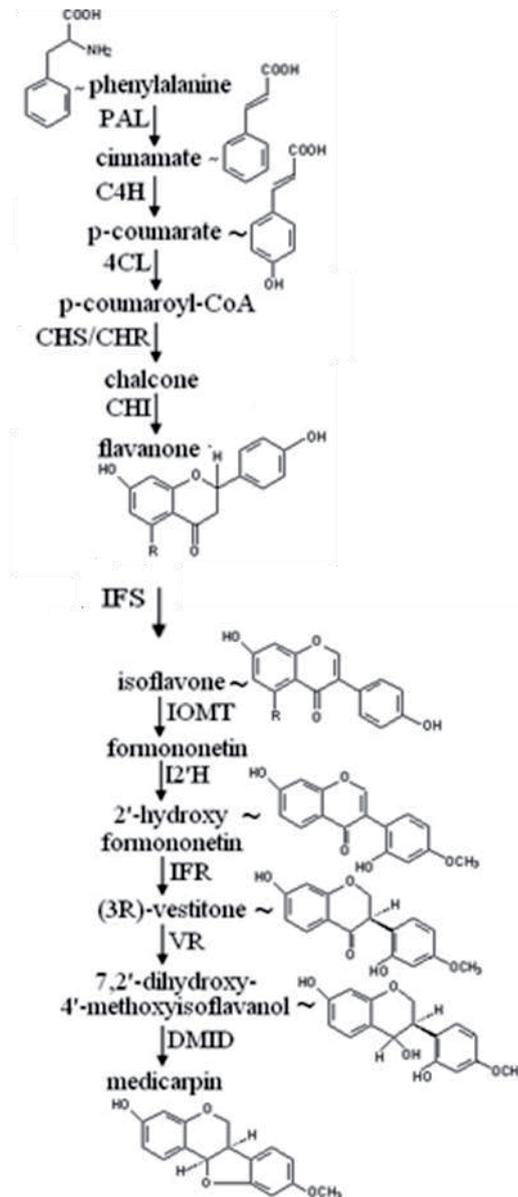


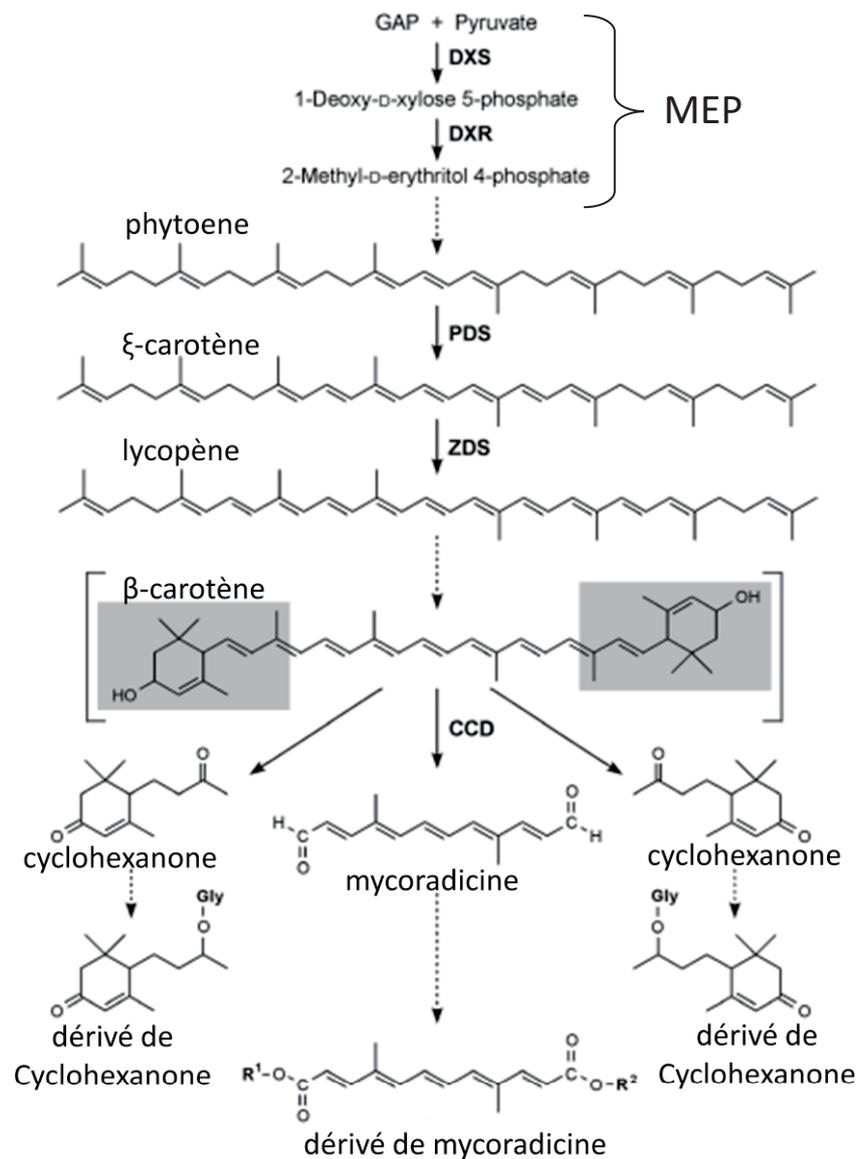
Figure 1-5 Biosynthèse de la medicarpine par la voie des phénylpropanoïdes (adapté d'Harrison et Dixon 1993).

Les flavonoïdes (coumestrol, daidzeine, formononétine, dihydroxyflavone et medicarpine) qui s'accumulent dans les racines de plantes colonisées par les champignons MA appartiennent à cette voie de biosynthèse.

Sous l'effet de la colonisation du champignon MA, les gènes des enzymes qui conduisent à la formation de la medicarpine sont surexprimés au niveau des cellules contenant les arbuscules (Harrison et Dixon, 1994). La medicarpine est un

flavonoïde qui possède une activité inhibitrice sur certains champignons pathogènes (Baggett *et al.*, 2002). De plus, la daidzeine précurseur de la formononetine et de la médicarpine stimule la germination des spores de *Glomus mosseae* et de *R. irregularis* (Kape *et al.*, 1993). D'autres travaux ont montré que dans des temps précoces de la symbiose le rapport de concentration de la formononetine, de la médicarpine et de leurs conjugués glycosylés augmente. Alors qu'à des temps plus tardifs ce rapport diminue pour tendre vers une valeur de 1 (Volpin *et al.*, 1995). Malgré tous ces travaux sur les flavonoïdes, leurs rôles dans la mycorhization restent encore non résolus, principalement en raison des différences de concentrations observées. Elles dépendent de plusieurs facteurs : (i) le champignon MA utilisé (Larose *et al.*, 2002), (ii) la plante étudiée (Harrison, 1993), (iii) et le temps de culture, les flavonoïdes s'accumulant au cours du temps dans les tissus indépendamment de la symbiose (Tiller *et al.*, 1994). Bécard et collaborateurs (1995) ont montré que des plantes de maïs mutées sur le gène codant pour la chalcone synthase étaient normalement mycorhizées par différents champignons MA malgré leurs incapacités à synthétiser ces flavonoïdes (4',7-dihydroxyflavone, la formononetine, la daidzeine et la médicarpine).

D'autre part, l'observation d'une prolifération de plastides et de mitochondries autour des arbuscules témoigne d'une forte activation métabolique des cellules racinaires colonisées (Lohse *et al.*, 2005; Lohse *et al.*, 2006). La mise en évidence de l'accumulation d'apocaroténoïdes dans les racines mycorhizées atteste d'une forte stimulation de ce métabolisme dans la plante hôte. Ces apocaroténoïdes sont issus de la dégradation oxydative du carotène en C13 (cycloxanones) et C14 (mycoradicales) sur lesquels se greffent entre autres des glycosides et des fonctions malonyles (Schliemann *et al.*, 2006). La déficience en 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase2 (DXS2), une protéine de la voie du méthylerythritol-phosphate (MEP), voie de biosynthèse des isoprènes localisée en amont des caroténoïdes, diminue le pourcentage d'arbuscules matures et actifs ainsi que la quantité d'apocaroténoïdes (Floss *et al.*, 2008) (Figure 1-6).



**Figure 1-6** Voie de biosynthèse des apocaroténoïdes s'accumulant dans les racines de plantes colonisées par les champignons MA (Strack et Fester 2006).

Les apocaroténoïdes composés de cyclohexanone (C13), de dérivés cyclohexanones, de mycoradicine (C14) et de dérivés mycoradicynes sont issus du clivage du beta-carotène, lui-même synthétisé par la voie du méthylerythritol 4-phosphate (MEP). Les différentes enzymes intervenant dans cette biosynthèse des apocaroténoïdes : DXS, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase ; DXR, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase ; PDS, phytoene desaturase ; ZDS, beta-carotène desaturase ; CCD, caroténoïd cleavage dioxygenase.

Ces résultats suggèrent qu'une ou des molécules participant à la vitalité des arbuscules peuvent être issues d'apocaroténoïdes. Ces molécules pourraient contrôler la colonisation du champignon ou protéger les cellules corticales des racines contre les dommages oxydatifs induits par une forte activité d'échange de nutriments entre les deux partenaires. Elles pourraient aussi comme celles issues de

la mycoradicine (apocaroténoïdes en C14), être associées à la dégradation des arbuscules (Fester *et al.*, 2002). Rappelons que les strigolactones et l'acide abscissique sont issus du clivage de beta-caroténoïdes par une famille d'enzymes : les « caroténoïd cleaving dioxygenase » (CCDs) (Strack *et Fester*, 2006). La synthèse des gibbérellines et des cytokinines dépend également de la voie du MEP.

A partir de plantes entières de *M. truncatula*, une étude de métabolomique globale sur des racines mycorhizées avec *R. irregularis* et non mycorhizées a été réalisée par Schliemann et collaborateurs, à différents temps de culture (Schliemann *et al.*, 2008). Les métabolites primaires ont été analysés par GC-MS, trois acides aminés (acide aspartique, acide glutamique et asparagine) sont davantage présents dans les racines mycorhizées à 42 jours de culture. A l'inverse le cis-aconitate et le fumarate, métabolites du cycle de Krebs, ont des concentrations réduites dans les racines mycorhizées. Ce résultat peut traduire une activation du métabolisme mitochondrial et plastidique durant la mycorhization. La prolifération de plastes et une augmentation de l'expression des gènes de biosynthèse supporte cette hypothèse (Lohse *et al.*, 2005; Lohse *et al.*, 2006). De plus, le tréhalose, un sucre typiquement fongique, a logiquement et seulement été détecté dans les racines colonisées par le champignon MA.

Pour les métabolites non polaires, certains acides gras, glycérides et stérols ont également été détectés seulement dans les racines mycorhizées. Ils sont d'origine fongique et sont caractéristiques de la colonisation des racines par le champignon MA. De plus, l'acide palmitique et l'acide oléique ont été retrouvés en plus grande quantité dans les racines mycorhizées.

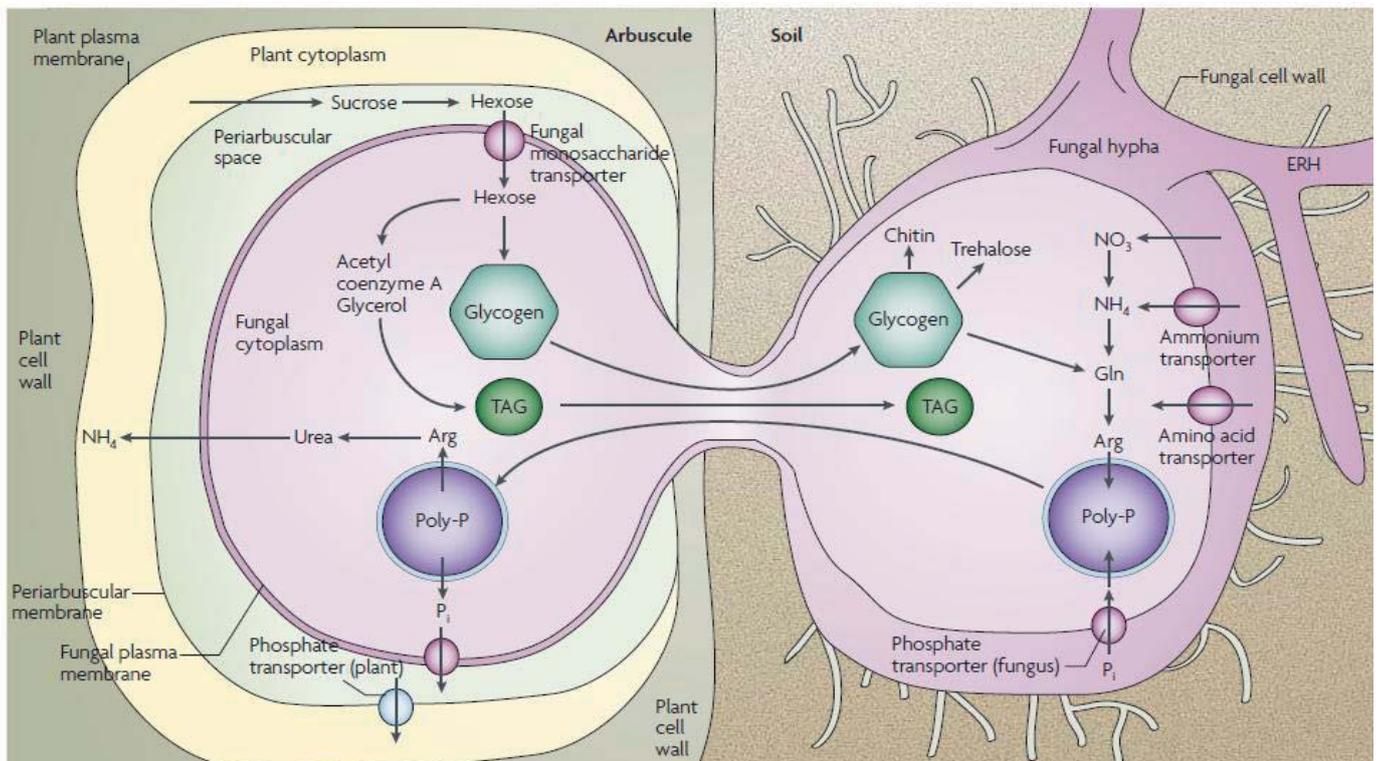
En ce qui concerne les métabolites secondaires, les flavonoïdes et apocaroténoïdes ont été analysés par HPLC avec un détecteur de type UV. A 56 jours de culture, quinze composés ont été détectés exclusivement dans les racines mycorhizées dont douze apocaroténoïdes et trois métabolites non identifiés. Les apocaroténoïdes étaient des dérivés de cyclohexanones identifiées comme des blumenols et des dérivés de mycoradicine connus pour être synthétisés pendant la symbiose mycorhizienne (Strack *et Fester*, 2006). De plus, ces analyses ont montré l'accumulation des flavonoïdes avec le temps de culture, en accord avec de précédents travaux (Tiller *et al.*, 1994). A partir de 35 jours de culture, la daidzeine, l'ononine et la malonylononine ont été retrouvées en plus grandes quantités dans les racines colonisées par le champignon MA que dans les racines non mycorhizées.

Antérieurement, Harrison et Dixon avaient mis en évidence l'accumulation de ces flavonoïdes à 40 jours de culture dans les racines de *M. truncatula* colonisées par *G. versiforme* (Harrison, 1993). Une autre classe de métabolites très présente dans les racines, les saponines (triterpènes glycosylés), et reliées à de nombreuses activités biologiques avec notamment des propriétés anti-fongiques (Osborn, 2003; Dinda *et al.*, 2010; Lanzotti *et al.*, 2012), ont été détectées mais sans différence significative entre racines mycorhizées et racines témoins ; comme pour les flavonoïdes, les saponines s'accumulent au cours de la croissance de la plante indépendamment de la colonisation par le champignon MA. Suite à une hydrolyse alcaline permettant une libération des composés liés aux parois, les métabolites phénoliques ont également été analysés lors de ces travaux. Il est connu que des changements dans la composition des métabolites phénoliques de la paroi interviennent lors d'interactions entre plantes et pathogènes. Il est proposé que ces modifications confèrent une meilleure résistance des parois face aux enzymes de lyse des envahisseurs (pathogènes) ainsi qu'un renforcement physique des parois (Stewart *et Mansfield*, 1985; Dixon, 2001b; Hahlbrock *et al.*, 2003). Le tyrosol a été caractérisé comme le composé phénolique des parois le plus produit dans les racines de *M. truncatula* colonisées par le champignon MA. Cependant, chez le poireau (*Allium porrum*), le tyrosol est l'un des composants majeurs des métabolites phénoliques liés à la paroi. Aucune diminution ou augmentation de la concentration de celui-ci n'a été mesurée à l'état mycorhizé chez le poireau (Codignola *et al.*, 1989). Ces observations suggèrent que le tyrosol ne joue pas un rôle majeur dans la symbiose endomycorhizienne.

#### **1.2.3.4.2. Chez le champignon MA**

Il semble que les capacités réelles du champignon à transporter et métaboliser des sucres tels que le glucose ou le fructose ne s'exercent que dans son mycélium intra-racinaire. En effet, lorsque des sucres marqués au  $^{13}\text{C}$  ou au  $^{14}\text{C}$  sont fournis au mycélium extra-racinaire, aucun marquage n'est observé dans les tissus du champignon (Pfeffer *et al.*, 1999 ; Bécard *et al.*, 2004). Par contre un marquage direct des métabolites du champignon, notamment du tréhalose, est observé lorsque

ces sucres marqués sont apportés aux racines mycorhizées, c'est-à-dire au mycélium intra-racinaire. Il a également été montré que le partenaire fongique n'était capable de synthétiser l'acide palmitique, précurseur de tous ses acides gras, qu'au niveau de son mycélium intra-racinaire (Pfeffer *et al.*, 1999; Trépanier *et al.*, 2005). Le fait que le transport des sucres et la synthèse des acides gras ne s'opèrent chez le champignon que dans l'apoplasme d'une racine suggère que ces compétences métaboliques fongiques sont en réalité sous le contrôle de la plante hôte. Les mécanismes subtils qui contrôlent ces fonctions trophiques et métaboliques du champignon ne sont pas connus, mais leur élucidation pourrait à elle seule expliquer une grande partie du caractère obligatoire de la biotrophie des champignons MA. Ceci est d'autant plus vrai que la principale réserve carbonée de ces champignons est sous forme lipidique, et plus particulièrement sous forme de triglycérides. Une fois assimilés par les hyphes intra-racinaires, les hexoses sont ensuite transformés en tréhalose, glycogène et lipides. Ces derniers sont ensuite acheminés vers les hyphes extra-racinaires (Bago *et al.*, 2002; Bago *et al.*, 2003) (Figure 1-7).



**Figure 1-7 Les flux métaboliques dans la symbiose endomycorhizienne à arbuscule. (Parniske, 2008).**

Ce schéma représente les différents flux métaboliques échangés entre les hyphes extra racinaires (à droite) et les hyphes intra racinaires (à gauche). A droite l'hyphe extra racinaire absorbe le phosphate et l'azote du sol par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques. L'azote est stocké sous forme d'arginine. Le phosphate est

transformé en polyphosphate puis il est complexé à l'arginine et transféré vers l'hyphe intra racinaire. L'arginine est convertie en urée, la forme sous laquelle est échangé l'azote. Les polyphosphates se dégradent pour fournir du phosphate capté par la plante via un transporteur de phosphate spécifique de la symbiose. En contre partie, l'hyphe puise des hexoses de la plante via les transporteurs de sucrose dans l'espace périarbusculaire. Il forme du glycogène et des triglycérides qui seront exportés vers l'hyphe extra racinaire.

### **1.2.3.5. Signaux et facteurs de régulation pendant la symbiose MA**

Ainsi pendant la phase symbiotique, les programmes génétiques, cellulaires, physiologiques et métaboliques des deux partenaires sont profondément modifiés. Peu de choses sont connues sur les mécanismes qui sous-tendent ces reprogrammations. Il se peut que certains signaux moléculaires d'origine végétale ou fongique, comme lors de la phase pré-symbiotique, jouent des rôles clés. La caractérisation de ces signaux, impliqués dans des stades plus tardifs et échangés entre les partenaires symbiotiques *in planta*, au niveau le plus intime de la symbiose, est un véritable défi que nous avons essayé de relever dans ce travail de thèse.

#### **1.2.3.5.1. La lyso-phosphatidylcholine**

Dans cette recherche des signaux ou facteurs régulateurs de la symbiose MA, il faut mentionner la lyso-phosphatidylcholine (LPC). Ce métabolite est trouvé en plus grande quantité dans les racines mycorhizées. Il induit l'expression des gènes *StPT3* et *StPT4* de la pomme de terre et *LePT4* de la tomate qui codent pour des transporteurs de phosphate spécifiques de la symbiose (Drissner *et al.*, 2007; Bucher *et al.*, 2009).

#### **1.2.3.5.2. Hormones végétales**

Les phytohormones sont également des molécules candidates dans la régulation de la symbiose mais le rôle qu'elles jouent dans la mycorhization n'est pas

bien établi. De nombreuses études indiquent que leurs concentrations varient au cours de la symbiose (Hause *et al.*, 2007). L'interprétation des résultats est difficile car elles n'agissent pas seules, mais de façon interdépendante. Une revue décrit l'importance du couple acide jasmonique et acide salicylique ainsi que du ratio entre les deux dans le déclenchement des défenses des plantes face aux parasites et aux interactions mutualistes (Gutjahr *et Paszkowski*, 2009). Une suppression partielle de l'expression du gène codant pour une " allene oxide cyclase " (AOC1) et intervenant dans la synthèse de l'acide jasmonique a pour conséquence de réduire le nombre d'arbuscules et de provoquer un retard dans le processus de colonisation (Isayenkov *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent qu'un plus faible niveau d'acide jasmonique peut déséquilibrer le ratio acide jasmonique / acide salicylique influençant ainsi le niveau de défense de la racine et pénalisant l'interaction avec le symbionte. Les strigolactones sont une classe d'hormones végétale mais aussi une famille de molécules signal perçues par le champignon MA. Elles provoquent une forte augmentation de l'activité mitochondriale du champignon MA ainsi qu'une importante ramification de ses hyphes. La production de strigolactones est dépendante de la concentration en phosphate *in planta*, concentration elle-même modulée par la symbiose mycorhizienne. Quand le champignon MA colonise les racines, la concentration en strigolactones décroît. Peut on relier cette diminution de concentration à un contrôle des strigolactones sur la mycorhization en fonction de la quantité de phosphate fournit par le partenaire fongique ? A ce jour, aucune donnée ne permet d'établir un lien entre cette hormone et la régulation de la mycorhization *in planta*. Même si certaines hormones végétales contrôlent jusqu'à un certain point l'interaction symbiotique et donc directement ou indirectement le partenaire fongique, il est vraisemblable que d'autres molécules signal, en amont ou en aval, totalement inconnues à ce jour, soient également impliquées.

### **1.2.3.5.3. Les microARN**

Les microARN sont également étudiés dans la symbiose mycorhizienne pour leur capacité à moduler l'expression des gènes (Branscheid *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2010; Branscheid *et al.*, 2011). Des études plus fines mettront certainement en évidence dans les prochaines années le rôle joué par certains de ces microARN

dans la régulation de la mycorhization. D'ailleurs très récemment, un micro ARN, le miR 171h a été mis en évidence pour son rôle dans la régulation de la colonisation des racines par le champignon MA. Une surexpression du miR 171h dont la cible est le gène NSP2 (gène appartenant à la CSP) altère le taux de mycorhization (Lauressergues *et al.*, 2012).

#### **1.2.3.6. L'autorégulation de la symbiose par la plante**

L'autorégulation de la mycorhization par la plante a été démontrée par un certain nombre de travaux, notamment grâce à des cultures de plantes entières dont le système racinaire est divisé en deux parties. Différentes conditions ou traitements appliqués dans l'un des compartiments racinaires, affectent le taux de mycorhization dans le second par l'intermédiaire de signaux systémiques non identifiés à ce jour (Catford *et al.*, 2003; Staehelin *et al.*, 2011a).

##### **1.2.3.6.1. Les CLE peptides**

On mentionnera ici l'identification de signaux de régulation appartenant à la famille des CLE peptides (Oka-Kira *et Kawaguchi*, 2006; Magori *et Kawaguchi*, 2009; Mortier *et al.*, 2010). Ces peptides initialement découverts chez l'animal (Jun *et al.*, 2008), régulent le développement cellulaire des plantes (Wang *et Fiers*, 2010; Katsir *et al.*, 2011). La plupart des mutants affectés dans l'autorégulation de la symbiose rhizobienne le sont également dans la symbiose mycorhizienne, suggérant une similitude dans les mécanismes de régulation (Staehelin *et al.*, 2011b). Par conséquent, Il semble très probable que les CLE peptides soient aussi impliqués dans l'autorégulation de la symbiose mycorhizienne (Staehelin *et al.*, 2011a).

##### **1.2.3.6.2. Le phosphate**

Il est bien connu que des concentrations trop élevées de phosphate inhibent la

mycorhization (Smith & Read, 2008). Les mécanismes de cette régulation négative par le phosphate sont encore mal connus mais ils pourraient agir très tôt et impliquer des signaux systémiques provenant des parties aériennes de la plante (Breuillin *et al.*, 2010 ; Balzergue *et al.*, 2011). Par ailleurs, le phosphate fourni par le champignon MA est essentiel au maintien des structures symbiotiques et au développement de la mycorhization (Javot *et al.*, 2007). Enfin les concentrations en phosphate dans le milieu et *in planta* influencent la production de strigolactones dont on sait le rôle stimulateur sur les champignons MA (Yoneyama *et al.*, 2007; Lopez-Raez *et al.*, 2011). On peut donc faire l'hypothèse que le phosphate agit comme un signal de régulation de la symbiose (Yang *et Paszkowski*, 2011).

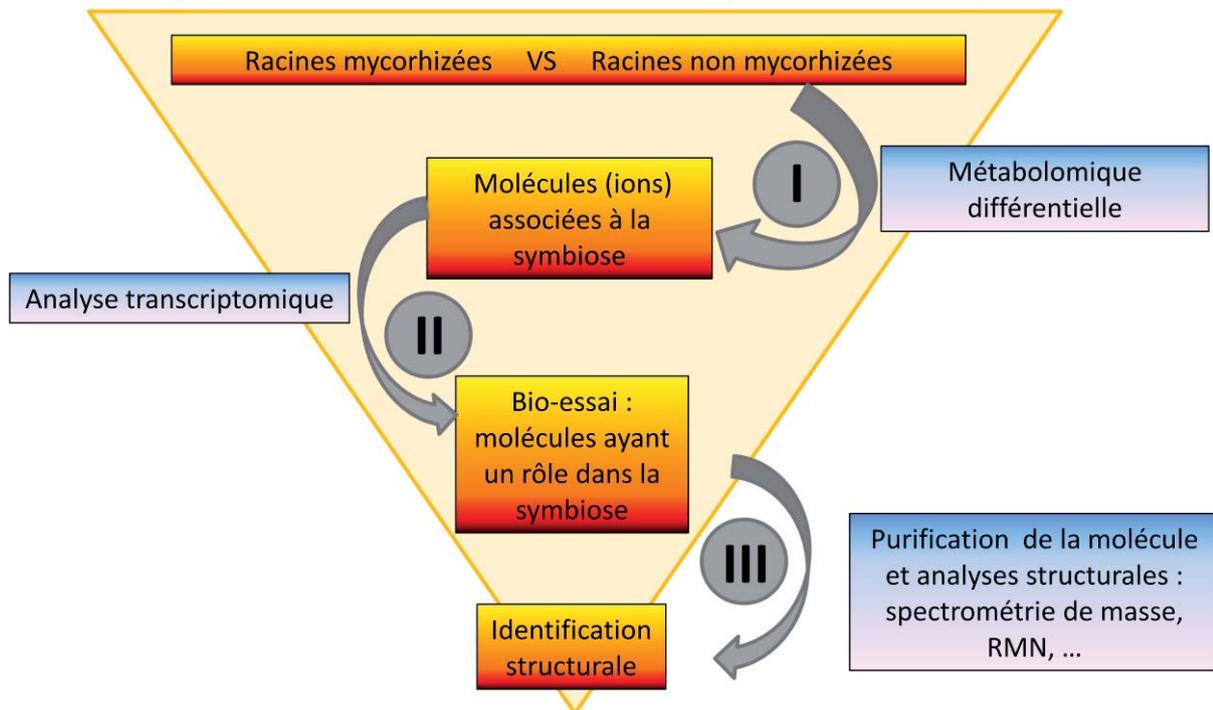
### 1.3. Objectif des travaux de thèse

Nous avons vu que l'expression d'un grand nombre de gènes des deux partenaires était modulée par la symbiose mycorhizienne. L'extinction de la transcription de ces gènes par l'utilisation de mutants ou par l'usage d'organismes modifiés génétiquement, produisant des ARN d'interférences (Coleman *et al.*, 1984; Mizuno *et al.*, 1984; Elbashir *et al.*, 2001a; Elbashir *et al.*, 2001b) a permis de mettre en évidence de nombreux gènes codant pour des protéines essentielles au bon développement de la symbiose mycorhizienne. Pour une partie de ces protéines, leur rôle et leur fonction dans la symbiose ne sont pas définis. La croissance du champignon MA à l'intérieur des racines et le développement d'arbuscules au niveau des cellules corticales requièrent de nombreux processus cellulaires. Cela laisse présager une régulation et une signalisation complexes (Harrison, 2005b). Malgré tous les travaux menés sur la symbiose mycorhizienne et la grande quantité de données accumulées, nos connaissances sur le développement et le maintien de cette interaction restent parcellaires. Les mécanismes de régulations sont encore largement inconnus et la mise en évidence de ces processus demeure un défi.

Notre objectif a été d'identifier des métabolites d'origine fongique ou végétale qui jouent un rôle, *in planta*, dans la régulation de la symbiose mycorhizienne à arbuscule. Nous nous sommes focalisés sur les petites molécules (taille moléculaire < 1 500 Dalton). Pour cela nous avons suivi une stratégie en trois étapes (Figure 1-

8).

### Stratégie pour l'identification de molécules importante dans la symbiose



**Figure 1-8 Schéma général de la stratégie mise en place pour identifier des molécules impliquées dans la symbiose.**

Cette stratégie se décompose en trois parties : (I) la mise en évidence des différences métaboliques entre des extraits de racines mycorhizées ou non mycorhizées grâce à des analyses différentielles par spectrométrie de masse (profils métabolomiques). (II) Un bio-essais visant à sélectionner les molécules pouvant avoir un rôle dans cette symbiose. Pour cela une analyse transcriptomique permet de mettre en évidence les molécules qui affectent des gènes spécifiques de la mycorhization. (III) les molécules criblées comme différentielles et affectant l'expression de gènes spécifiques de la symbiose sont ensuite pré purifiées, caractérisées chimiquement et testées à nouveau sur l'expression des gènes en vue d'une identification structurale.

Au cours des dernières années, grâce aux avancées technologiques importantes dans les domaines de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse, ont émergé de nouveaux outils analytiques, permettant des analyses globales telles que la métabolomique. Aujourd'hui, une analyse de métabolomique différentielle permet de comparer simultanément plusieurs milliers de analytes entre différents échantillons (Dunn *et al.*, 2011), ce qui en fait une technique de choix pour des investigations sans *apriori* (Patti, 2011). Cette approche est particulièrement justifiée dans les cas où les connaissances biologiques sont limitées. La somme des données accumulées et leurs analyses permettent une exploration du métabolome dont les résultats engendrent souvent la naissance de nombreuses études plus

ciblées (Kell *et* Oliver, 2004). La première partie du travail a été consacrée à la mise en place de la méthode expérimentale et à l'ensemble du processus analytique (Chapitre 1) pour mener une étude comparative des métabolomes de racines mycorhizées et non mycorhizées.

La deuxième partie du travail a consisté à traiter les données afin de définir les composés présents en plus grande quantité dans les racines mycorhizées. Ensuite nous avons tenté de repérer parmi les différentes molécules criblées par les profils métaboliques celles qui pourraient jouer un rôle régulateur dans la symbiose. Le métabolome des deux conditions (mycorhizée ou non) a été fractionné par HPLC préparative pour tester l'effet des différentes fractions sur l'expression de certains gènes d'intérêts du champignon MA (Chapitre 2).

## **2. CHAPITRE 1 : DEVELOPPEMENT DES METHODES**

La stratégie élaborée pour identifier des métabolites importants dans la symbiose mycorhizienne couple deux approches i) une analyse différentielle du métabolome de racines mycorhizées *versus* non mycorhizées par LC-MS, dans le but d'identifier des ions caractéristiques de la condition mycorhizée, ii) une analyse de l'expression de gènes, connus pour être régulés durant la symbiose mycorhizienne, en réponse à des extraits de racines mycorhizées *versus* non mycorhizées, fractionnés par chromatographie liquide. L'hypothèse de travail est que le couplage de ces deux approches devrait permettre à terme l'identification de molécules spécifiquement synthétisées *in planta* pendant la symbiose, et ayant un rôle symbiotique régulateur.

En premier lieu, il s'est avéré nécessaire de développer l'ensemble des méthodologies permettant de mener à bien cette stratégie en commençant par optimiser les conditions de cultures pour obtenir un matériel biologique en adéquation avec l'utilisation de la chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse.

### **2.1. La culture**

#### **2.1.1. Choix des organismes**

*Medicago truncatula* est une plante modèle particulièrement adaptée aux études des symbioses rhizobiennes et mycorhiziennes. De nombreuses ressources génétiques, transcriptomiques et génomiques sont maintenant disponibles pour l'étudier (Bell *et al.*, 2001; Cannon *et al.*, 2005; Young *et al.*, 2011). Le partenaire fongique *Rhizophagus irregularis* (DAOM 197198), anciennement appelé *Glomus intraradices*, est l'organisme modèle pour l'étude de la symbiose endomycorhizienne. Il a été adopté par la communauté scientifique internationale parce qu'il est cultivable *in vitro* sur racines transformées (Pawlowska *et al.*, 1999; Chabot *et al.*, 1992). Son génome est en cours de séquençage. De plus, la création d'un consortium *Rhizophagus irregularis*, auquel mon équipe d'accueil participe, a conduit à la

réalisation de plusieurs banques d'EST (expressed sequence tag) et l'élaboration de puces transcriptomiques, qui ont permis de cartographier les gènes exprimés sous différentes conditions (Tisserant *et al.*, 2012) (<http://mycor.nancy.inra.fr/IMGC/>).

### **2.1.2. Culture de *M. truncatula* en plante entière ou racines stériles**

La culture de *M. truncatula* en plante entière, mycorhizée ou non, est réalisable au laboratoire. Toutefois, elle présente de nombreux inconvénients par rapport à des cultures de racines stériles en boîtes de pétri, comme la place nécessaire en chambre de culture pour entreposer les pots. Il faut définir la « photo période » la plus adaptée, contrôler l'intensité lumineuse avec une exposition homogène entre tous les échantillons, contrôler l'arrosage. De plus, le suivi visuel du développement du champignon est impossible, cela nécessite l'arrêt de la culture pour quantifier la présence du champignon dans les racines. Enfin, la culture en plante entière n'étant pas stérile, elle ne permet pas de contrôler strictement la coinfection par d'autres microorganismes. Or, le métabolisme secondaire des plantes est très sensible à la présence de microorganismes dans la rhizosphère (Dixon, 2001a). Par conséquent, une culture pure de racine avec ou sans son partenaire fongique permet de cribler les différences exclusivement engendrées par la présence du champignon MA.

Une alternative est la culture stérile (*in vitro*) de racines de *M. truncatula* transformées par *Agrobacterium rhizogenes* (*A. rhizogenes*), c'est-à-dire en absence des parties aériennes. De ce fait sans partie aérienne, la photosynthèse est abolie et la source de carbone pour la culture de racine est apportée par le milieu de culture sous la forme de sucrose. Des interrogations sur le comportement de ces racines composites vis-à-vis de la mycorhization sont légitimes. Cependant, une étude a démontré que le taux de colonisation, les structures fongiques et les profils transcriptomiques restent inchangés dans une plante chimérique comportant des racines transformées par rapport à une plante sauvage (Mrosk *et al.*, 2009). Toutefois, il faut garder à l'esprit que tout signal systémique faisant intervenir les parties aériennes serait par conséquent aboli.

### 2.1.2.1. Culture de racines stériles de *M. truncatula*

La culture *in vitro* dans la gélose (Phytigel à 3g/l) de *Rhizophagus irregularis* sur racines transformées par *Agrobacterium rhizogenes* (« hairy roots ») avec un milieu minimum M (Bécard *et Fortin*, 1988), est bien maîtrisée au sein du laboratoire. Dans ces conditions, le champignon se développe, forme des mycorhizes typiques, sporule et donc accomplit son cycle de vie comme s'il était en symbiose avec une plante entière. Le milieu M est constitué de sels minéraux, de vitamines et de saccharose. Les faibles quantités d'azote et de phosphate de ce milieu favorisent l'établissement de la symbiose. L'ensemble des paramètres de cultures : composition du milieu, température et hygrométrie sont bien contrôlés. La température influence les échanges dans la symbiose ; certains travaux rapportent que les valeurs optimales pour *Rhizophagus irregularis* se situeraient entre 23C° et 25C° (Smith *et Roncadori*, 1986; Liu *et al.*, 2004). Le taux de mycorhization traduit l'état de colonisation de la racine par le partenaire fongique. Cette valeur correspond au pourcentage du système racinaire qui présente au moins une structure fongique (hyphe, arbuscule, spore ou vésicule) au niveau de son cortex racinaire. La quantification du taux de mycorhization s'effectue selon la méthode de la Gridline Intersect Method (Giovannetti *et Mosse*, 1980). Une grande variabilité du taux de mycorhization est mesurée entre différentes cultures, les valeurs s'échelonnent de quelques pourcents jusqu'à 50%. L'observation des cultures permet de mettre en évidence que dans les zones de forte densité d'hyphes, aucune racine n'est présente et inversement, les deux organismes semblent être en compétition vis-à-vis de l'occupation du milieu. Le taux de mycorhization est optimum après 8 semaines de culture, dans une boîte de Petri ronde (145Ø x 20 mm). Au-delà, la colonisation des racines par le champignon MA ne progresse plus.

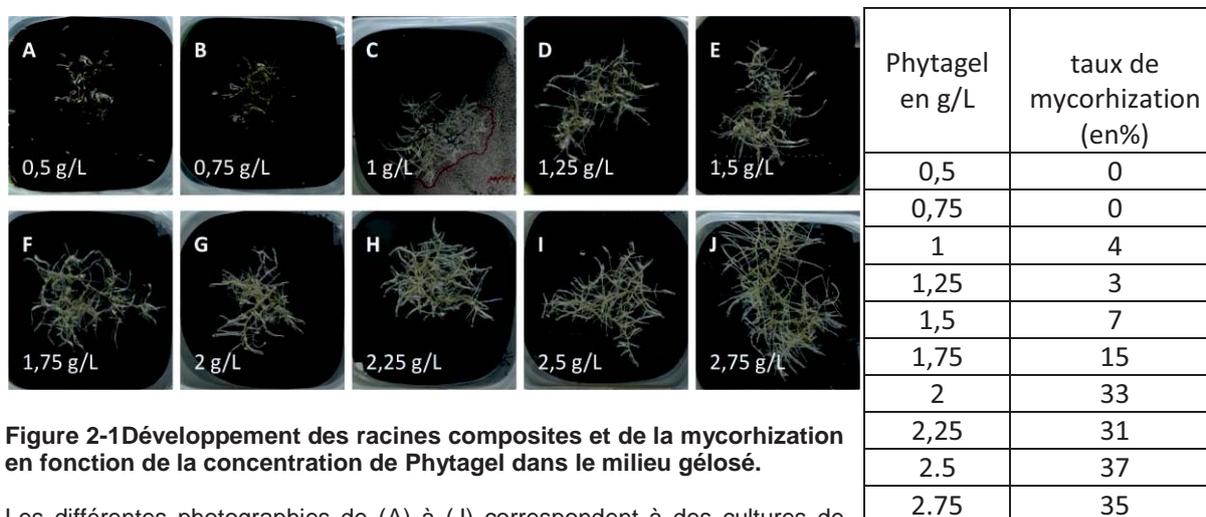
Toutefois, cette culture dans la gélose présente quelques défauts pour une analyse métabolomique. La première difficulté réside dans l'extraction des racines de la gélose sans abimer les tissus racinaires ; toute altération pouvant provoquer des perturbations métaboliques. De plus, le processus analytique est perturbé par l'impossibilité d'éliminer totalement la présence de la gélose. Cette dernière, même sous forme de trace altère nos analyses en spectrométrie de masse. Lors de la resolubilisation des échantillons un précipité se forme emprisonnant une partie des

métabolites présents induisant une grande variabilité. Enfin, la colonisation du partenaire fongique dans les racines est inégale entre différentes cultures, le taux de mycorhization moyen est de 29% avec un coefficient de variation de 56%.

Nous avons dû adapter nos conditions de culture afin de rendre compatible une analyse métabolomique avec l'utilisation de la spectrométrie de masse et d'améliorer la reproductibilité du taux de mycorhization entre différentes cultures, tout en maintenant une colonisation satisfaisante de la racine par le champignon MA.

### 2.1.2.2. Amélioration des conditions de culture

Afin de contourner les problèmes engendrés par l'utilisation du Phytigel (3 g/L), la première initiative a été de réduire sa concentration dans le milieu. Pour déterminer la quantité minimale de Phytigel nécessaire au bon développement des racines et du champignon MA, différentes cultures ont été réalisées avec des concentrations variant de 0,5 à 2,75 g/L (Figure 2-1).



**Figure 2-1** Développement des racines composites et de la mycorhization en fonction de la concentration de Phytigel dans le milieu gélosé.

Les différentes photographies de (A) à (J) correspondent à des cultures de racines transformées de *M. truncatula*, en présence de 500 spores de *Rhizophagus irregularis*, après quinze jours de croissance sur des milieux M gélosés avec saccharose, contenant de 0.5 à 2,75g/L de Phytigel. Le tableau rapporte le taux de mycorhization de ces cultures à huit semaines, déterminé selon la méthode de la Gridline Intersect (Giovannetti *et* Mosse, 1980). Le pourcentage moyen de mycorhization est calculé à partir de cinq échantillons de racines mycorhizées pour chaque concentration de Phytigel.

A quinze jours de culture, les racines poussent correctement au-delà de 1g/L de Phytigel. Toutefois à huit semaines de culture, le partenaire fongique colonise

faiblement son hôte en dessous de 2 g/L. Cependant, les concentrations dans lesquelles se développe correctement le champignon MA (> 2 g/L de Phytigel) ne permettent pas l'extraction du système racinaire sans abîmer les racines, la gélose demeure trop dense. Une étape de dissolution du Phytigel avec un tampon citrate à 10 mM a été testée. Elle n'est efficace que sous agitation à 100 rpm, ce qui provoque la rupture des racines latérales. Les tentatives infructueuses d'extraire des racines sans la présence de gélose ont conduit à explorer la possibilité de séparer physiquement les racines du Phytigel. Un papier filtre a été inséré entre la gélose et les racines. Ce processus permet aux racines de croître à la surface du papier filtre et au partenaire fongique de se frayer un chemin entre les mailles des fibres du support papier pour atteindre la gélose où il peut se développer. En fin de culture, les racines posées sur le papier filtre ne présentent aucune trace de gélose, leur extraction n'oppose plus de résistance mécanique. De plus, le taux moyen de mycorhization est élevé avec une moyenne à 47%, à huit semaines, et la variabilité entre culture est relativement plus faible avec un coefficient de variation de 9%. Grâce à la présence du papier filtre, il n'y a plus de compétition entre les deux partenaires vis-à-vis de l'occupation du milieu, la culture est compartimentée, une partie supérieure constituée principalement de racines et une partie inférieure colonisée par le partenaire fongique.

Le dernier défi a concerné la quantité de racines à produire. En effet, la taille des boîtes de Petri utilisées pour la culture limite l'échelle de production. Nous avons fait appel à la société Agronutrition, spécialiste du domaine pour produire les quantités nécessaires de racines mycorhizées et non mycorhizées. Un système de culture inspiré de celui que nous avons optimisé a été utilisé, mais les boîtes de Petri ont été remplacées par des unités de production plus grandes. Ce changement d'échelle a multiplié par cinq la quantité de racines, avec environ 5g obtenus par unité de production, contre 1g par boîte de Petri.

### **2.1.3. Durée de la culture**

Une forte colonisation des racines implique d'importants flux d'échanges et une grande coopération entre les deux partenaires. La dynamique du taux de mycorhization représente le bilan entre la création et la sénescence de structures fongiques dans la plante. Pour générer la plus grande quantité possible de métabolites spécifiques de la symbiose, le taux de mycorhization doit être optimal et donc la durée de culture doit être suffisamment longue. Cependant un temps de culture trop long génère l'accumulation de composés induits par le vieillissement des tissus racinaires. Avec le système de production de la société Agronutrition, la durée de culture a été fixée à dix semaines au lieu de huit semaines en boîte de Petri et des taux de mycorhization moyens 49% ont été obtenus.

## **2.2. L'analyse différentielle du métabolome**

Cette analyse se scinde en trois étapes successives ; (i) la récolte, l'échantillonnage et l'extraction, (ii) l'analyse du contenu des extraits racinaires par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse et (iii) le traitement des données pour réaliser l'analyse comparative (Zhou *et al.*, 2011). La caractérisation du maximum de différences entre l'état symbiotique et non symbiotique par une approche d'empreinte métabolique repose sur la reproductibilité et la robustesse de la méthode. Nous avons également eu le souci d'utiliser une démarche transposable à d'autres systèmes biologiques, particulièrement dans le domaine des interactions plantes/microorganismes.

### **2.2.1. Mise en place de l'extraction et de l'échantillonnage**

Un organisme produit plusieurs milliers de métabolites avec des propriétés physico-chimiques très diverses, aucune méthode ne permet à ce jour d'extraire et d'analyser l'ensemble de ces molécules (Werner *et al.*, 2008b). Le type d'extraction pratiqué et le(s) solvant(s) employé(s) conditionnent la nature des métabolites extraits.

### 2.2.1.1. Exsudation et extraction liquide-liquide

L'extraction des molécules échangées, au niveau des arbuscules, entre les deux partenaires, était notre objectif initial. Parmi ces métabolites, se trouvent vraisemblablement des molécules échangées entre les deux partenaires ayant des propriétés de molécules signal capable de modifier l'expression des gènes du partenaire opposé. Elles présentent un grand intérêt biologique et scientifique. On suppose que certaines de ces molécules, circulant dans l'apoplasme racinaire, sont solubilisables et extractibles par rinçage dans l'eau. Dans le sens inverse, c'est de cette manière que la solution du sol parvient jusqu'aux cellules corticales des racines (voie apoplasmique). C'est par l'analyse des exsudats racinaires obtenus dans l'eau que les strigolactones ont par exemple été identifiées comme signaux symbiotiques de la mycorhization (Akiyama *et al.*, 2005; Besserer *et al.*, 2006). Dans un souci de limiter les perturbations du métabolisme des racines, l'exsudation a été réalisée avec le milieu de culture (milieu M) à la place de l'eau. Les racines, environ 4g (poids frais), sont introduites stérilement dans un Erlenmeyer contenant du milieu M et mises sous agitation pendant 24h. Afin de définir le bon volume de milieu M à utiliser ainsi que la meilleure agitation, différents tests ont été menés en faisant varier ces deux paramètres. Notre critère de sélection a été l'état de coloration des racines entre ces différentes conditions ; une teinte brunâtre indiquant une dégradation des tissus racinaires et une perturbation du métabolisme (Figure 2-2).

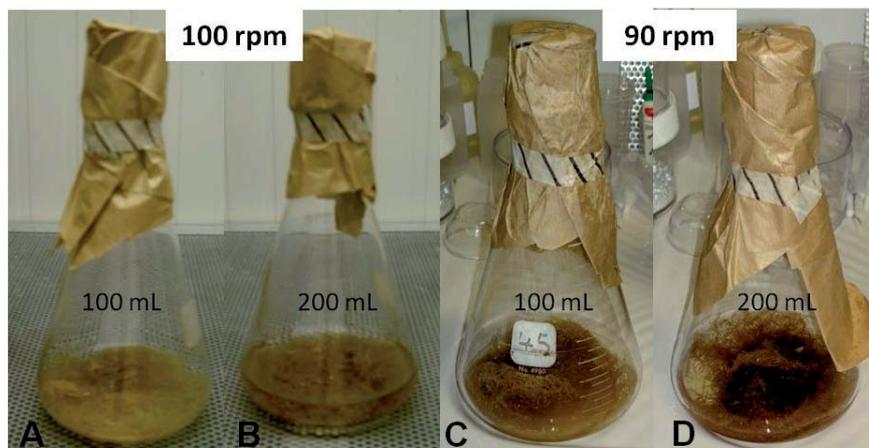
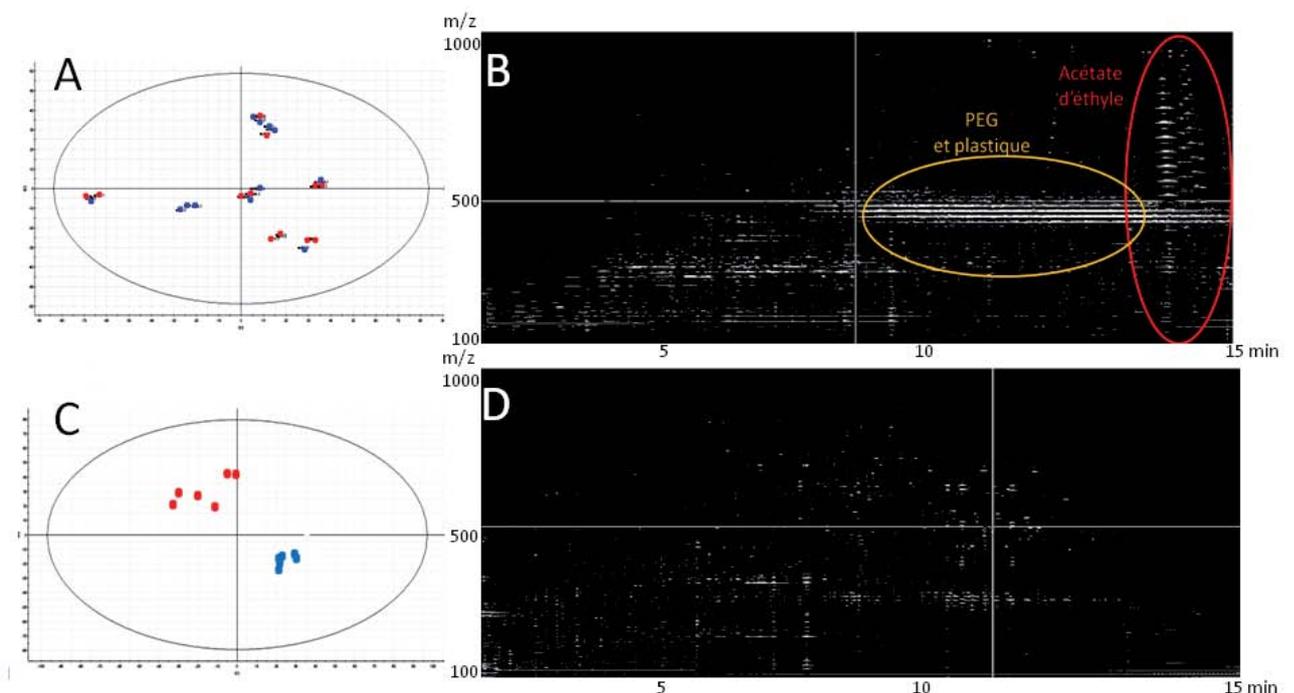


Figure 2-2 Photographies de racines de *M. truncatula* transformées en cours d'exsudation.

Différents tests ont été effectués avec quatre systèmes racinaires de *M. truncatula* transformés par *A. rhizogenes* par Erlenmeyer. Différents volumes de milieu M (100, 150 et 200 ml), quatre conditions d'agitation (80, 90, 100, 110 et 120 rpm) ont été testés. Les racines ont été mises à exsuder durant deux semaines avec un suivi d'apparition d'une coloration brunâtre, indiquant une dégradation de l'état physiologique des racines. Les photographies suivantes illustrent les différentes teintes obtenues. La comparaison entre les photographies A et B ou C et D permettent de voir l'influence néfaste d'une augmentation de volume. De la même façon l'agitation a une incidence, les racines à 90 rpm (C et D) sont d'avantage pigmentées que celles soumises à 100 rpm (A et B)

Pour amplifier la visualisation de l'impact de ces deux paramètres (agitation et volume de milieu M), l'exsudation a été prolongée sur deux semaines au lieu de 24h. Grâce à ces tests, nous avons déterminé que la meilleure condition d'exsudation s'obtenait avec 100 ml de milieu M et une agitation de 100 rpm. Les exsudats ont été filtrés pour éliminer les débris cellulaires puis extraits par extraction liquide-liquide avec un mélange eau et acétate d'éthyle (50/50). La phase organique a été concentrée puis injectée en LC-MS. Les profils chromatographiques obtenus ont montré une grande variabilité entre différents échantillons appartenant à la même condition. L'analyse en composante principale (ACP) ne permet pas de distinguer deux groupes d'échantillons (Figure 2-3).



**Figure 2-3** Analyse par LC-MS d'exsudat racinaire extrait à l'acétate d'éthyle et de broyat racinaire extrait au méthanol pur.

Représentation graphique de l'analyse en composantes principales (ACP), (A) de 12 échantillons d'exsudats racinaires extraits à l'acétate d'éthyle et (C) de 6 échantillons de broyats racinaires extraits au méthanol. Pour (A) et (C) chaque échantillon est analysé à deux reprises par UPLC-Q-TOF, les extraits de racines mycorhizées sont

représentés par des points rouges et non mycorhizées par des points bleus. Seul le graphe (C) fait apparaître deux groupes d'échantillons correspondant aux racines mycorhizées et non mycorhizées. (B) et (D) sont des chromatogrammes à trois dimensions avec en abscisse le temps de rétention (min), en ordonnée m/z et le contraste blanc sur noir indique le niveau d'intensité des ions détectés : d'un échantillon (B) d'exsudat racinaire extrait à l'acétate d'éthyle (D) d'un broyat de racine extrait au méthanol. Seul le chromatogramme (B) présente des ions caractéristiques du polyéthylène glycol (PEG), et des polymères, reliés à l'utilisation de l'acétate d'éthyle.

De plus, un bruit de fond important est observé dans les chromatogrammes, dont l'origine est attribuée au solvant, malgré l'utilisation d'acétate d'éthyle le plus pur (ou de grade le plus élevé). Dans l'hypothèse qu'une variabilité du pH entre différents exsudats soit à l'origine d'une perturbation lors de l'extraction liquide-liquide, le pH de chaque échantillon a été suivi, mais aucune variation significative n'a été observée. Le temps d'exsudation pouvant également être incriminé, il a été raccourci à une heure. Seulement peu de métabolites sont détectés en spectrométrie de masse. La transition entre un substrat solide et l'immersion dans une solution de milieu M provoque très certainement des changements métaboliques conséquents avec une réadaptation aux nouvelles conditions.

Malgré les atouts d'une extraction par exsudation dans notre démarche, ces observations ont montré qu'elle n'était pas compatible avec une approche d'empreinte métabolique qui repose sur la reproductibilité et la robustesse de la méthode. Par conséquent, une nouvelle stratégie d'extraction a été développée.

#### **2.2.1.2. Extraction des tissus racinaires au méthanol pur**

Dans le but de limiter l'impact de l'extraction sur le métabolisme des deux symbiotes, nous avons choisi de réaliser des broyats de tissus racinaires dans l'azote liquide puis de les extraire dans un faible volume de méthanol à température ambiante. Cette méthode a l'avantage de figer le métabolome, et de limiter les perturbations. Le choix du méthanol comme solvant est déterminé par sa capacité à extraire un large spectre de molécules biologiques à l'exception des plus apolaires. De plus, le volume de solvant utilisé pour l'extraction est divisé par 400 (1 ml au lieu de 400 ml dans le cas d'une exsudation). Lors de l'étape de concentration des échantillons, l'accumulation des contaminants provenant du solvant est largement minimisée et par voie de conséquence le bruit de fond est réduit (Figure 2-3).

Les racines sont tout d'abord partiellement broyées dans l'azote liquide afin d'obtenir un mélange homogène de fragments d'environ un centimètre ; une petite quantité étant prélevée pour déterminer le taux de mycorhization. Puis le reste est réduit en poudre. 150 mg de broyat (poids frais) sont introduits dans un tube en verre avant d'ajouter 1 ml de méthanol. Ce mélange subit trois fois une minute de sonication suivi d'une minute de vortex. L'élimination des débris cellulaires se fait par centrifugation à 6000 rpm, le surnageant est évaporé sous flux d'azote et conservé à -80°C. La reproductibilité de cette méthode d'extraction a été vérifiée par HPLC. Les profils chromatographiques obtenus avec des échantillons extraits à partir d'une même culture racinaire ou de différentes cultures sont similaires.

### **2.2.1.3. L'échantillonnage**

Dans les cultures, les racines sont repiquées au centre d'une boîte en présence ou non de spores de *Rhizophagus irregularis*. Après dix semaines de croissance, les tissus les plus âgés se situent au centre de la boîte et ont une teinte plus jaunâtre que ceux à la périphérie, plus jeunes. Suite à la mesure du taux de mycorhization de ces différentes zones, cette coloration jaune-orangé est corrélée avec une colonisation plus forte par le champignon MA. Une bonne homogénéisation du système racinaire est nécessaire avant de prélever des fragments de racines qui servent à déterminer le taux de mycorhization. Chaque échantillon se compose de cinq systèmes racinaires indépendants, soit le contenu en racine de cinq unités de production équivalent à 25 g de racines au total (poids frais), afin de moyennner les variations biologiques. Les analyses seront ensuite faites avec trois répétitions biologiques : 3 x 25 g de racines par condition (mycorhizées ou non).

## **2.2.2. Mise en place de la méthode analytique**

### **2.2.2.1. La plateforme analytique**

De multiples technologies peuvent être utilisées pour réaliser des profils métaboliques. En général, en amont d'un détecteur, les métabolites sont séparés en fonction de leurs propriétés physico-chimiques par des méthodes telles que l'électrophorèse capillaire (CE), la chromatographie liquide (LC) et la chromatographie gazeuse (GC). Quant aux détecteurs, les plus utilisés sont l'infra rouge (IR), la résonance magnétique nucléaire (RMN), les ultraviolets (UV), la fluorescence et la spectrométrie de masse (Sumner *et al.*, 2003). La sélection de la méthode analytique dépend de la sélectivité et de la sensibilité qu'offrent les différentes technologies. La détection par fluorescence est la technique la plus sensible mais elle est restreinte aux molécules fluorescentes. La spectrométrie de masse a également une bonne sensibilité mais un beaucoup plus large spectre de molécules détectables. La RMN est la technique la plus informative pour la détermination structurale des composés mais possède une sensibilité réduite par rapport à la spectrométrie de masse. En outre, l'analyse d'un mélange complexe nécessite l'utilisation d'une méthode de séparation comme la chromatographie liquide ou gazeuse pour augmenter la sélectivité. Généralement la GC/MS et la LC/MS sont les techniques les plus employées car elles offrent un bon compromis entre sensibilité et sélectivité.

L'analyse des métabolites présents dans les extraits racinaires a été réalisée à l'aide d'une Chromatographie Liquide Ultra Performance (UPLC) couplée avec un spectromètre de masse de haute résolution possédant une source d'ionisation par électrospray (ESI) et un analyseur de type quadripôle couplé à un temps de vol (Q-TOF). L'utilisation de l'UPLC augmente la sélectivité et la sensibilité par rapport à l'HPLC et un spectromètre de masse de type Q-TOF offre une haute résolution de masse indispensable pour l'identification de composés à partir de bases de données.

Lors de la chromatographie liquide, les molécules présentes dans l'échantillon analysé sont séparées en fonction de leur nature chimique, puis ionisées dans la source ESI et enfin les ions sont caractérisés par leur intensité et par leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ). Le couplage des types d'analyse permet d'obtenir un résultat en trois dimensions défini par le temps de rétention, l'intensité et le rapport  $m/z$ . Une baisse de signal est observée quand plusieurs molécules sont co-éluées et atteignent la source du spectromètre de masse au même moment. Ce phénomène s'explique par une compétition au niveau de l'ionisation de ces composés (King *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2002). Il est donc nécessaire d'ajuster les paramètres

chromatographiques pour augmenter le pouvoir de séparation des composés, tout en se plaçant dans des conditions en adéquation avec un couplage en spectrométrie de masse. De même, l'optimisation des réglages du spectromètre de masse permettra d'améliorer la sensibilité et la précision de mesure.

## 2.2.2.2. La chromatographie liquide

### 2.2.2.2.1. Description des principes chromatographiques

En chromatographie liquide, la capacité séparative d'une colonne, appelé « résolution chromatographique » ainsi que sa capacité à séparer un mélange complexe, dépendent du nombre de plateaux théoriques. Ils correspondent à une modélisation de la chromatographie selon laquelle chaque soluté se déplacerait progressivement en une suite d'étapes distinctes. La colonne de longueur L serait découpée en N petits disques fictifs de même hauteur H. Pour un disque donné, la concentration en soluté dans la phase stationnaire est en équilibre avec sa concentration dans la phase mobile. A chaque nouvel équilibre, le soluté a progressé d'un petit disque supplémentaire appelé plateau théorique. On définit ainsi la hauteur équivalente en plateaux théoriques HEPT ou H :

$$H = L / N \text{ (équation 1)}$$

Ce modèle issu de la mécanique des fluides a été mis au point par J.J. Van Deemter (1956).

En 1956, ce physicien a établi l'équation qui relie H (HEPT) aux caractéristiques physiques de la colonne et de la phase mobile :

$$H = 2\lambda d_p + 2GD_m/\mu + \omega(d_p \text{ or } d_c)^2\mu/D_m + Rd_f^2\mu/D_s \text{ (équation 2)}$$

$\lambda$  facteur de remplissage de la colonne,  $d_p$  diamètre des particules, G,  $\omega$ , et R des constantes,  $D_m$  coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile,  $d_c$  diamètre de la colonne,  $d_f$  épaisseur de la phase stationnaire,  $D_s$  coefficient de diffusion du soluté dans la phase stationnaire,  $\mu$  vitesse linéaire d'écoulement de la phase.

Elle peut être simplifiée en trois composantes (Figure 2-4):

$$H = A + B/\mu + C.\mu \quad (\text{équation 3})$$

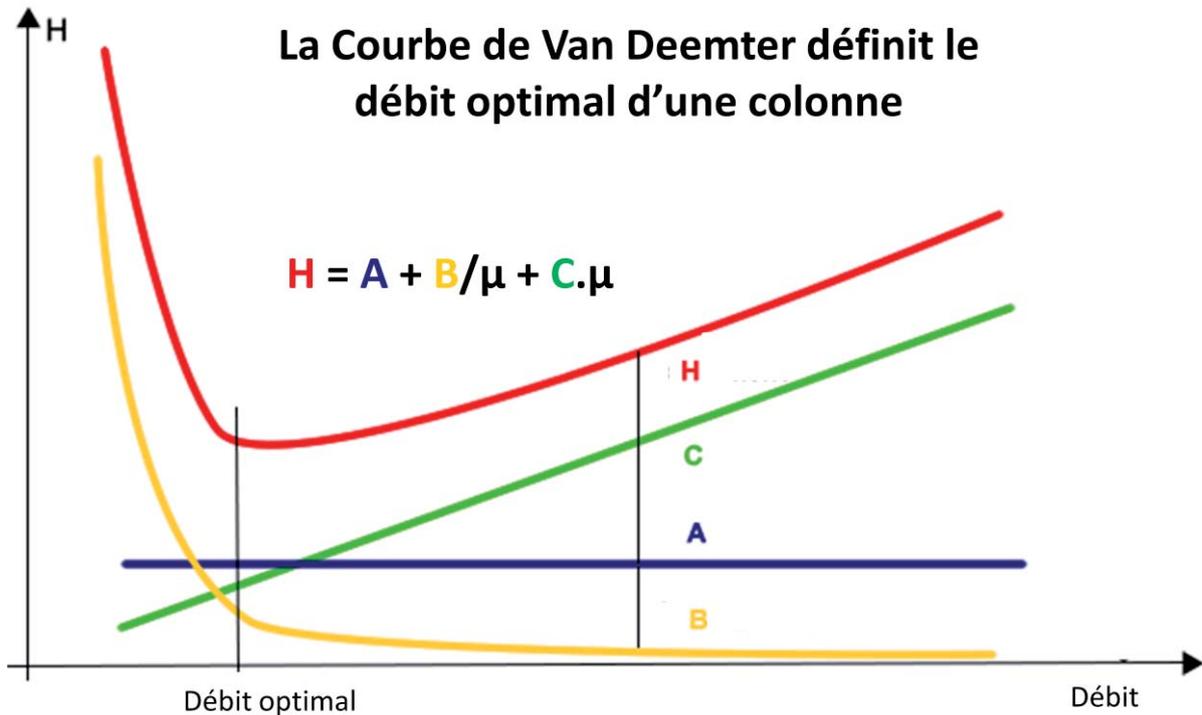
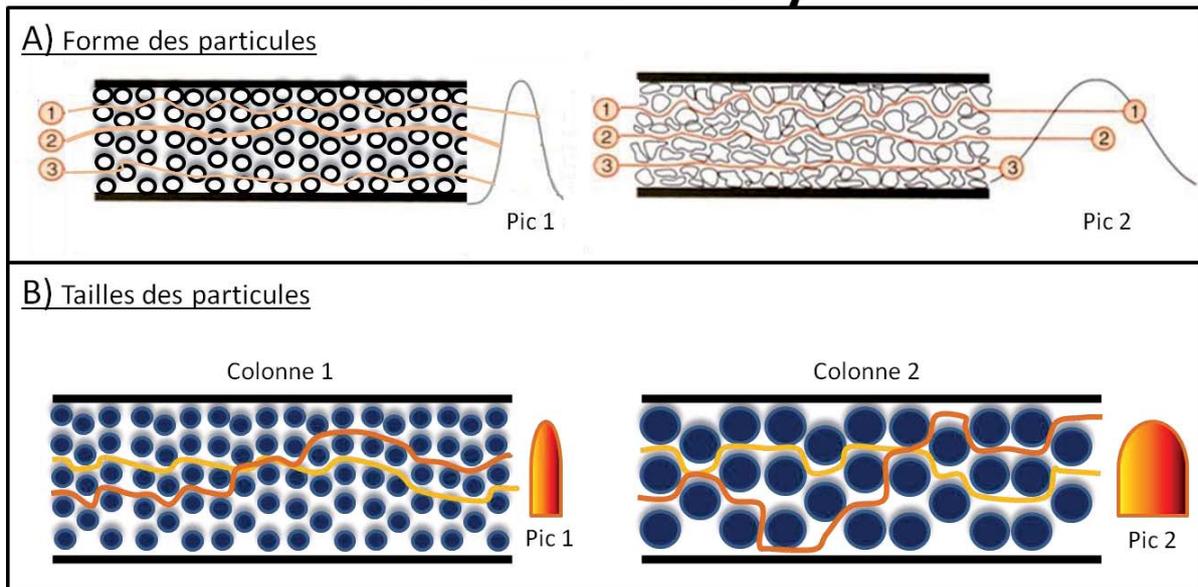


Figure 2-4 Equation de Van Deemter et courbes reliant la Hauteur en plateau théorique (H) d'une colonne donnée en fonction du débit d'élution.

En rouge la courbe de Van Deemter indique la hauteur en plateau théorique (H) d'une colonne en fonction de la vitesse linéaire d'écoulement du solvant ( $\mu$ ) qui est relié au débit d'éluant. Elle est la résultante des trois autres courbes définies par les trois termes de l'équation de Van Deemter: La courbe A correspond à la diffusion d'Eddy, la courbe B à la diffusion longitudinale et la courbe C aux équilibres d'interactions entre soluté et phase.

Le terme "A" correspond à la diffusion turbulente ou diffusion d'Eddy. L'écoulement d'un fluide au travers d'une colonne est perturbé par la présence d'obstacle (la phase stationnaire) qui provoque des turbulences, elles se manifestent par un changement de la vitesse d'écoulement. Si la taille et la forme des particules de la phase stationnaire sont hétérogènes, la vitesse d'écoulement de la phase mobile est irrégulière au travers de la colonne. Suivant les chemins empruntés par la phase mobile et l'analyte, le temps mis à parcourir la longueur de la colonne diffère. La diffusion d'Eddy contribue à l'élargissement des pics (Figure 2-5).

## Diffusion d'Eddy



**Figure 2-5** L'influence de la taille et de la forme des particules de la phase d'une colonne sur la diffusion d'Eddy.

Le pic 1 symbolise l'élution standard d'un composé sur une colonne avec une phase de taille et de forme homogènes contrairement au pic 2 moins résolutif avec une diffusion d'Eddy plus forte, le composé est dilué par rapport au pic 1. (B) De la même façon la taille des particules influe sur la diffusion d'Eddy, le pic 1 est plus résolutif que le pic 2.

Donc, plus les particules sont petites et plus le remplissage est homogène, plus l'efficacité de la colonne augmente.

Le terme " $B/\mu$ " traduit la tendance naturelle des molécules de solutés à se disperser c'est-à-dire à diffuser dans toutes les directions, cette dispersion est d'autant plus grande que le débit est faible. Dans un flux de liquide, les molécules sont entraînées par celui-ci limitant ainsi le phénomène de diffusion.

Le dernier terme " $C.\mu$ " traduit la résistance des solutés à se répartir à l'équilibre entre les deux phases. Plus le débit augmente, plus l'équilibre est difficile à atteindre, en cause l'apparition de turbulences et de gradients de concentration plus forts. Les colonnes les plus efficaces sont celles avec un petit diamètre interne qui sont remplies de façon homogène où le diamètre des particules de la phase stationnaire est le plus faible possible. L'équation de Van Deemter démontre que la performance d'une colonne à séparer un grand nombre de composés est principalement définie par la taille des particules qui composent la phase stationnaire (Figure 2-6).

## La Courbe de Van Deemter en fonction de la taille des particules d'une colonne

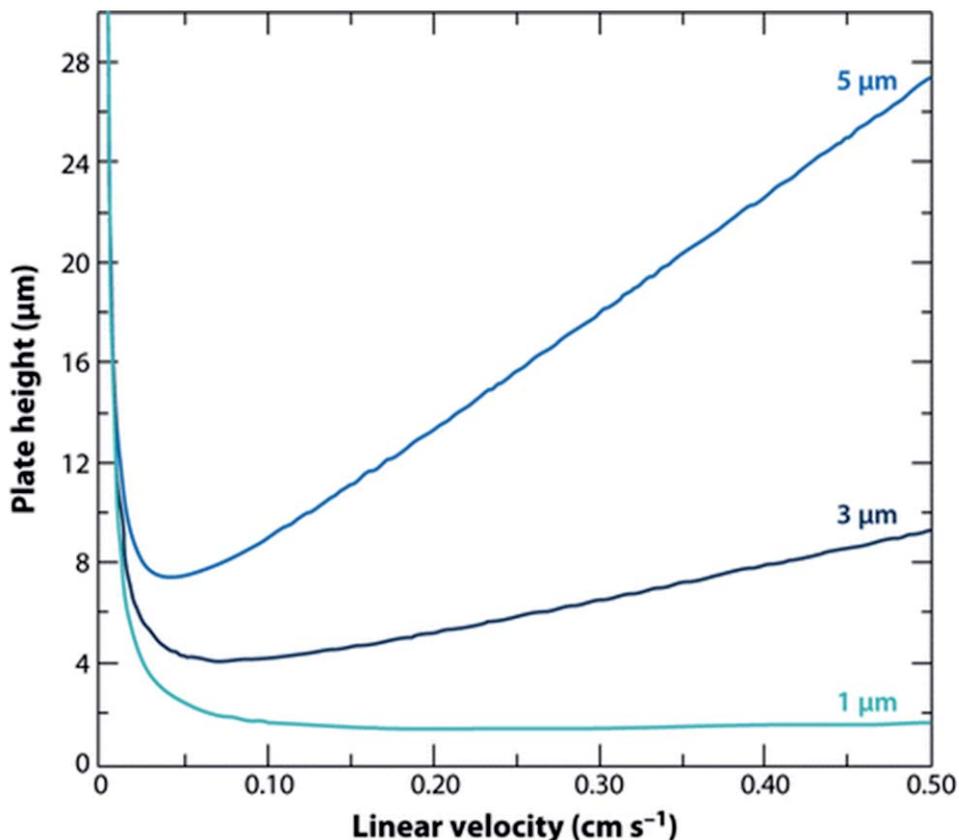
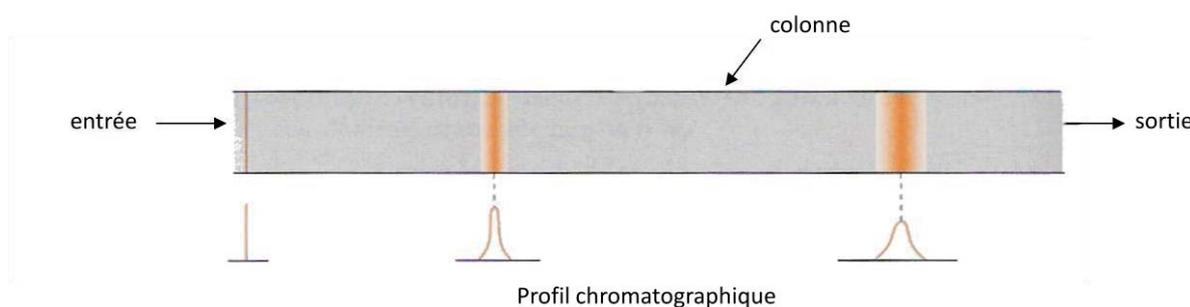


Figure 2-6 La diminution de la taille des particules d'une colonne augmente sa résolution. (D'après Jorgenson J.W., 2010)

Trois courbes de Van Deemter sont représentées sur ce graphique, elles caractérisent des colonnes qui diffèrent par la taille de leurs particules (5µm, 3µm et 1µm). Les hauteurs des plateaux théoriques diminuent avec le diamètre des particules de la colonne.

L'apport technologique de l'UPLC réside dans la conception de colonnes avec des particules de plus petite taille d'environ 1,7 µm contre 3 à 5µm en HPLC classique. En contrepartie, les pompes des systèmes UPLC doivent être capables de subir des pressions jusqu'à 1000 bars. En effet, le maillage de la phase stationnaire étant plus fin, l'écoulement du solvant au travers requiert une énergie plus importante. D'après l'équation 1, le nombre de plateaux théorique est proportionnel à la longueur de la colonne mais la diffusion des molécules définies par la composante B de l'équation de Van Deemter l'est également. Si la taille de la colonne est trop importante, le pic

chromatographique s'élargit et perd en intensité pénalisant ainsi la résolution (Figure 2-7).



**Figure 2-7 Profil chromatographique en fonction de la longueur de colonne**

En augmentant la longueur d'une colonne, le terme B de l'équation de Van Deemter s'accroît également. Le soluté se disperse longitudinalement au cours du temps. Une distance plus importante à parcourir au travers de la phase implique un temps de rétention plus élevé et une dispersion plus grande. En réduisant la distance parcourue par le soluté, le profil chromatographique s'affine et l'intensité augmente puisque l'aire du pic reste inchangée (même quantité de soluté).

#### 2.2.2.2. Optimisation des paramètres chromatographiques

La nature de la phase, le choix des solvants, le gradient imposé, le débit et la température de la colonne sont autant de paramètres chromatographiques à définir et à ajuster afin d'optimiser la séparation d'un mélange complexe. Dans un premier temps, les conditions utilisées ont été similaires à celles employées dans des travaux de métabolomique différentielle de tissus racinaires, utilisant les mêmes appareillages, c'est à dire un couplage UPLC-Q-TOF (Chan *et al.*, 2007; Dan *et al.*, 2008; Matsuda *et al.*, 2009a). Dans un deuxième temps, en fonction des résultats obtenus, des optimisations ont été apportées.

L'utilisation d'une colonne UPLC en phase inverse, plus particulièrement de type C18, semblait la plus adaptée à la nature des composés, de polarité intermédiaire, extraits par le méthanol. L'avantage d'utiliser ce genre de chimie de séparation réside dans l'abondance des références présentes dans la littérature. D'autres phases ont été testées (HILIC, amino, C8 et phényl) lorsque des molécules candidates ont été identifiées, pour comparer leurs comportements chromatographiques avec ceux de standards commerciaux.

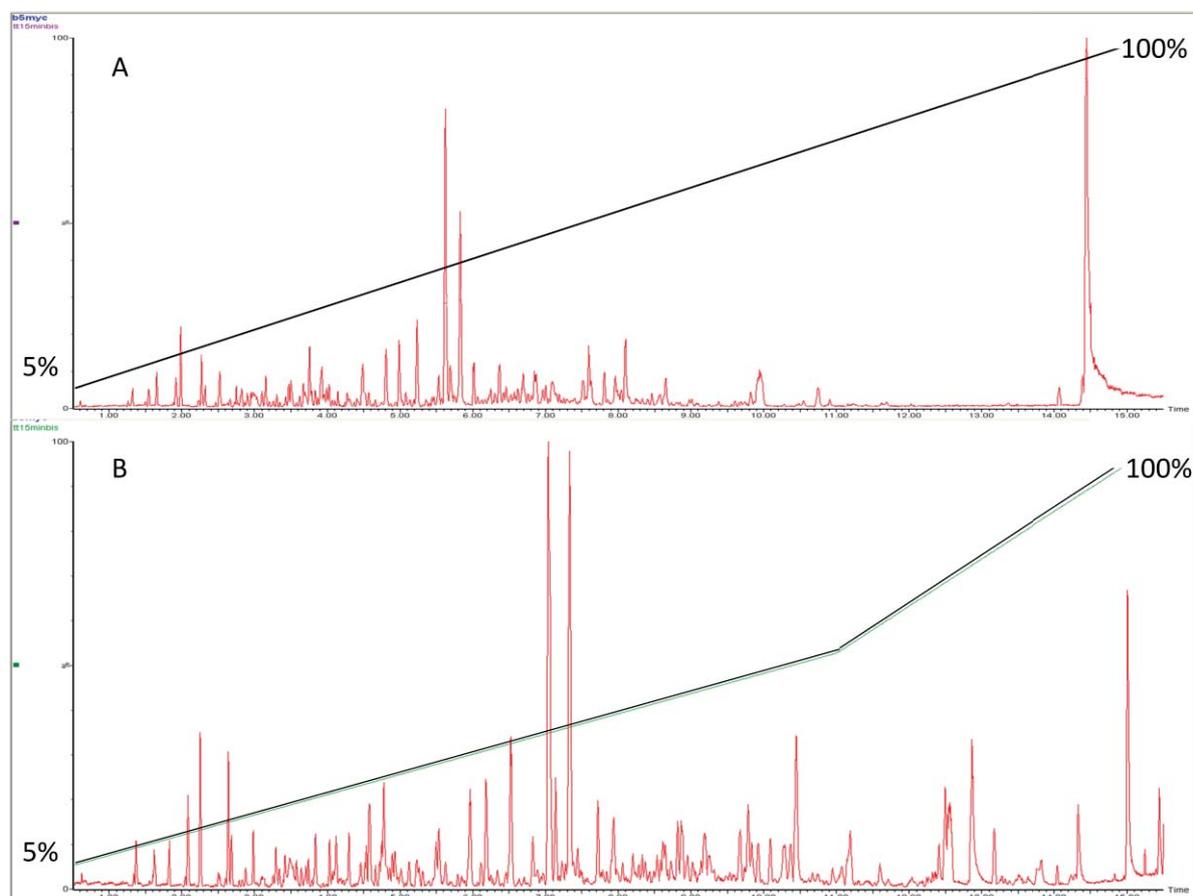
Aucune relation mathématique ne permet de décrire le comportement d'un composé en fonction des caractéristiques d'une colonne et des différentes conditions

chromatographiques. Afin d'améliorer la séparation, les différents paramètres sont testés, l'optimisation en chromatographie liquide se fait toujours de façon empirique. L'objectif a été d'obtenir une élution des composés sur l'ensemble du chromatogramme de façon à augmenter la résolution chromatographique.

#### 2.2.2.2.1. Les solvants et le gradient chromatographique

Les éluants classiquement employés en chromatographie liquide sont l'eau (A) et l'acétonitrile (B) dans lesquels sont ajoutés de l'acide formique à 0,05%. L'acidité des solvants contribue à la qualité chromatographique et favorise très significativement l'ionisation des molécules par ESI (ElectroSpray Ionisation).

Le premier gradient d'élution testé était linéaire, de 5% à 100% de B en 15 minutes, avec une température de colonne à 40°C et un débit de 0,4 ml par minute. Nous avons observé que la majorité des métabolites étaient élués dans la première partie du chromatogramme (Figure 2-8).



### Figure 2-8 Optimisation du gradient pour une meilleure résolution chromatographique.

Les chromatogrammes A et B représentent des acquisitions réalisées par UPLC-Q-TOF d'un extrait méthanolique de racines de *M. truncatula* mycorhizées sur une colonne C18. Le chromatogramme A correspond à une élution avec un gradient linéaire d'un mélange eau/acétonitrile avec 0,1% acide formique allant de 5% à 100% d'acétonitrile en 15 minutes. Le chromatogramme B décrit une élution avec un gradient à deux pentes, une première de 5 à 50% d'acétonitrile de 0 à 11 min et une seconde pente plus forte de 50 à 100% d'acétonitrile de 11 à 15 min.

D'autres gradients d'élution ont été testés afin « d'étaler » les éluions sur l'ensemble du chromatogramme, de façon homogène. Le gradient sélectionné se compose de deux parties : la première avec une faible pente (de 5 à 50% de B de 0 à 11 min) suivie d'une seconde partie dont la pente est plus forte (50 à 100% de B de 11 à 15 min). Ce gradient a permis de rééquilibrer l'allure générale du chromatogramme (Figure 2-8) avec une température de colonne à 40°C et un débit de 0,4 ml par minute.

La durée du gradient chromatographique a été optimisée, différents temps d'élution ont été testés (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 minutes). Comme attendu, un temps d'élution trop long amplifie le phénomène de diffusion, les pics s'élargissent signe d'une perte de résolution. La conséquence directe est une diminution de l'intensité des signaux. Un temps d'élution de 15 minutes est un bon compromis pour avoir une bonne séparation et des pics assez fins.

#### 2.2.2.2.2. Le débit chromatographique

En ce qui concerne le débit, la courbe de Van Deemter fournie avec la colonne, indique que la valeur optimale se situe autour de 0,7 ml par minute. Différents débits ont été appliqués, sur deux échantillons. Le nombre de pics détectés et dépassant une valeur seuil d'intensité, fixée arbitrairement à 1500 coups par spectre, augmente avec le débit ainsi que leur résolution chromatographique.

Effectivement ce paramètre influence fortement la diffusion et la dispersion du soluté dans la colonne. Malheureusement les valeurs permettant d'obtenir une résolution chromatographique optimale ne sont pas compatibles avec le spectromètre de masse en aval, à ce débit le spectromètre s'encrasse trop rapidement, la sensibilité

décroit au bout d'une dizaine d'injections. De plus, par injection directe d'une solution de leucine enképhaline (solubilisé dans 50% eau et 50% acétonitrile), utilisé comme molécule test, nous avons déterminé que la sensibilité maximale du spectromètre de masse a été optimale pour un débit de 0,1 ml par minute et une chute significative été observée au delà de 0,45 ml par minutes.

### **2.2.2.2.3. La température de la colonne**

Une hausse de la température du four de colonne entraîne une baisse de la viscosité, qui abaisse la pression et les turbulences dans la colonne. Les équilibres entre phase stationnaire et phase mobile sont plus rapidement atteints pour chaque soluté. Les termes A et C de l'équation 3 diminuent et participent au raccourcissement de la hauteur équivalente en plateaux théorique (HEPT). Toutefois, une température plus importante accroît la diffusion longitudinale à travers la colonne. Ce phénomène s'amplifie quand le débit optimal de la colonne n'est pas atteint. Une montée de l'agitation thermique exacerbe le terme B de l'équation 3, contrebalançant la réduction des termes A et C. De ce fait, une température trop élevée conduit à un élargissement des pics, alors qu'une température trop faible prolonge le temps de rétention menant aussi à un élargissement des pics chromatographique. Après avoir effectué différents tests, la valeur de 40 C° semble être un bon compromis.

### **2.2.2.3. La spectrométrie de masse**

#### **2.2.2.3.1. Description du fonctionnement des spectromètres et optimisation des paramètres**

##### **2.2.2.3.1.1. La source d'ionisation électrospray (ESI)**

Les appareils utilisés pour réaliser ces travaux sont un Q-TOF Premier™ (Waters) et un Q-TOF Maxis (Bruker) tous deux équipés d'une source à ionisation

par électro-nébulisation, ou ESI (ElectroSpray Ionisation). Ce type de source a été développé par J.B. Fenn (prix Nobel 2002) et a révolutionné la spectrométrie de masse, notamment dans le domaine de l'analyse de protéines. En effet, cette source permet de transformer directement des molécules d'un échantillon liquide en ions en phase gazeuse.

#### **2.2.2.3.1.1.1. Principe de l'électrospray**

La connexion entre la sortie de la colonne chromatographique et la source s'opère grâce à un tube de très faible diamètre interne (100 microns). Le volume mort est minimisé et limite le phénomène de diffusion longitudinale. Dans la source, la phase mobile traverse un capillaire métallique à l'extrémité duquel est appliquée une tension de plusieurs Kilovolts. Le courant électrique traverse le solvant et provoque son électrolyse, comme pour les molécules d'eau qui se dissocient et forment des ions hydroxydes ( $\text{OH}^-$ ) et des protons ( $\text{H}^+$ ), ces derniers s'associant aux molécules pour les ioniser. Lorsque les espèces ioniques émergent à la pointe du capillaire, elles suivent un mouvement électrophorétique en réponse au champ électrique imposé. Les ions de même polarité que le champ s'éloignent de la pointe tandis que les ions de polarité opposée au champ électrique refluent vers l'intérieur. Par conséquent, les ions de même polarité sont enrichis à la surface du liquide sortant du capillaire, par force électrostatique. La solution est expulsée pour former un cône dynamique, appelé « cône de Taylor ». Sous l'effet d'un flux d'azote coaxial chauffé, l'effluent liquide se transforme en nuage de fines gouttelettes (spray) qui sortent du capillaire avec une charge négative ou positive en fonction de la polarité de la tension appliquée.

Ce mode d'ionisation présente les avantages de fonctionner à basse température, à la pression atmosphérique et de transmettre peu d'énergie aux composés ce qui permet d'ioniser un grand nombre de molécules (polymères et biomolécules) sans rompre les liaisons covalentes. Les inconvénients majeurs de l'ESI sont une grande sensibilité aux sels, entraînant une suppression de signal et une faible ionisation des molécules les plus apolaires.

### **2.2.2.3.1.1.2. Le rendement d'ionisation en fonction du solvant**

Lors de la séparation en chromatographie liquide, l'élution des différents composés s'opère grâce à un gradient de solvant, le pourcentage d'acétonitrile dans la phase mobile augmentant au cours du temps. Or, le rendement d'ionisation de l'électrospray diminue en présence de solvants organiques, qui possèdent une faible conductivité du courant (Marginean *et al.*, 2007; Crotti *et al.*, 2011). Pour contrebalancer ce phénomène, une augmentation de la tension s'avère nécessaire. Hélas, les appareils utilisés ne permettent pas de réaliser un gradient de tension. Pour obtenir le rendement d'ionisation le plus efficace sur l'ensemble de l'analyse, le voltage utilisé correspondra à la valeur maximale pour laquelle il n'y aura pas l'apparition d'arc électrique avec la composition en solvant du début de gradient. Si la tension est trop élevée une décharge coronaire survient, l'air devient conducteur phénomène dû à une forte densité de charges, le rendement d'ionisation devient nul.

En fonction de la géométrie et de la structure de la source d'un spectromètre de masse, celui-ci a une sensibilité optimale pour une certaine gamme de débit de solvant. A l'intérieur de cette gamme de débit, les paramètres tels que le débit d'azote et sa température permettent d'optimiser la sensibilité de l'appareil. Les fabricants définissent les valeurs les plus adéquates en fonction des débits chromatographiques dans le cas de solvants largement utilisés comme l'eau et l'acétonitrile. Toutefois le flux d'azote et sa température en source ont été optimisés par rapport au débit chromatographique que nous avons définis précédemment (0,4 ml par minute).

### **2.2.2.3.1.1.3. Transfert des ions de la source vers le quadripôle**

Dans le cas des spectromètres utilisés, l'orifice qui sépare la partie de la source sous pression atmosphérique à celle sous un vide modéré ne se trouve pas dans l'axe du spray. L'application d'une seconde tension permet d'y transmettre les particules chargées et d'éliminer les autres. L'utilisation d'un trop fort gradient de

potentiel en source provoque une accélération des molécules. Elles acquièrent une grande énergie cinétique et sous un vide modéré, la collision avec l'azote fragmente les composés. A l'inverse, un trop faible gradient de potentiel affaiblit le taux de transmission des ions vers l'analyseur. Dans le but d'optimiser la sensibilité, différents tests ont été menés pour définir la valeur de tension qui favorise la transmission des ions sans entraîner de fragmentations moléculaires.

### **2.2.2.3.1.2. Les analyseurs (quadripôle et TOF)**

#### **2.2.2.3.1.2.1. Le quadripôle**

De la source d'ionisation, les ions produits sont transmis vers les analyseurs du spectromètre de masse. Le quadripôle est constitué de quatre électrodes parallèles soumises au même potentiel et dont les électrodes adjacentes ont des polarités opposées. Au cours du temps, leurs polarités s'alternent suivant une certaine fréquence. La trajectoire sinusoïdale d'un ion pénétrant dans le quadripôle se décrit par les équations de Mathieu (Baranov, 2003; Baranov, 2004; Ding et Kumashiro, 2006) selon la fréquence d'oscillation et la valeur du potentiel. Le quadripôle est un filtre à ions, dans notre application il sert simplement à définir une gamme de masse. Entre le quadripôle et le tube à temps de vol, se trouve la cellule de collision, composée de diverses lentilles. Elle permet de fournir de l'énergie aux ions sous forme d'énergie cinétique. Avec l'aide d'un flux de gaz de collision (azote ou argon), les molécules chargées peuvent être fragmentées. Dans le cas d'une analyse différentielle du métabolome, l'objectif est de caractériser la molécule entière, la fragmentation n'est pas souhaitée. La cellule de collision servira simplement de focalisateur d'ions pour améliorer la sensibilité de détection. Par contre, la fragmentation dans cette cellule sera utile dans le cadre de l'identification des métabolites, en mode MS/MS.

#### **2.2.2.3.1.2.2. Le tube à temps de vol (TOF)**

##### **2.2.2.3.1.2.2.1. Principe du TOF**

Une cellule de transfert accumule les ions avant leur entrée dans le tube à temps de vol où se situe le vide le plus poussé du spectromètre de masse. Les ions y acquièrent des vitesses élevées et par conséquent, les forces de frottement doivent être minimisées pour éviter toute fragmentation. Les vitesses de différents ions accélérés par un champ électrique dépendent de leurs masses selon l'équation de l'énergie cinétique :

$$E_c = \frac{1}{2} m v^2 \text{ (équation 4)}$$

( $E_c$  : énergie cinétique,  $m$  : masse de l'ion sur le nombre de charge qu'il porte et  $V$  : vitesse de l'ion)

La résolution de l'équation d'énergie cinétique permet de déterminer la masse sur charge des ions. Leurs vitesses sont calculées à partir de la mesure du temps qu'ils mettent à parcourir le tube à temps de vol dont la longueur est connue. La valeur de l'énergie cinétique est déduite en fonction de la tension appliquée pour générer le champ électrique responsable de l'accélération des ions.

#### **2.2.2.3.1.2.2. Vitesse d'acquisition, sensibilité et résolution chromatographique**

Dans le cas d'un spectromètre de masse à temps de vol, la vitesse de scan et la gamme de masse influent sur la sensibilité. La forte résolution chromatographique de l'UPLC se traduit par des pics chromatographiques très fins (d'une largeur de quelques secondes à mi-hauteur), ce qui impose une vitesse d'acquisition adaptée. La quantification relative de chaque métabolite s'établit avec l'intégration de son pic chromatographique. La précision de cette mesure est d'autant plus grande que le nombre de points qui définit le pic chromatographique est important. Cependant l'augmentation de la vitesse de scan induit une perte de sensibilité. En effet, l'acquisition d'un scan correspond à la somme de plusieurs milliers de spectres de masse, en diminuant leur nombre la sensibilité s'amenuise. Le rapport signal sur bruit d'un pic varie selon la racine carré du nombre de spectres de masses accumulés durant un scan. Dans le cas de notre étude, une dizaine de points par pic chromatographique s'est avérée un bon compromis entre sensibilité et précision de la quantification relative.

### **2.2.2.3.1.2.2.3. Gamme de masse et sensibilité**

Comme l'indique l'équation de l'énergie cinétique, la vitesse d'une molécule chargée dans le tube à temps de vol est reliée à sa masse, les plus lourdes sont les plus lentes et mettent plus de temps à parcourir la distance jusqu'au détecteur. Par conséquent, le temps d'enregistrement d'un spectre de masse est défini par la plus haute masse analysée. Cette masse influe sur le nombre de spectres sommés par scan, ce qui affecte la sensibilité. De plus, avant de subir une forte accélération orthogonale dans le tube à temps de vol les ions sont stockés dans une cellule de transfert linéaire, dont l'ordre d'entrée va des ions les plus légers au plus lourds. Si la gamme de masse est trop importante, alors les plus légers commencent à ressortir de cette cellule avant que les plus lourds n'y entrent. Pour permettre l'entrée de tous les ions de la gamme de masse sélectionnée dans cette cellule linéaire, l'accélération qu'ils subissent en amont doit être réduite. Il en résulte alors une perte de sensibilité due à une perte d'efficacité dans la focalisation des ions. Un gain de sensibilité est réalisé en réduisant au maximum la gamme de masse analysée. Suite à l'analyse d'un échantillon composé d'un mélange d'extraits racinaires mycorhizés et non mycorhizés (50/50), avec l'acquisition de spectres de 50 à 2000 m/z, nous observons que la grande majorité des pics sont détectés entre 100 et 1000 m/z. Par conséquent, nous avons délimité notre gamme de masse de 100 à 1000 m/z.

### **2.2.2.3.1.3. La calibration**

Pour une bonne précision de masse, la calibration du spectromètre est essentielle. Deux types de calibration sont réalisés dans nos travaux. Une première calibration, dite externe, permet d'étalonner l'analyseur de masse (TOF). Elle s'effectue avant l'analyse des échantillons, par injection de différents composés de masse connue. Pour les analyseurs de type TOF, une absence de linéarité est observée entre la vitesse des ions et leurs masses comme l'indique la loi de l'énergie cinétique. Afin de procéder à une calibration efficace, il est nécessaire de définir avec

une grande précision les variables de l'équation polynômiale d'ordre cinq définissant la courbe quadratique qui régit le comportement des ions dans l'analyseur (TOF). Cette courbe traduit l'augmentation et la diminution exponentielle de l'erreur de mesure en fonction, respectivement, des plus petits et des plus importants rapports masse sur charge. Pour cela, le calibrant choisi doit permettre d'obtenir un nombre important de points, répartis de façon homogène sur l'ensemble du spectre de masse. Dans notre étude, le calibrant utilisé est un mélange de sodium, de formate et d'acide acétique formant des clusters, couvrant un spectre de 50 à 1500 m/z par pas de 68 unités de masse. Au cours de l'analyse des différents échantillons, une seconde calibration, dite interne est accomplie. Ce procédé permet de corriger les déviations de masse apparues au cours du temps, conférant ainsi une meilleure précision de masse au spectromètre. En ce qui concerne le Q-TOF Premier™ (Waters), une précision de masse de 3 à 5 ppm (parties par million du rapport erreur de masse / masse de la molécule) est attendue avec la calibration interne, dont le calibrant est composé de leucine enképhaline, injectée toute les dix secondes dans la source par l'intermédiaire d'une deuxième voie, appelée « lock mass ». Pour le Q-TOF Maxis, une précision de masse d'environ 1ppm est attendue. La calibration interne est réalisée grâce à un coton hydrophobe imbibé de méthyl-stéarate et déposé dans la source, son évaporation au cours du temps permet d'obtenir un signal à 299 m/z sur tous les spectres.

#### **2.2.2.3.1.4. Contrôle de la qualité des analyses par injection de standards**

L'élaboration d'un mélange de standards s'est avérée nécessaire afin de contrôler le comportement chromatographique et celui du spectromètre de masse au cours du temps une fois les paramètres sélectionnés. Un mélange de 12 flavonoïdes a été constitué afin de couvrir une grande partie du chromatogramme (cf annexe). L'injection répétée de ce cocktail en début, au milieu et en fin d'une série d'échantillons offre la possibilité de superviser le déroulement de l'analyse et d'examiner si les temps de rétention, les aires des différents pics ainsi que la précision de masse sont constantes et uniformes au cours du temps. De plus, entre

chaque échantillon est injecté un blanc, constitué du même ratio eau/acétonitrile qu'en début de gradient, contrôle indispensable pour vérifier qu'une injection ne contamine pas la suivante.

### **2.2.3. Traitement des données**

Une étude différentielle du métabolome accompli par LC-MS génère une grande quantité de données. Au cours d'une analyse de 15 minutes, si le spectromètre de masse acquiert 3 spectres par seconde, au final 2700 spectres sont enregistrés et chacun d'eux se compose de plusieurs centaines de milliers de points. En multipliant ces données par le nombre d'échantillons, la quantité est telle que seule l'utilisation de logiciels sophistiqués permet de traiter ce flux d'informations. A partir des données brutes collectées par le spectromètre de masse, plusieurs plateformes de traitement des données sont nécessaires afin d'exploiter au mieux l'ensemble des données.

#### **2.2.3.1. Détection des pics chromatographiques et intégration**

La première étape du processus consiste à détecter l'ensemble des pics caractérisant les ions issus des métabolites présents dans les différents échantillons. Cependant, plusieurs types de bruits de fond, aléatoires et chimiques, viennent perturber la détection de ces signaux. Le bruit chimique est typiquement causé par des molécules provenant des solvants et des solutions tampons, se manifestant généralement en début et en fin d'élution (Hilario *et al.*, 2006). Par ailleurs, certains métabolites peuvent avoir des interactions chaotiques avec la phase stationnaire de la colonne chromatographique. Ils ne sont alors pas élués sous forme de pics et se diffusent au cours du temps, provoquant un bruit de fond chimique, également nommé effet matrice. Le bruit aléatoire, réparti de manière stochastique sur les spectres de masse est principalement attribué au détecteur. Pour faciliter la détection des vrais ions et limiter les faux positifs, différents traitements du signal permettent de réduire le bruit de fond. Néanmoins, ces processus peuvent altérer les données.

Pour la détection de pics, la stratégie la plus courante est basée sur la découpe des données LC-MS en de fines tranches de masse sur charge (entre 1 et 0,1 m/z), appelée « bucketing ». D'un chromatogramme en trois dimensions (masse sur charge, temps de rétention et intensité), processus permettant d'obtenir une multitude de chromatogrammes en deux dimensions (temps de rétention et intensité) plus facile à manipuler. Chacun d'eux est traité de façon indépendante. Un filtre Gaussien d'ordre deux est appliqué ; les points d'inflexion de chaque pic sont définis et permettent leur intégration. Divers filtres peuvent être ajoutés à la détection comme une valeur seuil d'intensité, la résolution chromatographique et / ou spectrale et bien d'autres.

### **2.2.3.2. Réalignement des pics chromatographiques**

La seconde étape du processus a pour but de réaligner les chromatogrammes des différents échantillons analysés les uns par rapport aux autres, dans le but de comparer par la suite tous les ions détectés dans chaque échantillon en fonction de leurs aires chromatographiques et leurs temps d'éluion. En chromatographie liquide, le temps d'éluion d'une molécule varie légèrement d'une injection à une autre, malgré l'utilisation de paramètres identiques. Cette variation est plus ou moins importante en fonction des caractéristiques de la colonne. Elle demande un réalignement des chromatogrammes de tous les échantillons analysés. Cependant, l'utilisation de l'UPLC permet une bonne répétabilité des temps d'éluion entre différentes injections. Dans le cadre de notre étude, sur cinquante injections consécutives, le plus grand écart observé est inférieur à une seconde. De ce fait, le réalignement des chromatogrammes n'est pas nécessaire, cette variation étant faible par rapport à la largeur d'un pic chromatographique d'environ 10 secondes. Dans le cas de l'utilisation de colonne de type HPLC, un réalignement est généralement nécessaire.

### **2.2.3.3. Normalisation des données**

La troisième étape du processus est la normalisation des données dont le but est de corriger et de minimiser les biais apparus lors de l'extraction, la préparation des échantillons et leurs injections en LC-MS. Les stratégies pour normaliser les données de profil métabolomique peuvent être divisées en deux classes. La première comprend l'utilisation de standards internes ou externe. L'intensité ou l'aire de ces standards doivent être identiques au cours des différentes acquisitions. Dans le cas contraire, un facteur de correction est appliqué à ces standards ainsi qu'à l'ensemble des pics. Une autre stratégie de normalisation consiste à utiliser les données dans leur globalité. L'ensemble des aires ou des intensités est sommé pour chaque acquisition, un facteur de correction est appliqué afin que toutes les sommes soit égales. La méthode de normalisation par l'utilisation de standards (interne ou externe) permet de suivre les biais subis par un seul métabolite (ou quelques métabolites) contrairement à la deuxième méthode qui prend en compte la globalité des données. Cependant, la normalisation selon la méthode « globale » repose sur l'hypothèse que la quantité totale des métabolites détectés est similaire entre tous les échantillons des différentes conditions analysées. Cette hypothèse devra être vérifiée avant de pouvoir utiliser cette méthode de normalisation.

#### **2.2.3.4. Détermination des ions discriminants**

La quatrième partie du processus consiste à classifier toute l'information obtenue pour l'ensemble des ions détectés en fonction de leur temps de rétention et leur aire (ou intensité) dans chaque échantillon. Les études de métabolomique génèrent des tableaux de données très complexes pour lesquels des outils statistiques appropriés sont requis afin d'isoler les ions caractéristiques des différentes conditions. Les analyses statistiques multi-variées et non supervisées comme l'analyse en composantes principales (ACP) fournissent des informations qualitatives sur les différents échantillons. Quant aux analyses supervisées de la famille des régressions des moindres carrés partiels comme les PLS (Partial Least Square), OPLS (Orthogonal Partial Least Square) et OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Square – Discriminant analysis), elles permettent de distinguer rapidement l'ensemble des ions discriminants (Wiklund *et al.*, 2008).

### 2.2.3.5. Logiciels de traitements des données

De multiples logiciels proposent de traiter les données issues d'analyses différentielles du métabolome, dont ceux proposés par les fabricants de spectromètres de masse comme MarkerLynx (Waters) et Metabolic Profiler (Bruker Daltonic) (Wiklund *et al.*, 2008). Des logiciels libres sont aussi disponibles comme XCMS, fonctionnant en langage R (Smith *et al.*, 2006), MZmine (Katajamaa *et al.*, 2006; Pluskal *et al.*, 2010), MathDAMP (Baran *et al.*, 2006) et metAlign (Lommen, 2009) ; cette liste n'étant pas exhaustive.

Dans le cadre de mon travail de thèse, j'ai testé et comparé plusieurs logiciels, toutefois le plus utilisé a été Markerlynx (Waters). Ce choix se justifie en partie par sa simplicité d'utilisation et d'autre part, ce logiciel est adapté aux types de données générées par l'UPLC et le Q-TOF Premier<sup>TM</sup>, puisqu'il est fourni par le constructeur de ces appareils.

### 2.2.3.6. Utilisation de Markerlynx

La détection des pics et leur intégration demeurent des étapes cruciales qui conditionnent la qualité de l'analyse dans sa globalité. La principale difficulté réside dans la définition de la frontière entre « bruit de fond » et « vrai signal ». Il est possible de jouer sur le seuil d'intensité, une valeur élevée abaissant la quantité d'artefacts intégrée et facilitant le traitement des données. En contrepartie, la couverture du métabolome exploré est plus étroite. Inversement, un seuil d'intensité trop bas, conduit à l'intégration du bruit de fond. Le traitement des données devient alors chaotique et les outils statistiques ne peuvent supporter des données contenant trop d'artefacts. Or le bruit de fond se répartit de façon inégale entre le début et la fin d'un gradient chromatographique, de même sur les spectres, la zone des masses les plus basses contient d'avantage de bruit chimique que celle des masses au-delà de 300 Daltons.

Dans ce travail, le seuil d'intensité est fixé à dix fois la valeur moyenne du bruit de fond calculée par le logiciel Markerlynx. Aucun filtre supplémentaire n'est appliqué pour éliminer le bruit de fond. La normalisation s'effectue selon la méthode globale, c'est-à-dire, l'ensemble des aires de chaque échantillon est sommé et un facteur de correction est appliqué afin que toutes les sommes soit égales. Préalablement, nous avons vérifié que la concentration d'une grande partie des analytes restait constantes entre les profils métaboliques de racines colonisées ou non par le champignon MA afin de justifier l'utilisation de la méthode de normalisation « globale ». La caractérisation des ions discriminants s'effectue par l'intermédiaire d'une analyse statistique de type OPLS-DA. Sa représentation graphique sous la forme d'un S-plot où chaque point est un ion, met en évidence les ions qui caractérisent chaque condition. La variable au niveau des abscisses correspond à la covariance de chaque ion. Elle est égale à zéro si l'ion est indépendant des deux conditions (mycorhizé et non mycorhizé). L'ordonnée indique le niveau de corrélation entre les valeurs des aires de chaque condition. Les zones aux extrémités du « S » représentent les ions les plus discriminants et avec les taux de confiance les plus élevés.

### **2.2.4. Illustration de la méthode d'analyse différentielle du métabolome**

La méthodologie mise en place et décrite dans ce chapitre a été appliquée à une analyse différentielle du métabolome de racine de pois cultivées dans de fortes ou de faibles concentrations en phosphate. Ce travail faisait suite à de récentes études menées au sein de l'équipe, qui montraient que de fortes concentrations en phosphate inhibaient la mycorhization au niveau de la formation d'hyphopodium, structure fongique permettant l'adhésion à une racine (Balzergue *et al.*, 2011). Les auteurs ont fait l'hypothèse de la présence de molécules d'origine végétale dans le milieu de culture, qui contrôleraient la différenciation des hyphopodia. L'analyse différentielle du métabolome a permis de mettre en évidence 28 molécules davantage présentes dans les racines cultivées avec peu de phosphate et seulement

4 pour de fortes concentrations en phosphate. Ces résultats ouvrent des perspectives et des pistes dans la recherche de molécules impliquées dans la régulation de l'initiation de la colonisation par le champignon MA.

Ce travail de métabolomique sur des racines cultivées sous deux régimes phosphatés a fait l'objet d'une publication présentée ci après :

## Metabolite profiling of pea roots in response to phosphate availability

Jérôme Lapparre,<sup>1,5</sup> Coline Balzergue,<sup>1,2</sup> Soizic Rochange,<sup>1,2</sup> Pascal Ludwiczak,<sup>3,5</sup> Fabien Letisse,<sup>3,5</sup> Jean Charles Portais,<sup>3,5</sup> Guillaume Bécard<sup>1,2</sup> and Virginie Puech-Pagès<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Toulouse; UPS; UMR 5546; Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales (LRSV); <sup>2</sup>CNRS; UMR 5546; BP 42617; <sup>3</sup>Université de Toulouse; INSA; UPS; INP; LISBP; Toulouse, France; <sup>4</sup>INRA; UMR792; Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés; Toulouse, France; CNRS; INRA; Toulouse, France; <sup>5</sup>CNRS; UMR5504; Toulouse, France

**Key words:** arbuscular mycorrhiza, phosphorus, metabolic profiling

**Abbreviations:** AM, arbuscular mycorrhizal; UHPLC, ultra high performance liquid chromatography; HR, high resolution; Q-TOF, quadrupole time-of-flight; MS, mass spectrometry; S/N, signal-to-noise; PCA, principal component analysis; OPLSDA, orthogonal partial least squares discriminant analysis

Submitted: 02/15/11

Accepted: 02/15/11

DOI: 10.4161/psb.6.6.15168

\*Correspondence to: Virginie Puech-Pagès; Email: puech@lrsv.ups-tlse.fr

Addendum to: Balzergue C, Puech-Pagès V, Bécard G, Rochange SF. The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events. *J Exp Bot* 2011; 62:1049–60. PMID: 21045005; DOI: 10.1093/jxb/erq335.

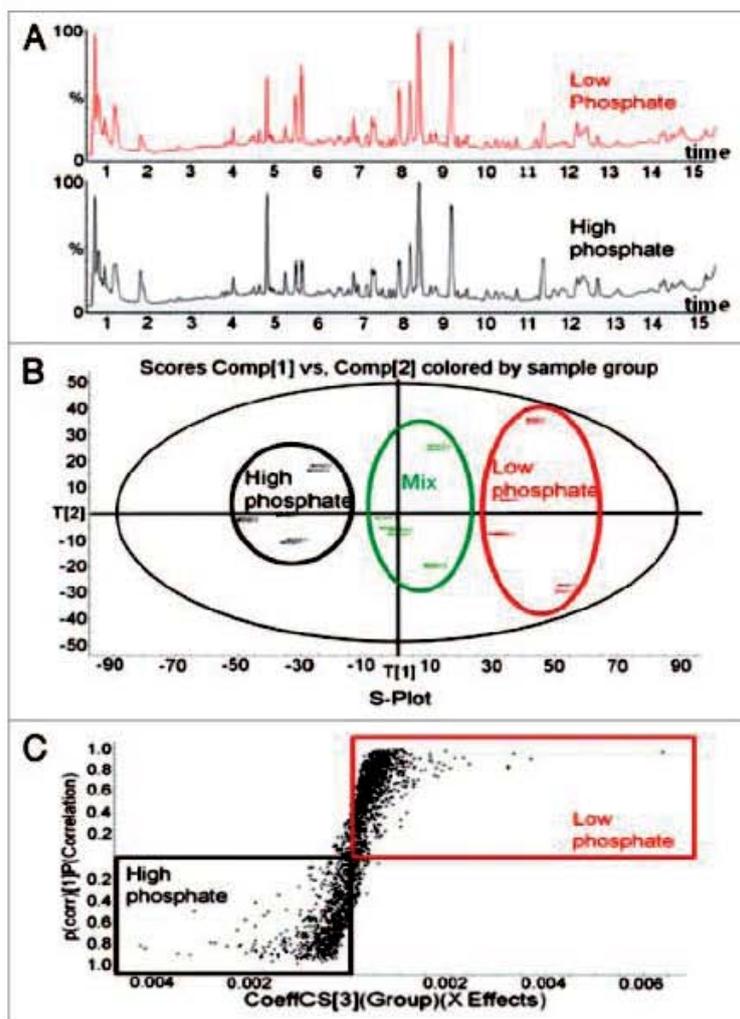
The arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis is a mutualistic association between soil fungi (Glomeromycota) and roots of most plant species. A recent study showed that high phosphate fertilization could inhibit mycorrhizal colonization at a very early stage, before hyphopodium formation. The authors proposed that inhibiting and/or stimulatory compounds might be present in roots grown under high phosphate or low phosphate, respectively. To further address this question, we performed metabolite profiling analyses of extracts of pea roots grown under low and high phosphate concentrations. Ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) was coupled with high resolution (HR) mass spectrometry (Q-TOF) and multivariate statistical analysis. This allowed the detection of 34 ions discriminating the two conditions. A majority (28 ions) were more abundant in roots grown under low phosphate concentration, and among them four were specific of this condition. The results suggest that the regulation of AM symbiosis by phosphate may involve the synthesis or accumulation of stimulatory compounds in roots grown under low phosphate.

In natural conditions most plants form root symbioses with arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. During symbiosis AM fungi provide plants with minerals (particularly phosphate) and water, and obtain in return photoassimilates. High phosphate levels in soil are known to inhibit AM symbiosis.<sup>1</sup> The mechanisms underlying this downregulation have

been investigated through transcriptomic approaches.<sup>2,3</sup> In addition, biochemical studies pointed towards the involvement of compounds selectively produced by roots according to phosphate availability and affecting fungal development.<sup>4</sup>

Recently, Balzergue et al. reported that the interaction between pea and two different AM fungi was almost completely abolished by high phosphate levels at a very early stage, prior to the formation of hyphopodia. In this experimental system, downregulation of AM symbiosis seemed to occur in response to systemic plant-derived signals rather than to local fertilization conditions, and a clear decrease of strigolactone root exudation was demonstrated. Nevertheless, supplementation experiments with exogenous strigolactones failed to restore root colonization under high phosphate. Taken together, these results suggest that the differentiation of hyphopodia is controlled by additional early molecules that could include inhibitors produced under high phosphate, and/or stimulators accumulated under low phosphate. In an attempt to investigate the identity of such molecules, we used a high resolution metabolomic profiling approach. Because roots contain a large number of metabolites with different physicochemical properties and concentrations, a global, powerful analytical approach has to be applied to maximize the number of detected compounds.

Our strategy was based on the coupling of ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) with high resolution (HR) mass spectrometry (Q-TOF), followed by multivariate statistical analysis.



**Figure 1.** Metabolite profiles of methanol extracts of pea roots grown under high and low phosphate. (A) Total ion current (TIC) chromatograms in UHPLC-HR-MS (Q-TOF) of high- and low-phosphate root extracts. UHPLC separation was performed on a BEH C18 column (2.1 x 150 mm, 1.7  $\mu$ m, Waters, Manchester). A two-step gradient (acetonitrile in water containing 0.1% formic acid) was applied at a flow rate of 0.4 ml/min from 10% to 50% in 11 min and 50% to 100% in 4 min. (B) Principal component analysis of duplicates of four extracts of each condition and of an equal mix of high- and low-phosphate extracts. (C) S-plot graphical view of Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis of extracts of high- and low-phosphate conditions.

The reduced particle size (1.4–1.7  $\mu$ m) of the packing material of UHPLC allows an excellent separation. Compared to high-performance liquid chromatography (HPLC), UHPLC provides narrower peaks and better peak resolution.<sup>6</sup> Coupled with UHPLC, the mass accuracy and resolution offered by high-resolution mass spectrometers provide valuable and reliable data for the discrimination of

the thousands of MS signals associated with the metabolites. Ion suppression is minimized, sensitivity and signal-to-noise (S/N) ratios are improved, relative quantification of any measurable m/z signal can be performed without compound annotation,<sup>7</sup> and powerful statistical analyses can be applied.

Methanol extracts were prepared from ground roots of four batches of three

one-month-old pea plants (*Pisum sativum* L., cv Terese), grown under high or low phosphate fertilization.<sup>5</sup> The selection of methanol as an extraction solvent was based on previous studies and literature data which indicate its good extraction ability for a broad spectrum of compounds, including most secondary metabolites.<sup>8</sup> Root extracts were analyzed in duplicate with a UHPLC-HR-MS (Q-TOF) device (Waters, Manchester, UK), using a C18 column and an acetonitrile/water elution gradient. The metabolic profiles—i.e., the overall chromatographic trace—of roots obtained under high and low phosphate did not show major changes, indicating that the most prominent metabolites remained the same in the two conditions (Fig. 1A).

The UHPLC-HR-MS data were further processed with Marker Lynx software (Waters, Manchester, UK). Principal component analysis (PCA) showed a clear separation of two groups of ions corresponding to the metabolites produced under low and high phosphate (Fig. 1B). Such clear-cut separation could be due to analytical or data processing artifacts. To address this possibility, a 1:1 mix of the low and high phosphate samples was prepared and subjected to chromatographic analysis. The PCA identified this mix as a third group halfway between the low and high phosphate groups (Fig. 1B), establishing the reliability of the method. These results clearly confirm the occurrence of discriminating signals between the two phosphate fertilization conditions.

An Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLSDA) was carried out to highlight the discriminating ions. The results are shown as an S-plot (Fig. 1C) where the discriminating ions appear in the upper right and lower left corners of the graph. Because a particular molecular species can be detected over multiple signals (m/z) corresponding to adduct ions or in-source fragmentation, only one parent ion per retention time was kept to estimate the number of differentially accumulated compounds.

A total of 34 discriminating ions (ratio >2 between the two conditions) were detected. Most of them (28 ions) were more abundant under low phosphate and among them four were specific. No ion

was exclusively found under high phosphate. Strigolactone-related ions could not be found, most likely because their detection requires extremely sensitive methods such as the Multiple Reaction Monitoring acquisition mode.<sup>9,10</sup> The discriminating compounds appear to be different from those identified by Nagahashi et al. on the basis of the corresponding ion masses (data not shown). This is not surprising since the two studies were based on very different experimental systems (pea root extracts obtained from whole plants grown under low or high phosphate vs. carrot root exudates produced by hairy roots grown with or without phosphate). In addition the present study targets more specifically early signaling events in AM symbiosis.

The present data provide preliminary evidence that the availability of phosphate in soil has a clear incidence on pea root metabolism. They highlight the potential of UHPLC-HR-MS based metabolomics as an unbiased approach to identify compounds regulating the differentiation of hyphopodia. Among the 34 discriminating ions, there are more ions (metabolites) produced under low phosphate, both

quantitatively (28 compared to four over-produced ions) and qualitatively (four compared to zero newly produced ions). These results suggest that the negative regulation of AM symbiosis under high phosphate might result from a negative regulation of stimulatory compounds, rather than from the production of inhibitors. Prior to their chemical identification, the four ions exclusively present in low phosphate will now be accumulated, collected and tested for potential activity as positive regulators of the AM symbiosis.

#### Acknowledgements

Laparre J. was supported by a University of Toulouse Ph.D. fellowship. The mass spectrometry devices were made available to us by the Institut des Technologies Avancées du Vivant and the MetaToul Platform (Toulouse, France). We thank Saida Danoun and Sylvie Fournier for providing technical expertise and assistance for LC MS analysis.

#### References

1. Smith SE, Read D. *Mycorrhizal Symbiosis*. London: Academic Press 2008; 3.
2. Harrison MJ. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Microbiol* 2005; 59:19-42.
3. Breuillin F, Schramm J, Hajirezaei M, Ahkami A, Favre P, Druge U, et al. Phosphate systemically inhibits development of arbuscular mycorrhiza in *Petunia hybrida* and represses genes involved in mycorrhizal functioning. *Plant J* 2010; 64:1002-17.
4. Nagahashi G, Douds DD, Ferhatoglu Y. Functional categories of root exudate compounds and their relevance to AM fungal growth. In: Koltrai H, Kapulnik Y, Eds. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*, 2<sup>nd</sup> Ed. New York: Springer 2010; 33-56.
5. Balzergue C, Puech-Pages V, Bécard G, Rochange SF. The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events. *J Exp Bot* 2011; 62:1049-60.
6. Buescher JM, Moco S, Sauer U, Zamboni N. Ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for fast and robust quantification of anionic and aromatic metabolites. *Anal Chem* 2010; 82:4403-12.
7. Toh DF, New LS, Koh HL, Chan EC. Ultra-high performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry (uhplc/tofms) for time-dependent profiling of raw and steamed panax notoginseng. *J Pharm Biomed Anal* 2010; 52:43-50.
8. Lu W, Kimball E, Rabinowitz JD. A high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantitation of nitrogen-containing intracellular metabolites. *J Am Soc Mass Spectrom* 2006; 17:37-50.
9. Gomez-Roldan V, Fremas S, Brewer PB, Puech-Pages V, Dun EA, Pillot JP, et al. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 2008; 455:189-94.
10. Yoneyama K, Xie X, Sekimoto H, Takeuchi Y, Ogasawara S, Akiyama K, et al. Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from Fabaceae plants. *New Phytol* 2008; 179:484-94.

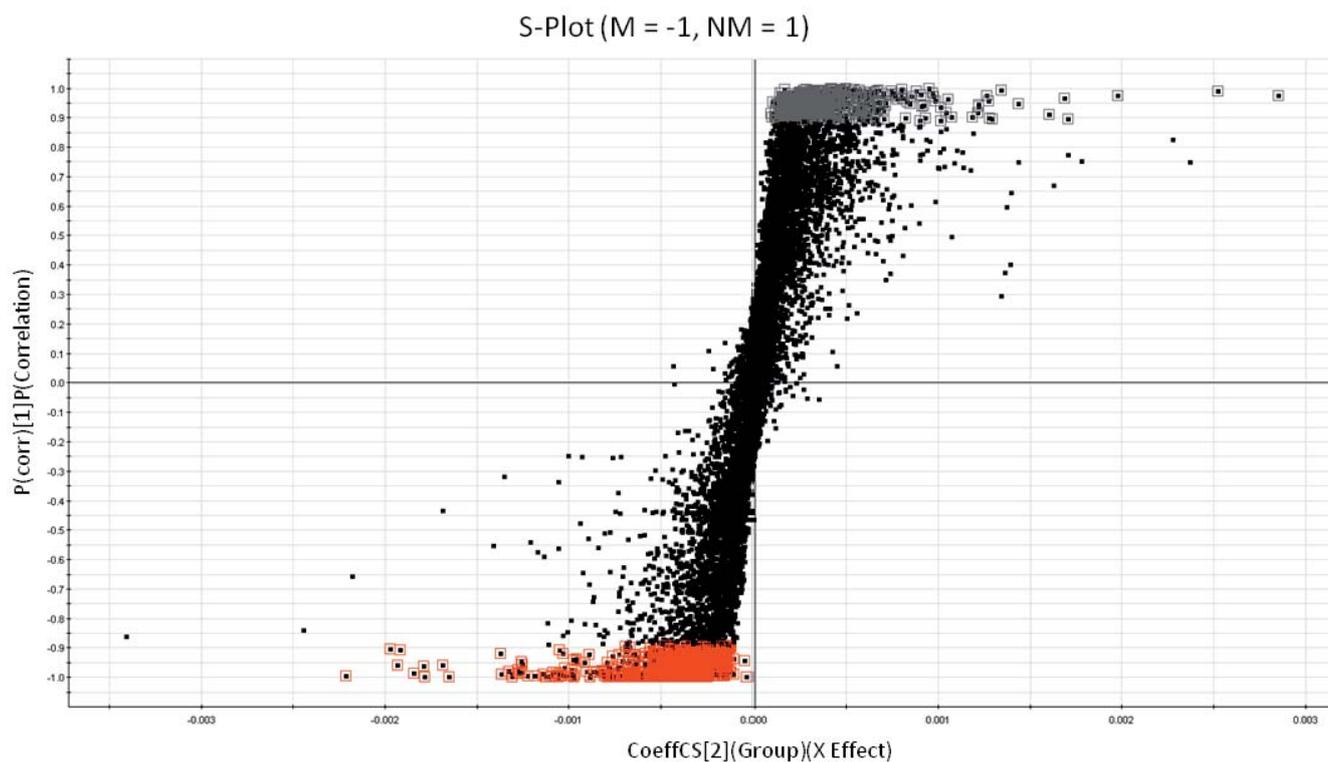
### **3. CHAPITRE 2 : LES RESULTATS**

Les résultats de ce chapitre sont actuellement soumis pour publication dans la revue *Molecular Plant* : Search of arbuscular mycorrhizal signals involved in late symbiotic stage ; Jérôme Laparre, Mathilde Malbreil, Fabien Letisse, Jean Charles Portais, Christophe Roux, Guillaume Bécard, et Virginie Puech-Pages.

#### **3.1. L'analyse différentielle du métabolome**

Trois échantillons indépendants (correspondant à des répétitions biologiques) de racines mycorhizées et non mycorhizées, ont été constitués chacun à partir de cinq unités de production (voir Chapitre 1). Chaque unité de production produisant environ 5 g de racines, approximativement 25 g de racines non mycorhizées et mycorhizées, ont été réduits en poudre pour chaque échantillon par broyage dans l'azote liquide puis extraits au méthanol (100%). Le taux de mycorhization des trois échantillons de racines mycorhizées a été estimé à 51%, 49% et 49%.

Pour l'analyse différentielle du métabolome, chaque échantillon a été réalisé à partir de 150 mg de racines fraîches, suivant la méthode décrite au Chapitre 1. Lors de la mise en place de la méthode du traitement des données (Chapitre 1), le seuil de détection des ions avait été fixé à dix fois le bruit de fond moyen. Pour augmenter la sensibilité de l'analyse, ce seuil a été abaissé par trois provoquant une augmentation du nombre de faux positifs. Contrairement à la méthode décrite dans le Chapitre 1, des acquisitions supplémentaires ont été nécessaires pour valider une partie des données. Après analyse des données par OPLS-DA, les ions sélectionnés comme les plus discriminants représentent les points du S-plot avec des valeurs de corrélation en ordonnée comprises entre 0,9 et 1 (Figure 3-1).



**Figure 3-1 Le S-Plot est la représentation graphique de l'analyse par OPLS-DA des données acquises par UPLC-Q-TOF de trois échantillons indépendants de racines mycorhizées et non mycorhizées**

Chaque point représente un ion détecté en LC-MS. Les ions se répartissent sur l'axe des abscisses en fonction de leur spécificité à une des deux conditions. Les ions les plus caractéristiques de racines mycorhizées sont les points les plus à gauche. L'ordonnée indique le pourcentage de corrélation entre les ions détectés dans les différents échantillons d'une même condition par rapport à l'autre condition. Les points encadrés par un carré rouge sont tous les ions caractéristiques de racines mycorhizées et avec un pourcentage de corrélation compris entre 1 et 0,9.

A ce stade, 532 ions ont été criblés comme d'avantage ou exclusivement présents dans les extraits de racines mycorhizées. Plusieurs étapes, manuelles pour la plupart, ont permis la sélection parmi cette liste des ions les plus pertinents pour lesquels des tentatives de détermination de formule brute voire de détermination structurale ont ensuite été menées (Figure 3-2).

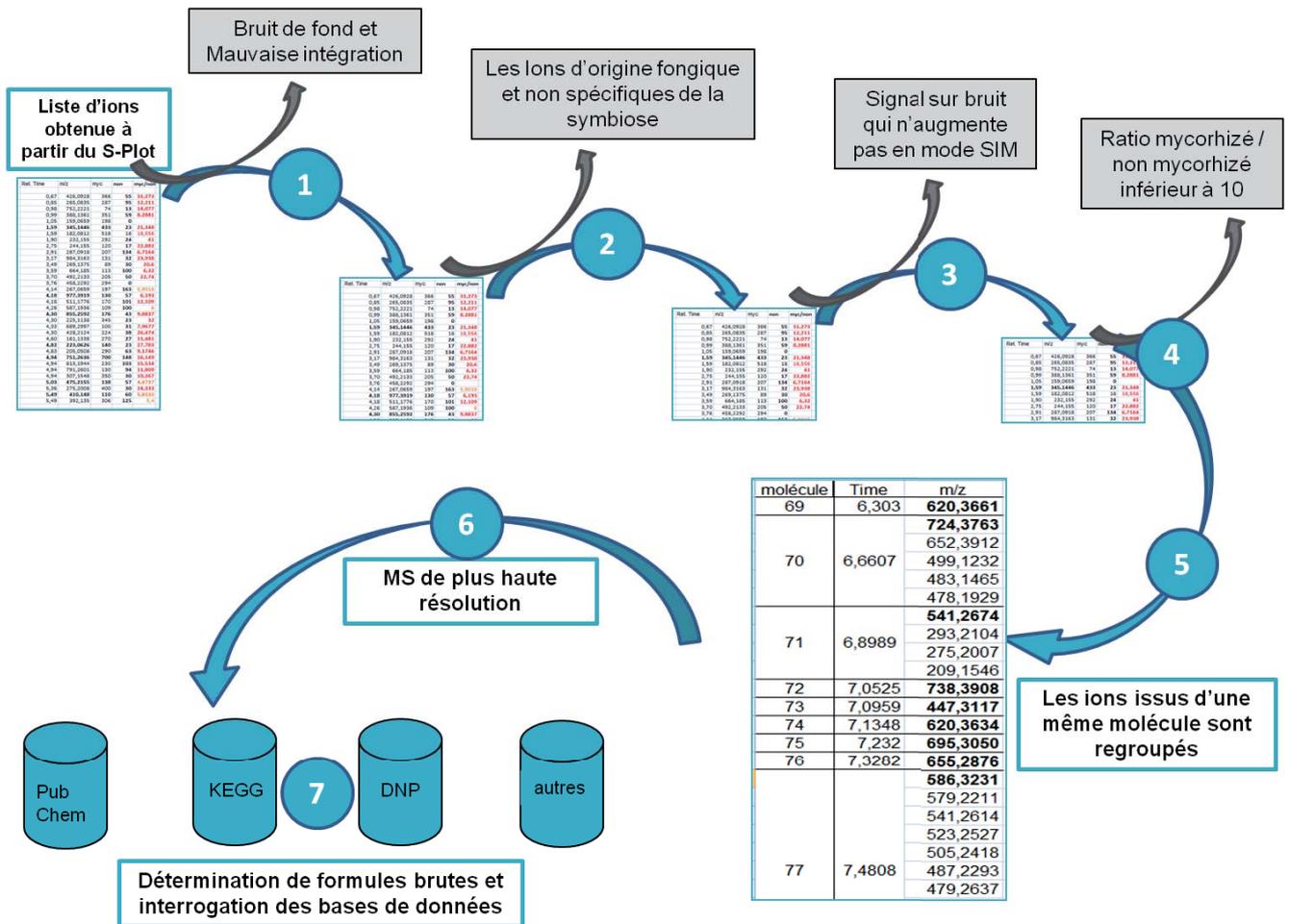


Figure 3-2 Schéma de l'ensemble des étapes du processus de sélection des ions discriminants les plus pertinents jusqu'aux tentatives d'indentification structurale.

La sélection des ions caractéristiques de la symbiose mycorhizienne se déroule en sept étapes distinctes : (1) Elimination des signaux issus du bruit de fond et d'une mauvaise intégration, (2) exclusion des ions fongiques non spécifiques de la symbiose, (3) nouvelles acquisitions en mode pseudo-SIM pour augmenter le signal sur bruit des ions faiblement détectés afin de confirmer ou d'infirmer leur pertinence, (4) sélection en fonction du rapport mycorhizé / non mycorhizé, (5) identification et regroupement des ions issus d'un même métabolite, (6) nouvelles acquisitions sur spectromètre de plus haute résolution et (7) détermination de formules brutes afin d'interroger les bases de données.

### 3.1.1. Sélection des ions les plus discriminants

#### 3.1.1.1. Elimination des faux positifs et des adduits

Tous les ions sélectionnés subissent une vérification manuelle à partir des données brutes. Pour cela des appels d'ions sont réalisés pour chacun des six échantillons. La visualisation des chromatogrammes obtenus permet d'apprécier la

qualité de l'intégration et d'éliminer la présence de faux positifs. La grande majorité des ions exclus représente des intégrations du bruit de fond de type chimique. Les adduits sont également écartés, mais leur nombre est restreint avec une dizaine d'adduits sodium.

### **3.1.1.2. Elimination des ions les moins caractéristiques de la symbiose**

Pour identifier des métabolites vraiment caractéristiques de l'état symbiotique, nous n'avons sélectionné que les ions qui présentaient des concentrations au moins 10 fois plus élevées dans les échantillons de racines mycorhizées. Certains de ces ions n'ont pas du tout été détectés dans les racines non mycorhizées (environ un tiers des ions). Après ce filtre, 213 ions ont été conservés pour les études ultérieures.

### **3.1.1.3. Elimination des ions d'origine fongique**

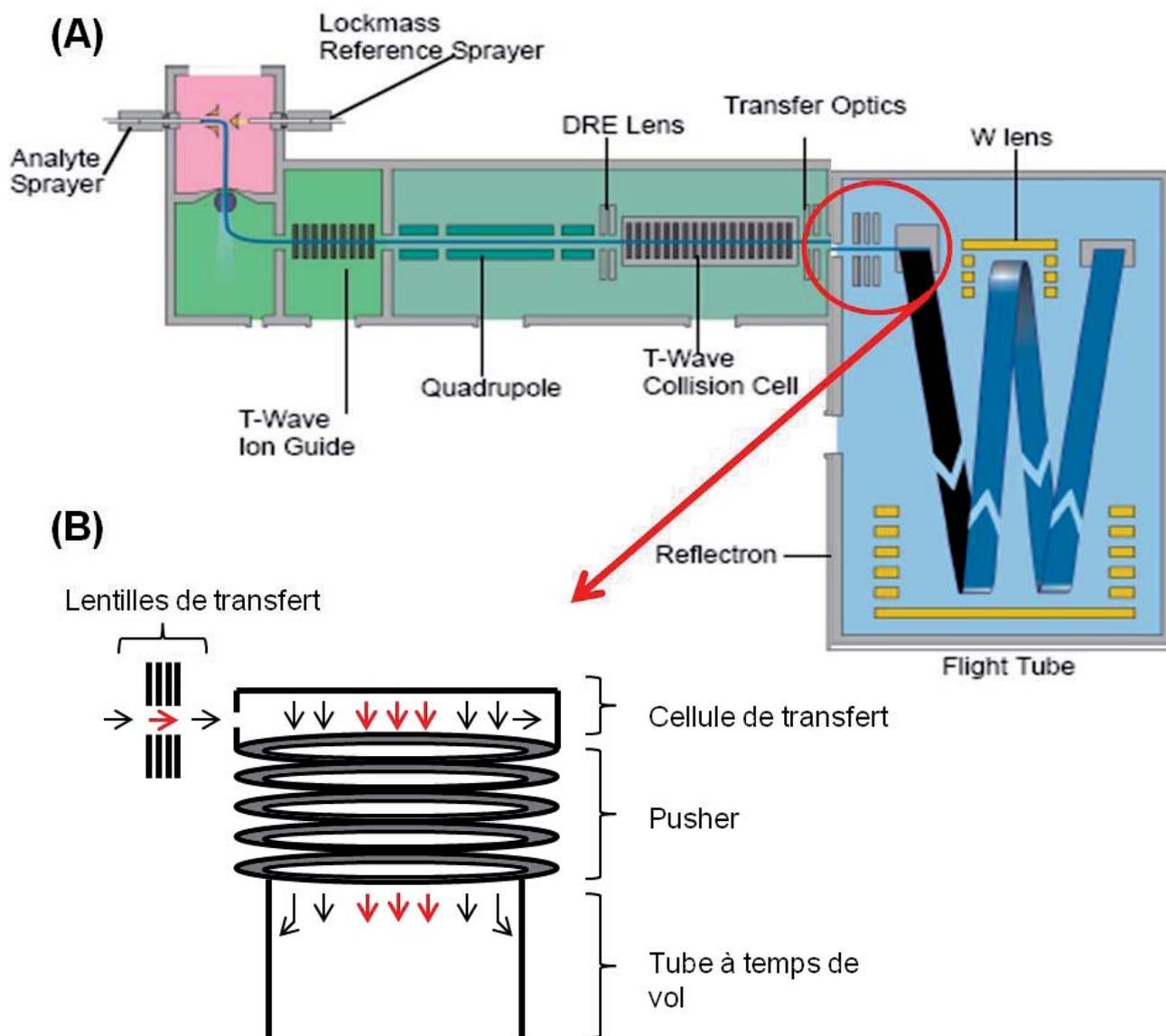
Dans cette analyse, les métabolites des extraits de racines mycorhizées proviennent de deux organismes, la plante et le champignon *in planta*. Dans la comparaison des métabolomes obtenus à partir des racines mycorhizées et non mycorhizées, nous avons choisi de ne pas considérer les métabolites fongiques déjà produits lors des phases non symbiotiques (spores seules ou spores germées). Des extraits méthanoliques de spores non germées ou en germination (7 jours dans le milieu M) ont donc été analysés de la même façon que les échantillons de racines. Quinze ions ont été détectés à la fois dans les racines mycorhizées mais aussi chez le champignon MA seul, que l'on a donc ensuite écartés. Ce nombre d'ions d'origine fongique produit de façon constitutive peut paraître faible mais il s'explique par la nature biochimique des spores de champignons AM et par la méthode d'extraction employée. Une spore se compose essentiellement de plusieurs couches de paroi et de réserve en carbone sous forme lipidique, l'ensemble représentant 50 à 75% de sa masse (Beilby *et* Kidby, 1980). Les hyphes lors de la germination sont également très riches en lipides (Bago *et al.*, 2002). Or, notre processus analytique ne permet pas d'observer les métabolites les plus hydrophobes comme les lipides. D'autres

technologies comme la GC-MS ou l'utilisation d'une source à ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) seraient plus adaptée à la détection de ces composés (Dunn *et al.*, 2005; Lytovchenko *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2011).

Avec le protocole utilisé, tout ion fongique spécifique de l'état symbiotique sera donc bien inclus dans notre analyse, mais parmi tous les ions associés à la mycorhization on ne pourra pas distinguer ceux provenant d'un analyte végétal ou fongique.

#### **3.1.1.4. Validation des ions discriminants de faible intensité**

Pour lever les incertitudes concernant les ions discriminants de faible intensité, une vérification de leur présence dans les deux conditions a été menée grâce à de nouvelles analyses en mode « Pseudo-Single Ion Monitoring » (Pseudo SIM) visant à augmenter la sensibilité et le rapport « signal sur bruit » (S/N) des ions concernés. Au niveau du spectromètre de masse, les tensions appliquées sur le quadripôle sont ajustées pour optimiser la transmission de chaque ion analysé, selon le diagramme de stabilité de Mathieu (Baranov, 2003; Baranov, 2004; Ding *et* Kumashiro, 2006). L'ion sélectionné a une trajectoire stable à travers le quadripôle, la quantité d'ion transmis augmente par rapport à un mode dit « full scan » correspondant à une analyse des ions sur une gamme large de 100 à 1000 m/z. De plus, sur des spectromètres de masse de type Q-TOF, un gain non négligeable de sensibilité peut être obtenu au niveau de la cellule de transfert des ions en amont du tube à temps de vol. Cette cellule linéaire stocke dans des temps extrêmement brefs les ions avant qu'ils ne subissent une forte accélération orthogonale dans le « pusher » (succession de lentilles à l'entrée du tube à temps de vol). Selon le temps d'accumulation, la position des ions dans cette cellule diffère en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Dans le cas d'une acquisition pseudo SIM, les paramètres sont adaptés pour que l'ion analysé se trouve au centre de la cellule. Ainsi la quantité d'ion pénétrant dans le tube à temps de vol augmente, leur transmission jusqu'au détecteur s'améliore grâce à cette trajectoire bien centrée (Figure 3-3).



**Figure 3-3** Transfert des ions dans un spectromètre de masse de type Q-TOF et gain de sensibilité au niveau du TOF.

Schéma général du parcours des ions à l'intérieur du Q-TOF premier (Waters). (B) Schéma du transfert des ions entre la cellule de collision et le tube à temps de vol. Les flèches symbolisent le parcours des ions, les flèches rouges représentent la trajectoire des ions dont la transmission est optimale, en fonction des tensions appliquées sur les lentilles de transfert et du temps d'accumulation des ions dans la cellule de transfert. Avant la forte accélération orthogonale, les ions se positionnent en fonction de leur masse sur charge dans la cellule de transfert. Au moment de l'accélération provoquée par le pusher, les ions au centre de la cellule de transfert ne subissent pas de perte par collision avec la paroi du tube à temps de vol.

En moyenne le gain du signal sur bruit est d'un facteur cinq à dix par rapport à un mode full scan. Une acquisition en mode pseudo-SIM permet de suivre plusieurs ions à la fois, les paramètres d'acquisition pouvant être modifiés au cours du temps.

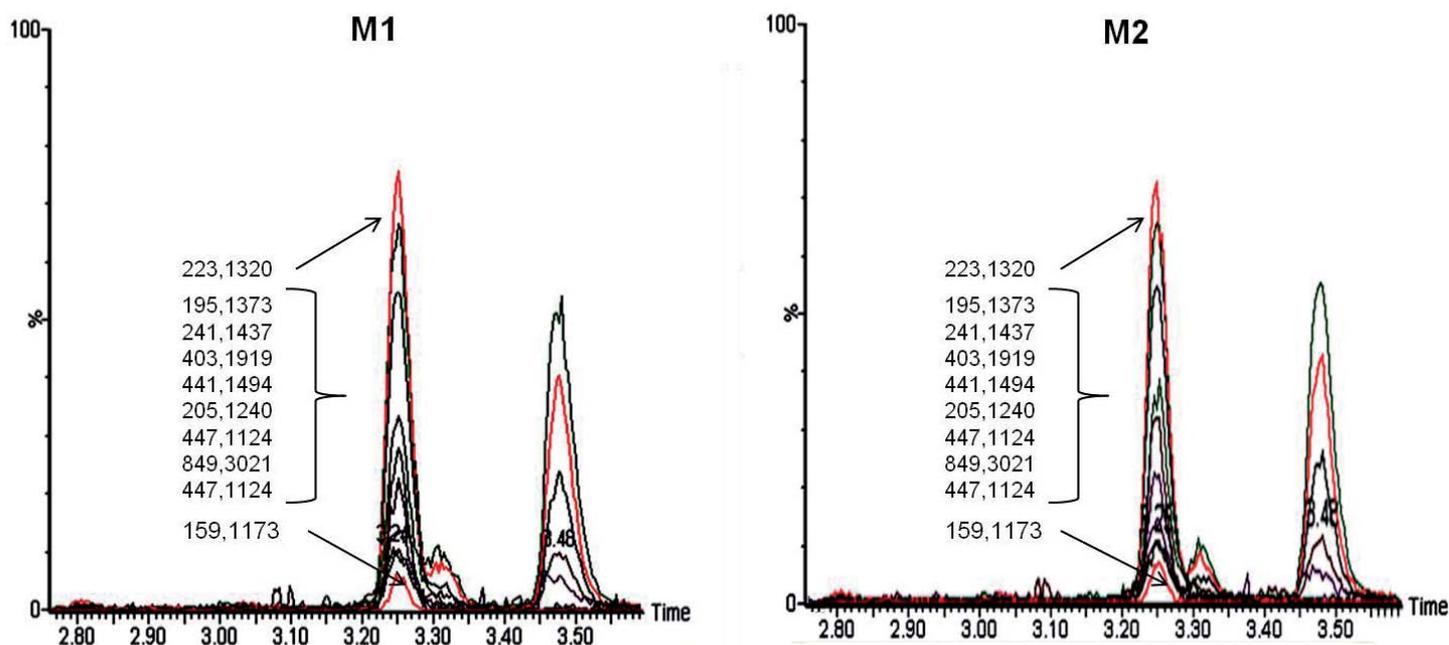
Parmi les 198 ions sélectionnés, nous avons constitué un premier groupe composé d'ions les plus abondants c'est-à-dire avec des aires supérieures à 30 ua (unité arbitraire). Des acquisitions en mode MS/MS ont été réalisées sur ces ions les plus intenses, afin d'enrichir les données en vue d'une tentative d'identification structurale. Un second groupe a été créé, comprenant les ions les plus faiblement détectés avec une aire inférieure à 10 ua ou avec un signal sur bruit inférieur à 150. Parmi ces ions du second groupe, certains ont été identifiés comme des fragments des ions les plus abondants, grâce aux acquisitions MS/MS précédentes, et ont été retirés de cette liste. Un programme d'acquisition en mode pseudo-SIM se compose de plusieurs séquences, chaque séquence représente les paramètres de masse adaptés à la détection d'un ion du second groupe. Une dizaine d'acquisitions ont permis d'augmenter le signal sur bruit de 73 ions discriminants de faible intensité dont la pertinence pouvait être remise en cause. Parmi les 31 ions rejetés, figurent ceux dont le signal sur bruit ne s'est pas accru. D'autres ions ont été éliminés parce que leur ratio « mycorhizé / non mycorhizé » n'atteignaient pas le seuil de 10. Après avoir amélioré le gain de sensibilité, ces ions ont pu être détectés dans les échantillons non mycorhizés alors qu'ils ne l'étaient pas lors des acquisitions en mode full scan. Au final 168 ions sont identifiés et validés comme étant caractéristiques de la mycorhization.

### **3.1.2. Recherche des ions issus d'un même métabolite**

Les molécules peuvent se fragmenter dans le spectromètre de masse de façon plus ou moins importante suivant leurs propriétés physico-chimiques. Une certaine quantité d'énergie est fournie aux molécules pour les ioniser et les conduire de la source à l'analyseur du spectromètre de masse jusqu'au détecteur. Cet apport d'énergie peut aboutir à la rupture des liaisons covalentes les plus fragiles comme celles entre hétéroatomes. Il est nécessaire de regrouper les ions qui proviennent d'un même métabolite pour en déduire le nombre de molécules criblées par l'analyse métabolomique, permettre l'interrogation des bases de données avec les ions parents (le métabolite initialement ionisé).

L'ion parent et ses ions fils (qui représentent les fragments ionisés), ont le même temps de rétention et leur abondance relative est propre à la molécule dont ils sont issus. Grâce à ces deux caractéristiques, des auteurs ont développé des tests statistiques pour mesurer les niveaux de corrélation entre tous les ions, en fonction de ces deux variables, afin de déterminer ceux qui proviennent d'un même métabolite (Cloarec *et al.*, 2005; Werner *et al.*, 2008a; Ipsen *et al.*, 2010). Toutefois le bruit de fond de type chimique induit par les échantillons et le bruit de fond électronique induit par le détecteur perturbent ces tests (Ipsen *et al.*, 2010). Des données de MS-MS sont parfois nécessaires pour lever des ambiguïtés.

Notre intérêt pour les ions discriminants de faible intensité n'étaient pas compatibles avec l'utilisation de tels tests. L'identification des ions issus d'un même métabolite a donc été réalisée de façon manuelle. Les ions avec des temps de rétention très proches (inférieur à 0,01 minute) ont été regroupés et leurs chromatogrammes ont été superposés afin de vérifier leur co-élution (Figure 3-4).



**Figure 3-4 Vérification de la co-élution d'ions ayant un temps de rétention similaire**

Des racines mycorhizées ont été extraites au méthanol, deux échantillons indépendants M1 et M2 ont été analysés par UPLC-Q-TOF Premier<sup>PM</sup> (Waters). Plusieurs ions (listés sur le chromatogramme) présentent des temps de rétention très proches (inférieur à 0,01 minutes). Les « Extracted Ions Chromatogram » (EIC) pour tous ces ions ont été tracés sur un même chromatogramme. Les pics des différents ions sont parfaitement superposables. De plus, les chromatogrammes de l'échantillon M1 et M2 sont semblables. Enfin, dans les deux

échantillons mycorhizés (M1 et M2) les aires de tous les pics sont conservées entre M1 et M2. Ces ions proviennent probablement du même métabolite, l'analyse est reproductible.

En complément, des spectres MS-MS ainsi que des acquisitions en mode pseudo-SIM ont permis de lever certaines ambiguïtés. Dans les analyses en mode pseudo-SIM, le quadripôle permet de sélectionner un ion d'intérêt, sans fragmentation dans la cellule de collision, le spectre de masse associé doit présenter un signal au niveau de son m/z. Cependant, dans plusieurs de nos spectres de masse, nous avons recensé des pics avec des m/z inférieur à celui sélectionné par le quadripôle. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle une fragmentation de l'ion sélectionné dans la cellule de collision pouvait avoir lieu car le Q-TOF premier (Waters) impose l'utilisation de l'argon comme gaz vecteur dans cette cellule, un élément de forte densité propice à la fragmentation. Cette hypothèse a été validée par de nouvelles acquisitions en abaissant l'énergie transmise aux ions dans la cellule de collision. Aucun fragment n'est observé. Alors que l'abondance de l'ion parent devrait augmenter sans fragmentation, nous observons le phénomène inverse. Cette baisse de sensibilité est la conséquence d'une réduction de l'efficacité de la focalisation des ions, engendrant également un effondrement de la précision de masse.

Grâce à l'ensemble de ces observations, il a pu être déduit que les 168 ions discriminants sont issus de 56 métabolites (Tableau 3-1).

**Tableau 3-1 Les métabolites criblés comme étant au moins dix fois plus concentrés dans les racines mycorhizées (M) par rapport aux racines non mycorhizées (NM).**

Les métabolites criblés sont classés par ordre croissant d'élution chromatographique. Les ions en rouge et en vert sont respectivement et exclusivement détectés sur le Q-TOF Maxis et sur le Q-TOF Premier. Les ions détectés sur les deux spectromètres de masse sont en noir. Les astérisques correspondent aux ions détectés sous forme d'ions multichargés mais convertis à la masse sur charge de l'ion monochargé. Le ratio M/NM de chaque métabolite correspond à sa concentration relative entre la condition mycorhizée et non mycorhizée. Quand un métabolite est criblé par plusieurs ions, son ratio M/NM est égal à la moyenne des ratios M/NM de tous ses ions. Le symbole M caractérise les métabolites détectés uniquement dans la condition mycorhizée et les astérisques représentent l'intensité de détection du métabolite (faible, \*moyenne, \*\*intense). Les formules brutes générées par SmartFormula3D sont en gras si une seule composition atomique est proposée ou si le score de la première proposition est 10 fois supérieur à celle du second rang, dans le cas contraire la formule est en italique.

métabolite	R <sub>t</sub> (min)	les ions détectés (m/z)	ratio M/NM	formule brute
1	0,67	426,0928	<b>M</b>	
2	0,83	<b>397,1241</b>	<b>M</b>	<i>C17H21N2O9</i>
3	0,85	265,0835	12	
4	0,99	752,2221; 388,1361	<b>M*</b>	
5	1,05	<b>218,1385</b>	<b>M**</b>	C10H20NO4
6	1,59	<b>345,1445; 182,0811</b>	<b>M*</b>	C18H21N2O5
7	1,90	<b>232,1543</b>	<b>M**</b>	C11H22NO4
8	3,17	984,3148	<b>M*</b>	
9	3,25	1275,45695*; 849,3021; 843,33075*; 805,385; 736,3286; 447,1124; 441,1518; 425,1769; 403,196; 241,1434; 223,1327; 221,0751; 205,124; 195,1379; 159,1173	41	

CHAPITRE 2 : LES RESULTATS

10	3,42	555,22075*	M*	
11	3,44	2259,09135**	M*	
12	3,47	813,39415*; 683,2028; 561,2176; 517,3003; 507,1705; 259,1545; 241,1434; 223,1327; 195,138; 167,0713	M**	
13	3,49	269,1375	M	
14	3,52	733,23635*	M*	
15	3,66	225,1507; 161,1339	M*	
16	3,70	492,2133*; 446,20635*	M*	
17	3,76	458,2292	M*	
18	3,79	710,3419	28	
19	3,79	685,2701	M*	
20	3,90	1760,59055*; 1326,46975*; 363,15475*	M*	
21	4,14	285,077; 267,0659	M*	
22	4,19	977,3861; 527,152; 511,1776; 489,1962; 453,1758; 241,1434; 237,1151; 195,1383	31	
23	4,26	587,1936	M	
24	4,30	1205,39335*; 1119,39375*; 935,28355*; 855,2592; 849,28435*; 609,18455*; 585,1466; 579,17415*; 541,2279; 428,2124; 271,1173; 253,1059; 225,1138; 207,1023; 181,0766	M**	
25	4,33	689,3018; 659,1845; 418,1925; 367,1381; 345,1543; 327,1435; 291,1242; 241,1455; 223,0909; 205,1237; 195,139	M**	C35H50N2O8PS
26	4,36	489,1969	M**	C22H33O12
27	4,60	428,2099	M*	
28	4,60	161,1338	12	
29	4,64	848,4379	11	
30	4,83	223,0626; 205,0508	M*	
31	4,83	521,2236	M*	C28H35N4O2P2
32	4,94	813,1944; 807,22235; 791,2601; 769,2752; 751,2645; 733,2599; 593,2463; 575,2316; 557,2242; 501,1957; 483,1862; 399,2004; 325,1626; 307,1548	54	
33	5,03	475,2176; 209,1541	M*	C22H35O11
34	5,36	453,2480; 275,2005	M*	
35	5,45	289,1644; 253,1437	28	C14H25O6
36	5,49	410,148; 392,135	13	
37	5,53	605,2969; 605,29675*; 559,29055*	M**	
38	5,64	291,1955; 273,1848	M*	C18H27O3
39	5,78	501,1984	M*	
40	5,80	1193,5005; 587,2869; 472,2366	M**	
41	5,91	1402,75595*; 327,1439	M*	
42	6,00	418,0977	19	
43	6,05	539,2483; 347,1848; 275,2007	M*	
44	6,13	459,2223; 211,1707; 193,1595	10	
45	6,14	505,1336	M*	
46	6,16	1077,48895*; 787,2771; 771,3039; 749,322; 541,30015; 459,2227; 436,2128; 420,2238; 413,1207; 397,1469; 392,1915; 375,1647; 357,1541; 253,1434; 235,1328; 211,1691	19	
47	6,19	577,2852	M	
48	6,19	547,1441	M	C26H27O13
49	6,30	620,3661	27	
50	6,45	617,3158; 455,2633	M*	
51	6,66	724,3763; 652,3912; 612,3949; 499,1208; 483,147; 478,1914	20	
52	6,75	713,3146	M*	
53	6,90	541,2649; 455,2651; 293,2111; 275,2007; 209,1546	15	C28H37N4O7
54	7,05	738,3904	M	
55	7,10	447,3117	M*	
56	7,13	620,3634	M*	
57	7,23	695,3069	M	C39H43N4O8
58	7,33	655,2960	M	C32H47N4O14
59	7,48	602,317; 586,3231; 579,21115*; 563,2462; 541,2641; 523,2536; 505,2418; 487,2293; 479,2637; 461,2505; 293,211; 275,2006; 257,1904	275	C30H44N5O8
60	7,58	411,2525	M	
61	7,74	623,302; 277,2145; 259,2065	M*	
62	7,77	601,3216; 583,2747; 439,2689; 335,2224; 275,2007	M*	
63	7,80	741,2964; 723,2863; 459,2278; 211,1704	21	C35H42N8NaO9
64	8,13	283,0963	M**	C17H15O4
65	8,20	725,26895; 687,3219; 525,2691; 507,2595; 489,2525; 463,2713; 445,2591; 277,2156; 259,2075	133	
66	8,60	644,3271; 621,23; 605,2567; 583,2745; 335,2216; 311,1141; 275,2026; 257,1908	34	
67	9,18	586,3225; 570,3307; 563,2271; 547,2514; 525,2692; 507,2595; 489,2484; 463,2705; 445,2602; 282,1116; 277,2161; 259,2067	36	
68	9,24	837,3591	M	
69	9,49	863,3696	M*	
70	9,95	275,2010	23	
71	10,34	587,2871	M*	

Dans l'objectif de déterminer la composition atomique de ces molécules, de nouvelles acquisitions sont menées sur un spectromètre de masse de plus haute résolution (Q-TOF, Maxis, Bruker Daltonics). La stratégie d'identification repose à la fois sur l'interrogation de bases de données dédiées mais aussi sur l'analyse du massif isotopique de la molécule.

### 3.1.3. Utilisation d'un appareil de plus haute résolution

Une grande précision de mesure sur la masse et sur l'abondance relative du massif isotopique est un atout dans l'élucidation de la formule brute d'un ion. L'utilisation un appareil de plus haute résolution comme le Q-TOF Maxis (résolution de 50 000) permet d'obtenir des mesures plus précises que celles obtenues par le Q-TOF Premier (résolution de 10 000). Le traitement des données est effectué selon la méthode mise en place dans le chapitre précédent. Les ions discriminants sont sélectionnés par OPLS-DA *via* le S-PLOT puis vérifiés manuellement de la même façon que précédemment, à la différence près que les ions avec un faible signal sur bruit sont éliminés. Aucune acquisition en pseudo-SIM n'a pu être réalisée dans le temps disponible.

Dans les analyses réalisées sur le Q-TOF Maxis, des ions multichargés ont été observés : 28 ions di-chargés et un ion tri-chargé, neuf d'entre eux ayant une masse calculée supérieure à 1000 Dalton. Or, la gamme de masse des acquisitions menées sur cet appareil avait été fixée entre les valeurs 100 et 1000 m/z, puisque au-delà de cette limite, aucun ion différentiel n'avait été précédemment détecté sur le Q-TOF premier (Waters). De nouvelles analyses, avec une fenêtre de masse de 500 m/z à 3000 m/z, ont permis de cribler deux autres ions différentiels. Le premier est un ion di-chargé à 1130,05 m/z déjà identifié sous la forme d'un ion tri-chargé à 753,69 m/z pour le métabolite 10. Le second à 1193,50 m/z correspond à un ion monochargé, sa fragmentation engendre l'apparition d'un fragment à 587.28 m/z provenant du métabolite 40 (Tableau 3-1). Au final, 134 ions discriminants sont recensés, dont la moitié étaient déjà identifiés lors de la première analyse. Parmi les

autres ions, 47 sont issus de métabolites déjà criblés et 23 ions servent à cribler 17 nouveaux métabolites.

A partir des profils isotopiques, des logiciels sont capables de générer de nombreuses formules brutes auxquels ils attribuent un score de pénalité, calculé en fonction de l'écart entre les valeurs mesurées et les valeurs théoriques. Les logiciels diffèrent selon l'algorithme utilisé et la façon dont ils pondèrent les calculs par rapport à la précision de masse et à la précision sur la mesure de l'abondance relative des ions du massif isotopique. Le générateur de formules brutes utilisé, Smart Formula 3D (Bruker Daltonics) est inclus dans le logiciel d'exploitation Compass (Bruker Daltonics) du spectromètre de masse. L'algorithme est adapté à la précision de mesure de l'appareil pour ces deux paramètres. La génération de formules brutes attribue à 34 ions et à 5 molécules (5, 6, 7, 38, 64) une seule composition atomique (Tableau 3-1).

### **3.1.4. Bilan de l'analyse différentielle du métabolome**

La première partie de l'analyse métabolomique s'achève avec une liste de 231 ions, dont la concentration est au moins 10 fois plus élevée dans les racines mycorhizées et correspondant à 71 métabolites (classés par ordre d'élution et par masse décroissante (Tableau 3-1).

Près de la moitié de ces métabolites sont identifiés par au moins deux ions. 15 d'entre eux présentent plus de 4 fragments (le métabolite 32 se caractérise par 14 ions). La fragmentation de ces molécules rend difficile l'identification de l'ion moléculaire. Son abondance diminue jusqu'à disparaître totalement au profit des ions fils. Il est très compliqué, voire impossible, d'identifier un métabolite par l'interrogation des bases de données uniquement sur la base de la masse des ions fils. En effet, en LC-MS contrairement à la GC-MS, il existe très peu de bases de données constituées de spectres de fragmentations (Dunn, 2008), l'ionisation et la fragmentation étant peu reproductibles entre différents spectromètres de masse équipés de source de type ESI. Sur l'ensemble des 231 ions, plusieurs possèdent la même masse, vingt deux sont élués à plusieurs temps de rétentions et dix huit

métabolites ont au moins en commun un ion. Leur regroupement a permis de mettre en évidence trois situations différentes (Figure 3-5).

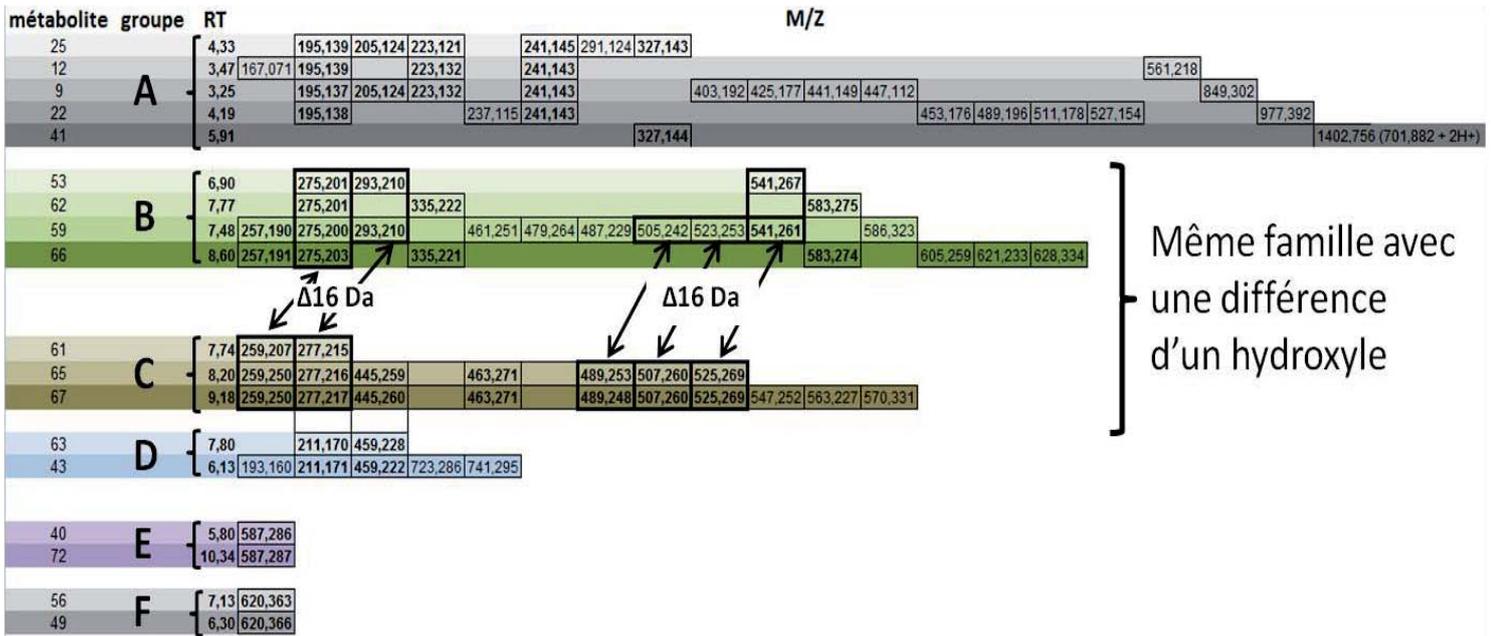


Figure 3-5 Mise en évidence de familles de métabolites

Chaque ligne représente un métabolite criblé par l'analyse métabolomique, différentes informations sont indiquées comme son temps de rétention ainsi que les ions qu'il génère. Six groupes de métabolites sont constitués et symbolisés par un code couleur ; ils ont en commun un ou plusieurs ions de masses identiques mais avec des temps de rétentions différents. Les groupes B et C présentent des écarts de masse de 16 Daltons entre certains de leurs ions ; cette différence de masse correspond à la perte d'un hydroxyle.

On peut tout d'abord rencontrer le cas de deux métabolites criblés par un seul ion et dont la masse est commune. Leur composition atomique est très probablement identique et l'hypothèse de la présence de deux isomères semble la plus plausible, mais il est impossible de dissocier une isomérie de position ou une stéréo-isomérie à ce stade.

Dans une deuxième situation, plusieurs métabolites caractérisés par de multiples ions possèdent en commun quelques ions de faible masse avec un écart de masse inférieur à 0,002 Da. Cette observation suggère l'existence d'un squelette moléculaire commun sur lequel viendraient se greffer divers groupements ou fonctions chimiques pour ainsi former de multiples molécules. Cinq groupes de métabolites se partagent des ions dont le groupe C, composé des métabolites (61), (65) et (67) (Tableau 3-1). Tous les trois présentent l'ion à 277,216 m/z, leurs spectres MS-MS sont semblables et se caractérisent par les fragments suivant : 121,073 m/z, 133,076 m/z, 151,089 m/z, 175,130 m/z et 259,201 m/z. Aucun ion de

masse supérieure à 277 m/z n'est détecté pour le (61), par contre le (65) et le (67) ont en commun cinq ions supplémentaires : 445,260 m/z, 463,271 m/z, 489,248 m/z, 507,260 m/z et le 525,269 m/z dont la fragmentation du 525,269 m/z produit les quatre autres ions de plus petites masses. Seul pour le (67) sont détectés quatre ions de plus hautes masses : 547,252 m/z, 563,227 m/z, 570,331 m/z et 586,322 m/z. L'hypothèse de trois métabolites issus d'une même voie métabolique ici semble envisageable.

Enfin, dans une troisième situation, deux groupes de métabolites B et C présentent un écart de masse de 16 Dalton entre tous les ions communs à leur groupe. La comparaison des spectres de fragmentation des ions de plus haute masse (525,2691 m/z groupe C et 541,2641 m/z groupe B) fait apparaître une grande similitude dans les profils, seul un décalage de 16 unités de masse subsiste. La soustraction des deux ions parents donne une valeur de: 15,9950, correspondant à la masse d'un atome d'oxygène (15,9949). Un hydroxyle supplémentaire est greffé sur les métabolites du groupe B et tous les ions fils portent cette fonction alcool. L'ensemble de ces observations montrent que l'analyse différentielle a mis en évidence des familles de métabolites appartenant à des voies métaboliques probablement affectées par la symbiose.

Si on compare notre étude à celle de Schliemann et collaborateurs (2008) qui comparait aussi, avec la même plante hôte et le même champignon, les métabolomes de racines mycorhizées et non mycorhizées, on voit qu'elles sont très complémentaires. Notre approche méthodologique et analytique utilisée pour réaliser une analyse différentielle des métabolites secondaires, extractibles au méthanol, est sensiblement différente. Schliemann et collaborateurs (2008) avaient mis en évidence 22 composés dont 15 ont une concentration au moins 10 fois plus importante dans les racines mycorhizées. Parmi les 15 composés, trois d'entre eux n'ont pas été identifiés, douze ont été caractérisés comme des apocaroténoïdes dont huit possèdent un squelette de mycoradicine libéré après hydrolyse alcaline et quatre autres apocaroténoïdes de la famille des blumenols. Dans nos analyses, nous avons probablement criblé deux des quatre blumenols uniquement détectés dans les racines en symbiose par Schliemann et collaborateurs (2008). Sous ionisation positive le 13-Hydroxyblumenol C 9-O- $\beta$ -(6'-malonylglucoside) et le blumenol C 9-O- $\beta$ -(6'-malonylglucoside) produisent respectivement les ions suivant : 475,2179 m/z [M + H]<sup>+</sup>, 209,1541 m/z [M - malonyl -H<sub>2</sub>O + H]<sup>+</sup>, 459,2230 [M + H]<sup>+</sup> et 211,1698 [M +

HJ<sup>+</sup> (Schliemann *et al.*, 2006). Nous retrouvons dans nos analyses des ions discriminants de masses 475,2171 m/z ( $\pm 1,68$  ppm), 209,1541 m/z ( $\pm 0$  ppm), 459,2223 ( $\pm 1,52$ ) et 211,1707 ( $\pm 4,30$  ppm). En ce qui concerne les onze métabolites dont la structure chimique n'a pas été élucidée, on ne peut rien conclure de leur éventuelle présence dans nos 71 métabolites discriminants. Aucune information sur la masse de ces molécules n'est disponible et connue. Schliemann et collaborateurs avaient également identifié trois isoflavonoïdes qui s'accumulaient entre 2,8 et 4 fois plus dans des racines en symbiose : la ononine, la daidzeine et la malonylononine. Nous retrouvons aussi des ions aux masses correspondantes à ces molécules avec des ratios de 2.1 à 3.4 entre les extraits de racines mycorhizées et non mycorhizées.

Par rapport aux travaux de Schliemann et collaborateurs (2008), nos analyses ont criblé au moins 58 métabolites supplémentaires comme caractéristiques de la mycorhization. De plus, dans notre processus analytique, nous avons utilisé des spectromètres de masse à haute résolution fournissant des informations sur la masse des composés et ou sur leurs profils de fragmentation avec une précision de masse comprise entre 1 à 5 ppm. Ces données fournissent quelques informations sur la structure de ces molécules et pourront plus tard servir de travail d'appui pour mener de nouvelles études sur le métabolisme de la symbiose mycorhizienne.

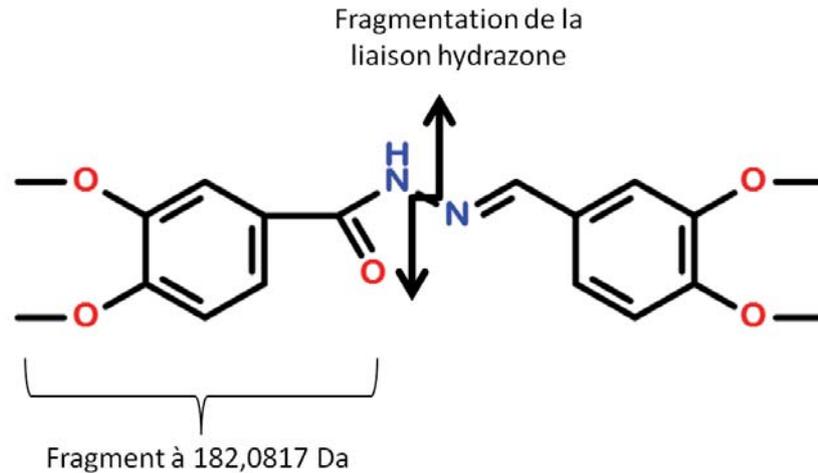
Dans toute analyse comparative du métabolome, après l'identification des signaux discriminants, l'élimination des informations redondantes et l'établissement des liens entre les ions issus d'un même composé, la dernière étape consiste à identifier structurellement les métabolites criblés. Cette partie du travail est la plus laborieuse, très couteuse en temps et surtout très aléatoire. Selon la molécule étudiée et sa présence ou non dans les bases de données, son identification structurale est plus ou moins aisée.

Dans notre étude, la grande majorité des ions susceptibles de correspondre à des métabolites ionisés, possèdent des masses au-delà de 500 daltons. Compte tenu de la résolution en masse (1 à 5 ppm), la génération de formule brute ne permet pas d'accéder à une seule composition atomique. Seuls quatre ions, de moindre taille, correspondants aux métabolites 5, 6, 38 et 64 ont été associés à une seule formule brute (Tableau 3-1). Diverses approches ont alors été menées pour tenter d'identifier les molécules.

Le métabolite 64 criblé par l'ion 283,0963, dont la formule brute générée est  $C_{17}H_{14}O_4$  (forme non protonée), peut potentiellement correspondre à 74 molécules présentes dans la base de données DNP (Dictionary of Natural Products), la plus complète en molécules issues du vivant et plus particulièrement du monde végétal. La fragmentation de cet ion est infructueuse. D'une part parce qu'il est présent en faible quantité, aucun fragment n'est détecté pour des valeurs d'énergie de collision inférieure à 20 eV, et au-delà de cette énergie aucun signal n'est détecté, même pas l'ion parent à 283,0963 m/z. L'augmentation de la vitesse de l'ion dans la cellule de collision couplé à un flux d'azote coaxial provoque une instabilité dans sa trajectoire, le rendement de transmission chute, aboutissant à une perte de sensibilité si bien que les ions fils ne peuvent être détectés. D'autre part, cet ion co-élue avec un autre ion dont la masse diffère de quelques Dalton seulement rendant plus difficile la sélection de l'ion parent dans le quadripôle avec une fenêtre de tolérance réduite à quatre unités de masse centrées sur 283 m/z. Il en résulte une perte de sensibilité avec une moins bonne transmission des ions au niveau du quadripôle. Une des solutions à ce problème consiste à pré-purifier ce composé afin d'augmenter sa concentration par rapport aux autres molécules présentes dans l'échantillon. Malgré l'obtention de spectres de fragmentations, cette approche ne garantit pas l'identification du métabolite.

La composition atomique du métabolite 38 correspond à 39 composés de la base de données DNP. Là encore, aucun spectre de fragmentation n'a pu être obtenu pour tenter de sélectionner la bonne molécule.

Le métabolite 6, identifié par l'ion à 345,1445 m/z, dont la formule brute générée est  $C_{18}H_{20}N_2O_5$  (forme non protonée), correspond à une seule molécule de la base de donnée DNP, la 3,4-Dimethoxybenzaldehyde *N*-(3,4-dimethoxybenzoyl) hydrazone (figure 3-6).

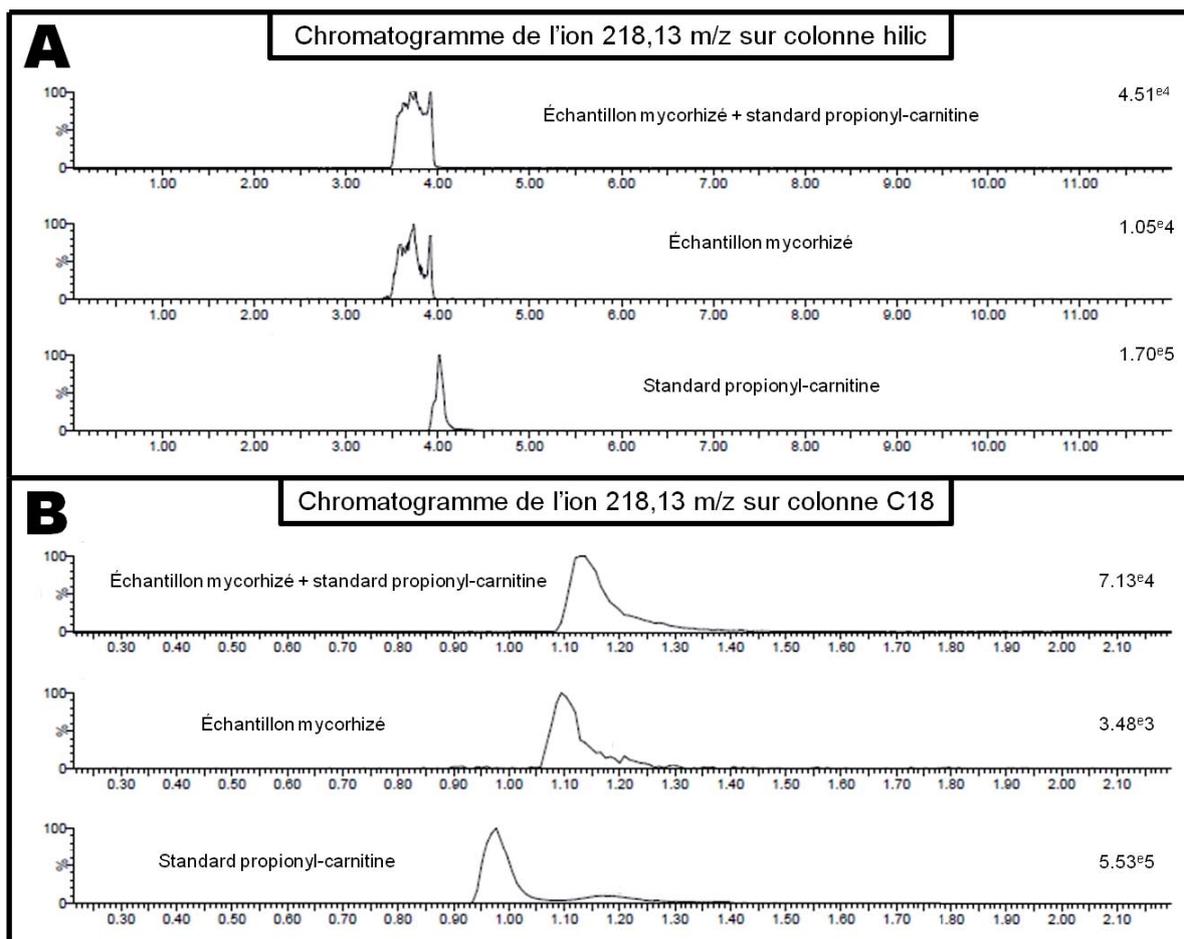


**Figure 3-6 Proposition d'une structure pour le métabolite 6 et proposition d'une fragmentation**

Structure de la 3,4-Diméthoxybenzaldehyde *N*-(3,4-diméthoxybenzoyl) hydrazone, la rupture de la liaison entre les deux azotes pourrait former un ion fils à 182m/z.

Le métabolite produit un fragment d'une masse de 182,0812 daltons que l'on peut attribuer à la libération de  $C_9H_{11}NO_3$  (182.0817 Da), provoquée par une éventuelle rupture de la liaison entre les deux azotes de la fonction hydrazone. Néanmoins, une grande incertitude demeure sur la caractérisation de ce composé formé par deux cycles aromatiques portant chacun deux groupes O-méthyles. En effet, on peut penser que cette molécule est apolaire. Or la polarité de cette molécule ne correspond pas à celle du métabolite 6 élué en début de gradient chromatographique sur une colonne de type inverse (C18). Cette molécule n'est pas disponible commercialement. Par contre, dans la base de données ChemSpider, 2547 molécules sont recensées avec la même formule brute que le métabolite 6, l'acquisition de spectres de fragmentations n'est d'aucune utilité avec autant de candidats.

Le métabolite 5 se caractérise par l'ion 218,1386 m/z dont la formule brute est  $C_{10}H_{19}NO_4$ . L'interrogation de la base de données DNP conduit à 8 molécules. La fragmentation du métabolite 4 a permis de générer deux fragments compatibles avec l'une des 8 molécules, la propionyl-carnitine. Les ions fragments sont l'ion 159,0653 avec perte de l'amine quaternaire suivie de la perte du groupement propanoate avec l'ion 85,0278. L'identification de la propionyl-carnitine a été confirmée par la co-élution avec un standard de L-propionyl-carnitine, la forme biologiquement active, sur une colonne de type inverse (C18) et normale (Hilic) (figure 3-7).



**Figure 3-7 L'identification de la propionylcarnitine par co-élution avec le standard**

Trois échantillons ont été analysés par LC-MS, un standard de L-propionyl-carnitine (Sigma Aldrich), un échantillon de racines mycorhizées et un échantillon composé d'un mélange des deux. Les chromatogrammes représentent les appels d'ion à 218,13 m/z (masse de la propionyl-carnitine) des trois échantillons sur (A) sur colonne de type Hilic (UPLC BEH Hilic : 2,1 x 150 mm, 1,7  $\mu$ m) et (B) une colonne de type inverse C18 (UPLC BEH C<sub>18</sub> : 2,1 x 150 mm, 1,7  $\mu$ m).

Leur fragmentation génère les mêmes ions fils à 159 et 85 m/z mais également deux autres ions moins abondants à 144 et 160 m/z.

Nous avons vu qu'une approche de métabolomique non ciblée par LC-MS couplée à des analyses statistiques non supervisées de type OPLS-DA avaient permis d'identifier, avec beaucoup de précision et de robustesse, la présence d'un ensemble de métabolites uniquement ou d'avantage présents dans des racines mycorhizées. Cependant cette approche bute ensuite sur l'identification structurale proprement dite des molécules d'intérêt, une étape longue et difficile, sans garantie de succès, surtout lorsque l'interrogation des bases de données s'avère infructueuse (Kind *et Fiehn*, 2006; Kind *et Fiehn*, 2007; Werner *et al.*, 2008b).

Pour aller plus loin tout en respectant notre objectif visant à identifier de nouveaux métabolites jouant un rôle dans la symbiose mycorhizienne dont font partie les signaux symbiotiques, nous nous sommes intéressés aux propriétés biologiques que certains de nos métabolites d'intérêt pourraient avoir potentiellement dans la mycorhization.

## **3.2. Couplage d'une approche de métabolomique et d'une analyse d'expression génique**

### **3.2.1. L'analyse d'expression génique**

#### **3.2.1.1. Principes et objectifs**

L'objectif est d'identifier parmi les métabolites dont la concentration est plus élevée dans les racines mycorhizées, ceux qui pourraient être capables de moduler l'expression génique de l'un ou l'autre partenaire. S'ils activent des gènes impliqués dans l'interaction mycorhizienne, ces métabolites pourraient alors être des régulateurs potentiels de la symbiose. Le principe est de fractionner les extraits racinaires mycorhizées de façon à répartir les métabolites criblés dans différentes fractions. Des extraits de racines non mycorhizées sont également fractionnés pour servir de témoin. Elles sont préparées de la même façon et testées en parallèle sur les mêmes gènes. On évalue ensuite l'activité des fractions de racines mycorhizées par rapport à celle des fractions de racines non mycorhizées.

A l'aide du test biologique sur l'expression génique, cette approche doit permettre i) de sélectionner les métabolites potentiellement les plus intéressants sur lesquels pousser plus loin la caractérisation structurale, ii) de fournir les premières informations sur le rôle de ces métabolites dans la symbiose grâce aux fonctions des gènes qu'ils affectent.

#### **3.2.1.2. La méthodologie utilisée**

Dans l'étude présentée ici l'effet des extraits racinaires ont été testés exclusivement sur les gènes du partenaire fongique. Nous avons mesuré le niveau d'expression de 91 gènes de *R. irregularis*, sélectionnés à partir de plusieurs études transcriptomiques réalisées sur ce champignon (le consortium *R. irregularis* ; <http://mycor.nancy.inra.fr/IMGC/>) (Tisserant *et al.*, 2012). Le choix de 76 gènes a été fait en fonction de leurs différences d'expression entre les hyphes intra-racinaires et les spores. Les autres gènes ont été sélectionnés par rapport à des fonctions biologiques d'intérêt comme des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique ou dans la synthèse de paroi fongique (chitine) (Annexes 5.2). La spécificité des amorces des 91 gènes a été testée et validée par qRT-PCR. Nous avons utilisé une micro-puce Biomark II (Fluidigm) qui permet un haut débit d'analyse avec 9 216 réactions de qRT-PCR réalisées simultanément et offre la possibilité de quantifier 96 transcrits dans 96 conditions différentes. Cette technologie miniaturisée, très sensible et qui utilise de faibles quantités d'ARN s'est imposée car il n'existe pas actuellement de puce fiable, de type Nimblegen, pour faire des arrays d'expression chez les champignons MA. La technologie MiSeq (Illumina) n'aurait pas non plus été possible car beaucoup trop coûteuse.

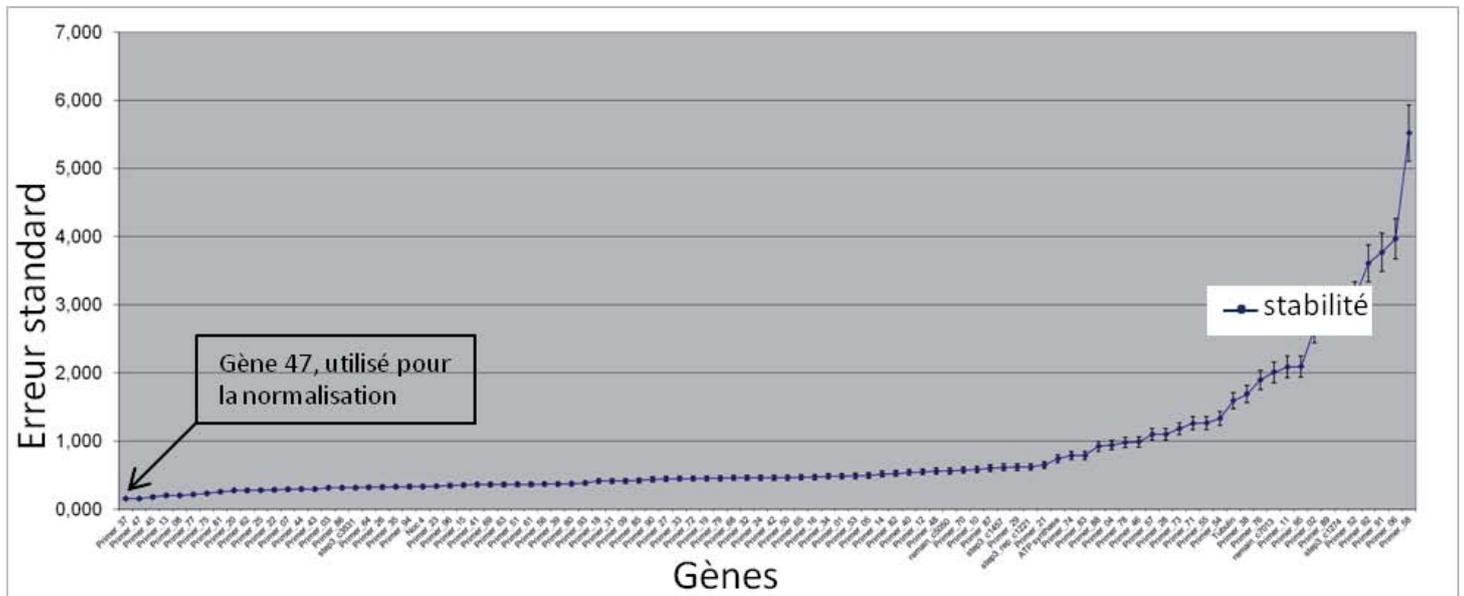
La détermination des ratios d'expression entre les extraits racinaires des fractions mycorhizées / fractions non mycorhizées a été calculée par la méthode des delta-delta Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Les différences d'expression entre les extraits fractionnés de racines mycorhizées et non mycorhizées ont été validées par les tests statistiques de Student ( $P < 0,05$ ). N'ayant pas d'autre choix, nous avons testé les fractions racinaires mycorhizées et non mycorhizées sur l'expression des gènes de spores en germination de *R. irregularis*. Ce stade de développement est le seul que le champignon peut réaliser sans la plante hôte et donc le seul que l'on peut maîtriser expérimentalement. Pour ajuster les quantités de racines à extraire et éviter d'éventuels effets toxiques que pourraient avoir des extraits trop concentrés, nous nous sommes basés sur des données publiées faisant référence à des stimulations du champignon MA avec un apport exogène de flavonoïdes. Dans une revue, Vierheilig et collaborateurs ont recensé une soixantaine de tests de croissance et de germinations de champignons MA en présence de différents flavonoïdes. Les concentrations utilisées oscillent autour d'une dizaine de micro-molaire (Vierheilig *et al.*, 1998a). Nous avons extrait vingt et un grammes de racines mycorhizées et non mycorhizées pour que les concentrations de flavonoïdes soient approximativement

aux alentours d'une dizaine de micro-molaire. Les extraits racinaires ont été injectés en chromatographie liquide afin d'obtenir dix fractions (prélevées toutes les 2 minutes pendant 20 minutes). Dans l'idéal, chaque fraction devrait contenir un seul métabolite discriminant. Dans le cas où celui-ci affecte l'expression génique du champignon MA, il n'y a pas d'ambiguïté pour définir le composé activateur. Malheureusement, la résolution d'une chromatographie liquide de type préparative ne permet pas de séparer individuellement chaque métabolite discriminant. L'obtention de dix fractions est un bon compromis entre la résolution chromatographique et le nombre d'échantillons à analyser.

Nous avons utilisé une colonne XBridge Prep C18 OBD (Waters), de chimie semblable à celle de l'analyse métabolomique. Son diamètre interne de 50mm est adapté à la quantité de matériel extrait. Le gradient d'élution de 5% d'acétonitrile à 100% en 20 minutes et un débit de 17ml/min ont été définis en fonction des proportions de la colonne par l'intermédiaire d'un logiciel (MassLynx, Waters) afin que les métabolites soient élués comme dans l'analyse métabolomique où l'on avait utilisé une colonne analytique. Les fractions sont collectées toutes les deux minutes, un volume de 34 ml est recueilli par fraction et amené à sec par évaporation sous vide. La reprise dans un mélange eau / acétonitrile (95/5) avec 5% de diméthylsulfoxyde (DMSO) permet une bonne dissolution des composés.

### **3.2.1.3. Résultats de l'analyse d'expression génique**

Le ratio des niveaux d'expressions des 91 gènes entre fractions mycorhizées, non mycorhizées et témoin négatif (eau avec 0,01% d'acétonitrile) est calculé par la méthode des delta-delta CT ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). Nous avons utilisé Normfinder pour identifier les trois gènes les plus stables sur l'ensemble des analyses (Figure 3-8).



**Figure 3-8** Evaluation par Normfinder de la stabilité de l'expression de 91 gènes de spores de *Rhizophagus irregularis* en germination traité avec des extraits fractionnés de racines mycorhizées et non mycorhizées

En abscisse chaque point représente un gène. L'ordonnée correspond à l'erreur standard des niveaux d'expression de chaque gène entre les différents traitements (variance inter fraction) et les barres d'erreurs indiquent la stabilité de l'expression des gènes entre répétitions biologiques (variance intra fraction). L'expression du gène 47 est la plus stable aussi bien entre les différentes fractions qu'entre répétitions biologiques.

Une moyenne géométrique des trois gènes sélectionnés (Gene\_37, Gene\_08, Gene\_47) a été utilisée comme référence pour le calcul des delta-delta CT. Sur l'ensemble des données, 6% des rapports d'expression entre fractions mycorhizées et témoin négatif ainsi qu'entre fractions non mycorhizées et témoin négatif sont significativement supérieur à 2 ou inférieur à 0,6 (Figure 3-9).

**A**

	Extrait Brut	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
Gene 01											0,5
Gene 04										2,0	
Gene 06							0,6			2,2	
Gene 11		0,4				0,5	0,3				
Gene 17											2,1
Gene 28							2,1			2,6	
Gene 30							0,5		3,8		
Gene 36						0,5	0,4				
Gene 50		0,6									2,1
Gene 54							0,5				
Gene 55							0,5				
Gene 57		0,1				0,3	0,2				
Gene 70							0,5				2,2
Gene 73		5,6									4,7
Gene 74							0,5				2,7
Gene 78						0,6					
Gene 83										2,1	
Gene 88									2,1		
Gene 91						0,5				2,0	
Gene 95	2,3								2,2		
Tubulin										2,1	

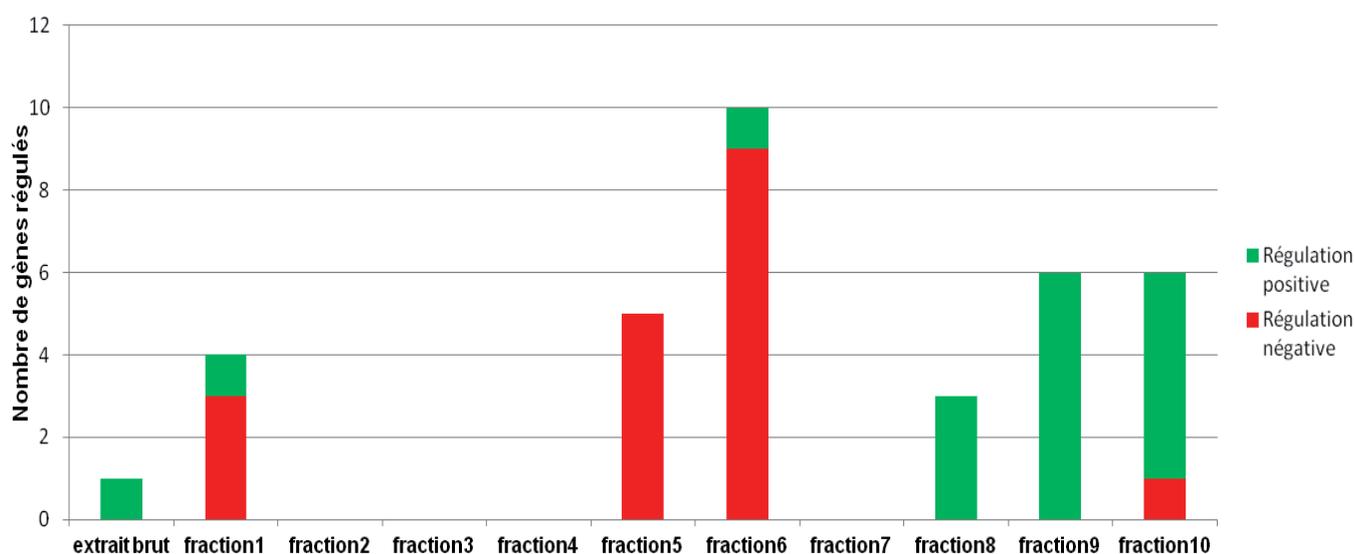
**B**

Gene id	Gene	associated	Putative function	e-
remain_c782	Gene_01	Cell cycle related	Centromere-associated protein NUF2	3,E-33
step3_c687	Gene_04	Other	Leucine-rich repeat-containing protein DDB0188916 OS=Dictyostelium	3,E-09
remain_c10423	Gene_06	Other	Extended-synaptotagmin-1 OS=Homo sapiens GN=FAM62A PE=1 SV=1	1,E-12
remain_c5699	Gene_11	Other	Lysophosphatidylcholine acyltransferase OS=Mus musculus GN=Mboat5	4,E-38
remain_c7013	Gene_17	Growth	chitin synthase	
step3_c1192	Gene_28	Posttranslational	Alkyl hydroperoxide reductase/ Thiol specific antioxidant/ Malallergen	2,E-27
step3_c1274	Gene_30	Growth	chitin synthase	
step3_rep_c1221	Gene_36	Growth	chitin synthase	
step3_rep_c3002	Gene_50	Energy production and	Chitooligosaccharide deacetylase OS=Rhizobium leguminosarum bv.	4,E-07
step3_c2624	Gene_54	Growth	Chitin synthase export chaperone OS=Fusarium oxysporum GN=chs7	3,E-80
remain_c1562	Gene_55	Growth	CHS1_PHYBL Chitin synthase 1 (Chitin-UDP acetyl-glucosaminyl	2,E-38
step3_c1107	Gene_57	Growth	Chitin deacetylase OS=Mucor rouxii PE=1 SV=1	5,E-19
step3_c1270	Gene_70	Lipid transport and	Lipase [Rhizopus microsporus var. chinensis]	5,E-24
step3_rep_c759	Gene_73	Growth	Chitin deacetylase [Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21]	1,E-49
step3_c3245	Gene_74	Growth	Chitin deacetylase [Rhizopus stolonifer]	1,E-08
remain_c2490	Gene_78	Posttranslational	Heat shock 70 kDa protein 12A OS=Mus musculus GN=Hspa12a PE=1	1,E-23
step3_c509	Gene_83	Posttranslational	Heat shock 70 kDa protein 12A OS=Mus musculus GN=Hspa12a PE=1	2,E-13
remain_c13348	Gene_88	Other	Sacsin OS=Homo sapiens GN=SACS PE=1 SV=2	8,E-32
remain_c15064	Gene_91	Lipid transport and	Acyl-CoA oxidase [Lipid transport and metabolism].	1,E-10
step3_c2923	Gene_92	Lipid transport and	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 OS=Bos taurus GN=ACOX1	3,E-13
remain_c825	Gene_95	Lipid transport and	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1 [Pyrenophora tritici-repentisPt-1C-BFP]	1,E-34
step3_c1641	Tubulin	Growth	Tubulin, alpha, ubiquitous [Batrachochytrium dendrobatidis JAM81]	e-114

**Figure 3-9 Synthèse des résultats d'expression génique**

(A) Les colonnes représentent les dix fractions séparées par HPLC préparative à partir d'extraits racinaires de *M. truncatula* et de l'extrait brut. Les lignes correspondent à des gènes dont le rapport d'expression entre une fraction mycorhizée et une fraction non mycorhizée est supérieur à 2 (vert) ou inférieur à 0,6 (rouge). Les valeurs inscrites dans les cases indiquent les rapports d'expression mesurés. La transcription de certains gènes est affectée par plusieurs fractions. (B) Tableau regroupant les gènes de spores de *Rhizophagus irregularis* dont l'expression a été modulée par au moins une fraction d'extrait de racines mycorhizées. Les fonctions putatives des gènes ont été définies par une recherche d'homologie sur les bases de données Swissprot, KOG, Pfam et NCBI (blastx vs nr).

Les différences d'expressions entre fractions mycorhizées et non mycorhizées représentent 4% des données. 22 gènes sont affectés par au moins une fraction mycorhizée soit 24 % des gènes sélectionnés. L'expression d'un gène peut être modulée par différentes fractions avec des régulations positives ou négatives. L'extrait brut de racines mycorhizées, non fractionné, n'affecte qu'un seul gène. Ce résultat est important car il indique que certains métabolites doivent avoir des actions antagonistes sur le champignon MA et démontre l'intérêt de fractionner les extraits racinaires. La représentation graphique du nombre de gènes surexprimés ou réprimés pour chaque fraction issue d'extrait de racine mycorhizées ou non mycorhizées indique que les fractions 2, 3, 4 et 7 n'ont pas d'impact sur les gènes étudiés, à l'inverse les fractions 1, 5, 6, 8, 9 et 10 sont actives sur un certains nombre de gènes (Figure 3-10).



**Figure 3-10 Représentation graphique du nombre de gènes dont la régulation est affectée par une fraction HPLC**

Les dix fractions HPLC séparées à partir d'extraits de racines de *M. truncatula* sont représentées en abscisse. Les gènes dont l'expression est régulée positivement (>2) par les fractions mycorhizées par rapport aux fractions non mycorhizées sont symbolisés par les barres en vert alors que la couleur rouge représente ceux régulés négativement (<0,6). Les fractions 1, 5, 6, 8, 9 et 10 sont celles qui affectent les gènes analysés, à l'inverse les fractions 2, 3, 4 et 7 n'ont aucun d'effet.

### 3.2.1.4. l'identification des métabolites discriminants dans les fractions

La recherche des métabolites discriminants dans les différentes fractions est effectuée par LC-MS, dans les mêmes conditions que pour l'analyse différentielle du métabolome. Des appels d'ions permettent alors d'identifier leurs présences au temps de rétention attendu. Grâce à ces informations nous pouvons déterminer dans quelle(s) fraction(s) est contenue chacun des 71 métabolites criblés (Annexes 5.3). La grande majorité de ces métabolites sont contenus dans les six premières fractions, alors que pour les fractions 8, 9 et 10 seulement deux métabolites discriminants sont détectés. Cependant en étant moins exigeant sur le rapport des concentrations relatives entre racines mycorhizées et non mycorhizées, 15 ions supplémentaires sont criblés avec des ratios compris entre 2 et 9,9 pour les fractions 8, 9 et 10. Parmi ces 15 ions, 4 ont un ratio supérieur à 5, et 11 ont un ratio compris entre 2 et 4,9. En se basant sur le temps de rétention de ces ions, nous estimons que 14 métabolites s'accumulent lors de la mycorhization sont présents dans les fractions 8, 9 et 10.

#### **3.2.1.5. La propionyl-carnitine**

La propionyl-carnitine, criblée et identifiée par l'analyse métabolique comme un métabolite exclusivement présent dans les racines mycorhizées, est également détectée dans la fraction 1 qui a modulée l'expression de quelques gènes du partenaire fongique. Afin de vérifier si la propionyl carnitine est responsable de cet effet de régulation, des spores en germination de *R. irregularis*, ont été stimulées par différentes concentrations de L-propionyl-carnitine commerciale ( $10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>,  $10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup> et  $10^{-9}$  mol.L<sup>-1</sup>) pendant 24h, 48h et 7 jours. La mesure de l'expression des gènes par q-RT-PCR indiquent que la propionyl-carnitine n'affecte pas l'expression de ces gènes. Ce métabolite est issu de l'oxydation des acides gras et intervient également dans la synthèse des acides gras présentant un nombre impair de carbone. Parmi les métabolites discriminants présents dans la fraction 1, nous éliminons la propionyl-carnitine des candidats potentiellement responsable de l'effet de cette fraction sur l'expression des gènes du partenaire fongique.

## 4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La symbiose mycorhizienne à arbuscule est une interaction intime et complexe entre deux organismes eucaryotes qui ont co-évolué pendant des centaines de millions d'années (Remy *et al.*, 1994). Une racine mycorhizée représente un nouvel organe, mixte, très intégré, dont certains aspects du développement, comme le développement des racines latérales, et de la physiologie, comme la nutrition minérale, sont clairement différents d'une racine non mycorhizée (Smith *et Read*, 2008). Réciproquement, le partenaire fongique acquiert *in planta* de nouvelles compétences qui le rendent par exemple capable de prélever des sucres dans son milieu et de les métaboliser en lipides. Ces nouvelles propriétés et compétences résultent de programmations génétiques modifiées chez les deux partenaires et de l'interaction entre ces programmes. Un des grands objectifs poursuivis par la communauté internationale est de décrire ces nouvelles programmations et de comprendre comment elles sont déclenchées. L'hypothèse de travail qui sous-tend la thèse présentée ici est que chaque partenaire influence l'expression des gènes de l'autre, entre autre, par l'intermédiaire de signaux moléculaires. Dans les étapes précoces par exemple, les lipochitooligosaccharides (Myc LCOs) produits par le champignon régulent l'expression de plusieurs dizaines de gènes chez la plante hôte (Czaja *et al.*, 2012), y compris des microARN (Communication personnelle Formey Damien, doctorant). Inversement les strigolactones ou certains flavonoïdes sont aussi capables de modifier l'expression génique du champignon. Plus tardivement la lysophosphatidyl-choline (LPC), dont l'origine fongique ou végétale n'est pas encore établie, stimule chez la plante un gène symbiotique clé, codant pour un transporteur de phosphate (Drissner *et al.*, 2007). Pour décrire les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la mise en place d'une racine mycorhizée, les approches d'imagerie cellulaire, de mutagenèse, de transcriptomique, de protéomique et de génétique inverse ont été privilégiées (Smith *et Read*, 2008).

Elles ont conduit à des découvertes importantes sur les mécanismes impliqués dans les processus de reconnaissance, d'infection et de colonisation racinaire. Des voies de signalisation et certains signaux précoces échangés entre les partenaires ont été mis en évidence. Très peu d'études ont exploité l'approche

métabolomique et aucune, avant notre travail, n'a cherché à exploiter cette approche pour rechercher, sans *a priori*, d'éventuels métabolites ou signaux régulateurs de la symbiose mycorhizienne.

## 4.1. La méthodologie

### 4.1.1. L'extraction et l'échantillonnage

La première partie du travail a consisté à mettre en place l'ensemble de la méthodologie analytique et de développer un savoir-faire dans l'analyse différentielle du métabolome et plus particulièrement dans le cadre de l'interaction mycorhizienne. Parmi les métabolites impliqués dans la régulation de la symbiose, nous postulons que certains sont échangés entre les deux partenaires et notre premier objectif a été de pouvoir les détecter et les identifier. L'extraction par exsudation a d'abord été envisagée afin de recueillir les molécules à l'interface symbiotique sans extraire les contenus cellulaires. Cette interface est apoplasmique et devait pouvoir être extraite par simple rinçage. Cependant, ce type d'extraction s'est révélé inadapté pour réaliser des analyses différentielles du métabolome. Nous avons observé une trop grande variabilité entre les échantillons probablement induite par des conditions d'exsudation insuffisamment contrôlées et par des lésions sur les racines lors du transfert d'un milieu solide à liquide. Dès lors, une extraction plus conventionnelle avec un solvant organique après un broyage mécanique des tissus dans l'azote liquide a été adoptée pour limiter les perturbations engendrées par l'exsudation. Les racines sont broyées puis extraites au méthanol, sans passer par une étape de lyophilisation qui peut être une cause supplémentaire de variabilité.

Un travail pionnier de métabolomique sur la symbiose mycorhizienne avait montré que le métabolisme secondaire semblait être plus affecté que le métabolisme primaire, lors de l'interaction entre la plante et le champignon MA (Schliemann *et al.*, 2008). Nous avons focalisé notre étude sur les métabolites secondaires, de polarité intermédiaire, et utilisé des techniques analytiques très performantes. Le méthanol a permis de solubiliser un large spectre de molécules avec une bonne reproductibilité.

Le nombre d'échantillons nécessaires pour réaliser une analyse différentielle

du métabolome dépend principalement de la variabilité entre échantillons et de l'objectif à atteindre. La variabilité est la somme de la variance analytique induite par l'approche expérimentale et de la variance biologique. La variance analytique diffère selon la technologie des appareils utilisés lors de l'analyse et selon l'extraction effectuée. Malgré des cultures réalisées dans des conditions les plus identiques possibles, des variations biologiques subsistent et leurs origines sont indéterminées. La part de la variabilité biologique est en générale plus importante que la variabilité technique dans les analyses différentielles du métabolome. Roessner *et al.* (2000) rapportent un facteur de dix entre la variabilité technique et biologique dans ces analyses par GC/MS, (Roessner *et al.*, 2000) et Sumner *et al.* (2003) estime la variance biologique à environ 50% pour leurs cultures de *M. truncatula*. Un moyen de réduire la variabilité biologique consiste à regrouper plusieurs cultures dans un même échantillon, moyennant ainsi cette variabilité biologique. Notre objectif de mettre en évidence les différences métaboliques les plus marquées entre des racines en symbiose et des racines non symbiotiques, justifie l'utilisation de trois échantillons par condition. Chaque échantillon se compose de cinq systèmes racinaires indépendants afin d'atténuer la variabilité biologique. Un nombre réduit d'échantillons permet d'économiser du temps d'acquisition en LC-MS mais également lors du traitement des données. Ce temps a été mis à profit pour réaliser d'autres analyses complémentaires (pseudo-SIM) dans le but d'améliorer la sensibilité des analyses.

#### **4.1.2. La gamme dynamique des concentrations en métabolites**

Apprécier avec précision les différences de concentrations entre les métabolites présents dans une cellule ou un tissu constitue l'un des défis de la métabolomique. La gamme dynamique des concentrations moléculaires couvre plusieurs décades, avec des métabolites présents à l'échelle du milli-molaire jusqu'au fento-molaire, voire à des concentrations inférieures (Sumner *et al.*, 2003; Makkar *et al.*, 2007). Toutes les techniques de détection sont limitées par un effet de saturation si bien que la détection des composés est seulement possible sur une échelle de concentration de quelques décades. La gamme dynamique est de 4 à 5 décades selon les spectromètres de masse. Par conséquent pour une approche de

métabolomique différentielle, la limite de détection est dépendante des composés les plus concentrés dans l'échantillon. Par rapport à la concentration de ces composés majoritaires, les métabolites les moins concentrés, mais encore détectables, seront ceux présents en quantité jusqu'à 100 000 fois plus faible.

Pour augmenter la sensibilité de l'analyse, les critères de sélection des pics ont été moins stringents lors du traitement des données, afin de ne pas éliminer les signaux de faible intensité. En contrepartie, des acquisitions complémentaires en mode pseudo-SIM ont permis de valider certains ions sur lesquels pesaient une incertitude due à leur faible intensité et leur faible rapport « signal sur bruit ». D'autre part, pour optimiser la sensibilité de mesure, la quantité d'échantillon injectée a été augmentée jusqu'à atteindre la limite de saturation en spectrométrie de masse, tout en veillant à ne pas saturer la colonne chromatographique.

#### **4.1.3. Le traitement des données**

Pour le traitement des données, il a fallu choisir le logiciel le plus adapté à nos objectifs. Les critères de sélection ont été l'efficacité dans la détection des pics et la qualité de l'intégration, un logiciel adapté aux caractéristiques des appareils utilisés (UPLC et Q-TOF) et une prise en main rapide. Selon les différents logiciels disponibles, le nombre de retraitement des données et des filtres proposés fluctuent énormément. L'optimisation des réglages de ces paramètres dépend de multiples facteurs : (i) la technologie de la chromatographie (UPLC, HPLC et GC), qui influence la résolution et la nécessité d'un réalignement chromatographique, (ii) le type de spectromètre de masse, c'est-à-dire sa précision de masse, sa résolution spectrale, son détecteur et ses niveaux d'intensité du bruit de fond électronique et du mode d'acquisition (profil ou centroïde) (iii) la nature des échantillons qui génère du bruit de fond de type chimique.

Par conséquent, plus un logiciel applique de traitements et plus il est laborieux d'ajuster les différents paramètres. De plus, les réglages sont plus ou moins empiriques, ce qui demande de réaliser différents tests au préalable et de comparer les résultats pour juger de leur efficacité. La vérification manuelle des résultats est longue mais indispensable dans la mise en place de nouvelles méthodes de traitement des données. Nous avons choisi MarkerLynx, parce qu'il a été développé

par Waters dans le cadre d'analyses du métabolome réalisées sur UPLC-Q-TOF. D'autre part, les processus de retraitement des données se limitent au strict minimum, facilitant l'optimisation des réglages.

Les extraits de racines en symbiose se composent de métabolites d'origine à la fois fongique et végétale. Naturellement, dans un comparatif avec des racines non mycorhizées, toutes les molécules provenant du champignon MA seront criblées comme différentielles. Or nous avons choisi de nous focaliser sur les métabolites fongiques spécifiques de l'état symbiotique. Nous avons donc choisi d'éliminer de nos analyses tous les métabolites retrouvés dans des spores germées ou non germées (avec 100 000 spores par condition).

## **4.2. Les résultats de l'analyse du métabolome**

Les profils d'extraits méthanoliques de racines mycorhizées et non mycorhizées ne présentaient aucune différence visible sur les chromatogrammes enregistrés. Grâce au traitement des données et à une maîtrise de la variabilité biologique et technique tout au long du processus analytique, nous avons identifié plus de 200 ions au moins 10 fois plus abondants dans les racines mycorhizées. Avec des analyses complémentaires, nous avons pu déterminer que ces ions sont issus de 71 métabolites dont 51 sont exclusivement détectés dans les racines en symbiose. Plus de 10% de ces ions sont présents à différents temps de rétention avec une différence de masse inférieure à 10 ppm. Certains métabolites se fragmentent dans le spectromètre de masse et la plupart d'entre eux produisent des ions de même masse (à 10 ppm), mettant en évidence des familles de métabolites affectées par la symbiose. Ce résultat va dans le sens de nombreux travaux d'expression génique. Ils font état d'une régulation positive de nombreux gènes intervenant dans le métabolisme secondaire comme l'induction de gènes codant pour des enzymes de la synthèse des flavonoïdes et des iso flavonoïdes : chalcone synthase, (Bonanomi *et al.*, 2001), isoflavonoïde glycosyl-transférase (Liu *et al.*, 2007). La voie de biosynthèse du méthylerythritol-phosphate, précurseur dans la synthèse de monoterpènes, diterpènes, xanthophylles et apo-caroténoïdes, est davantage sollicitée lors de la symbiose. La 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase 2 (DXS2)

est spécifiquement exprimée lors de la mycorhization (Floß *et al.*, 2008). De plus, de nombreux travaux de transcriptomique mettent en évidence la surexpression d'une dizaine de gènes codant pour des cytochromes P450 (Liu *et al.*, 2003; Brechenmacher *et al.*, 2004; Grunwald *et al.*, 2004; Güimil *et al.*, 2005; Hohnjec *et al.*, 2005; Küster *et al.*, 2007; Gomez *et al.*, 2009; Guether *et al.*, 2009). Cette famille de protéines catalyse une large variété de réactions de mono-oxygénation et d'hydroxylation dans le métabolisme secondaire des plantes (Mizutani *et Sato*, 2011). De plus, la sélection des ions discriminants avec un ratio de concentration de 10 entre racines mycorhizées et non mycorhizées, donne de la robustesse à ce résultat.

#### **4.2.1. Identification structurale des métabolites, un défi majeur chez les végétaux**

L'identification de métabolites à partir d'analyses du métabolome réalisées par spectrométrie de masse, est un véritable défi. Le processus qui mène à la caractérisation d'un métabolite est long, laborieux et incertain ; sa présence dans les bases de données est la condition nécessaire et pratiquement indispensable (Kind *et Fiehn*, 2007; Werner *et al.*, 2008b) mais pas suffisante. Le règne végétal produit une diversité de substances naturelles exceptionnelle, dont la structure chimique est parfois très complexe. Afendi et collaborateurs estiment à environ un million le nombre de métabolites d'origine végétale (Afendi *et al.*, 2012). Près de 200 000 composés sont actuellement répertoriés par la base de données DNP. Chaque espèce posséderait entre 15 000 à 20 000 métabolites spécifiques (Dixon, 2001b; Fernie *et al.*, 2004; Hartmann *et al.*, 2005).

A partir de données obtenues par spectrométrie de masse, le processus d'identification structurale peut se dérouler de deux façons : i) soit avec les ions fils, en s'appuyant sur des bases de données (rares) contenant des informations de MS/MS et de comportements chromatographique comme : la « metabolome tomato » (MoTo) (Moco *et al.*, 2006), la KNApSACK (SHINBO *et al.*, 2006) et la MassBank (Taguchi *et al.*, 2007) de la Platform for Ricken Metabolomics (PRIME) (Matsuda *et al.*, 2009b), ii) soit avec l'ion parent et la génération de formules brutes.

Toutefois, le nombre de métabolites contenus dans les bases de données avec des informations spectrales reste très marginal.

#### 4.2.1.1. L'apport de la précision de masse

La génération de formules brutes à partir d'un ion dépend de la précision de masse et de la taille de la molécule (Figure 4-1).

molecular mass [Da]	Sans information sur le profil isotopique					avec profil isotopique	
	10 ppm	5 ppm	3 ppm	1 ppm	0.1 ppm	2% de précision	
						3 ppm	5 ppm
150	2	1	1	1	1	1	1
200	3	2	2	1	1	1	1
300	24	11	7	2	1	1	6
400	78	37	23	7	1	2	13
500	266	115	64	21	2	3	33
600	505	257	155	50	5	4	36
700	1046	538	321	108	10	10	97
800	1964	973	599	200	20	13	111
900	3447	1712	1045	345	32	18	196

**Figure 4-1** Nombre de formules brutes générées en fonction de la précision de masse et de la mesure du profil isotopique. (D'après Fiehn 2006)

Les formules brutes générées sont conformes aux deux règles chimiques de Lewis et Senior. Le nombre de possibilités augmente selon deux facteurs, la masse du composé recherché et la précision de mesure, aussi bien de la masse que du profil isotopique. De façon remarquable une précision de masse de 3 ppm couplée à une précision de 2% sur le profil isotopique permet d'égaliser la performance d'un spectromètre de masse qui aurait une précision de 0,1 ppm soit trente fois supérieur.

La détermination de la composition atomique d'un composé, en vue de son identification structurale, requiert une bonne précision de masse. L'utilisation de spectromètre de masse à haute résolution est indispensable pour y parvenir. Les premières analyses ont été effectuées sur un Q-TOF Premier (Waters) avec une précision de masse de 5 à 3 ppm, puis sur un Q-TOF Maxis (Bruker Daltonics) de plus haute résolution avec une précision de 1 ppm. Suivant le détecteur utilisé sur les Q-TOF, de type analogique ou digital, des correcteurs de masses sont appliqués. Dans le cas d'un détecteur digital, l'erreur de masse dérive de façon linéaire en

fonction de l'intensité. Le système Time-to-Digital Converter (TDC) applique un algorithme pour supprimer cet effet indésirable et permettre une meilleure précision de masse. Néanmoins, les ions de plus faibles intensités ainsi que ceux de plus fortes intensités présentent les plus grandes erreurs de masse et ne peuvent pas être corrigés (Mihaleva *et al.*, 2008).

#### 4.2.1.2. L'apport du profil isotopique dans la génération de formule brute

Par ailleurs, même une très bonne précision de masse aux alentours de 1 ppm, ne suffit pas à attribuer une seule formule brute, hormis pour les plus basses masses inférieures à 300 daltons (Figure 4-1). Cependant, la composition atomique des métabolites des organismes vivants dépend de l'abondance naturelle des isotopes, comme le C<sup>13</sup> (1,1% de l'isotope du carbone léger C<sup>12</sup>), O<sup>18</sup> (0,2 % de O<sup>16</sup>), N<sup>15</sup> (0,36% de N<sup>14</sup>) et S<sup>33</sup> et S<sup>34</sup> (respectivement 0,79% et 4,43% de S<sup>32</sup>). Par conséquent, le profil isotopique d'un ion représente une signature de sa composition atomique. La masse du pic mono isotopique (M<sub>0</sub>), couplée à la mesure de

l'abondance des différents isotopes (M<sub>0</sub>, M + 1, M + 2, M + 3) permet de réduire sensiblement le nombre de formules brutes proposées (Kind *et Fiehn*, 2006). Seules les données acquises sur le Q-TOF Maxis ont servi à générer les formules brutes par l'intermédiaire de SmartFormula3D (Bruker Daltonics). Avec une plus grande précision de masse et une meilleure définition du profil isotopique (2% d'erreur) par rapport au Q-TOF Premier, le nombre de formules brutes proposées est réduit. Certaines contraintes peuvent être imposées dans la génération de formules brutes : (i) une restriction sur le nombre d'éléments pouvant entrer dans la composition atomique, (ii) une compatibilité avec des règles chimiques de LEWIS et de SENIOR, (iii) un contrôle des ratios entre le nombre des différents éléments par rapport au nombre de carbones, (iv) dans le cas de dérivation, l'utilisation de la présence de triméthylsilylation (Kind *et Fiehn*, 2007). Systématiquement, tous les ions criblés dans l'analyse du métabolome ont subi une génération de formules brutes, restreinte aux éléments suivant : C, H, O, N, P, S, Cl, Na et K. Parmi les 134 ions caractéristiques de la mycorhization qui ont été détectés sur le Q-TOF Maxis, le

logiciel Smart formula3D a proposé une ou plusieurs formules brutes avec un score inférieur à 100 pour 62 ions. Au-delà d'un score de 100, les formules brutes générées respectent rarement les règles chimiques. De plus les ratios entre atome de carbone et les autres atomes ne correspondent pas à ceux de 98% des molécules biologiques contenu dans les bases de données, selon Kind et Fiehn (Kind et Fiehn, 2007). Au final, 38 ions se voient attribuer une seule formule brute dont 5 sont des ions parents.

#### 4.2.1.3. Les différentes difficultés dans l'identification structurale

Plusieurs obstacles sont apparus au cours de la détermination des compositions atomiques. Tout d'abord avec les métabolites qui ont subi une forte fragmentation dans le spectromètre de masse, une incertitude subsiste sur l'identification de l'ion parent (métabolite ionisé). Dans le cas de métabolites criblés avec plusieurs ions un doute demeure quant à l'identification de l'ion parent, la fragmentation a peut être entraîné sa disparition au profit des ions fils. D'autre part, les métabolites identifiés avec des ions présents en faible quantité ont des profils isotopiques tronqués et faussés. En effet, pour obtenir un profil isotopique de bonne qualité avec la détection d'un grand nombre d'isotopes, l'intensité de l'ion doit être suffisamment élevée. Dans le cas contraire, à faible intensité peu d'isotopes sont détectés. La mesure de l'abondance isotopique est alors moins précise et le bruit de fond prend une part plus importante et non négligeable dans les aires des pics du profil isotopique. La dernière difficulté est liée aux ions de masse supérieure à 500 daltons dont le nombre de formules brutes générées augmente significativement. Ce phénomène s'amplifie quand les ions sont détectés à de faibles intensités, le profil isotopique est alors de moins bonne qualité.

L'importance de déterminer une seule formule brute par composé à identifier se justifie amplement surtout pour les métabolites avec des masses supérieures à 300 Dalton. Le choix de la base de données dépend de l'organisme étudié. Nous avons privilégié dans un premier lieu les plus spécifiques pour aller ensuite vers les plus généralistes. Or, l'interrogation des bases de données génère de nombreuses molécules. Pour la formule brute  $C_{15}H_{12}O_7$ , 129 composés sont recensés dans la base de données DNP (figure 4-2).

Database name	Compounds found	Total database entries
Chemical Abstracts (CAS)	181	24,000,000
Beilstein Database (MDL)	166	8,000,000
Dictionary of Natural Products (DNP)	129	170,000
PubChem (NIH)	19	800,000
Available Chemicals Directory (MDL)	6	400,000
ChemIDplus (NIH)	6	370,000
KEGG (Kyoto University)	3	13,000
NIST05 (NIST mass spectral database)	2	163,000
MOLGEN molecular isomer generator (allowing 2 benzene groups; 1 ether group, 1 keto group; 5 hydroxy groups)	788,000	-

Figure 4-2 Exemple d'une interrogation des bases de données avec la formule brute suivante :  $C_{15}H_{12}O_7$  (d'environ 300Da) (d'après Fiehn 2006).

Pour une molécule de 300 Da, la recherche dans la base de données Dictionary of Natural Product (DNP) avec sa formule brute fournit 129 composés.

Sur la base des analyses en spectrométrie de masse, la génération de formule brute donne une seule possibilité pour les cinq ions parents des métabolites 5, 6, 7, 38 et 64. Les interrogations dans la base de données DNP propose de 4 à 74 molécules. Par spectrométrie de masse, seules des acquisitions en  $MS^n$  peuvent fournir des informations supplémentaires dans l'objectif d'identifier le métabolite, ou du moins, de réduire le nombre de candidats potentiels. La fragmentation du métabolite peut engendrer des pertes de groupement comme des oses, O-méthyl, malonyl,  $CO_2$  etc..., tous ces indices permettent d'éliminer certaines molécules. Certains logiciels, comme ADC/MS fragmenter et Fragment iDentificator, prédisent les différents fragments que peut produire une molécule. Certains auteurs affirment que ces logiciels permettent dans plus de 80% des cas d'identifier le bon métabolite. En plus de l'interrogation des bases de données avec une formule brute, la comparaison des spectres de tous leurs candidats potentiels générés *in silico* avec les spectres de fragmentations expérimentaux, offre la possibilité de trouver la bonne structure moléculaire (Heinonen *et al.*, 2008; Tyrkkö *et al.*, 2010). Dans le cas où un seul métabolite concorde, son identification devra être confirmée par l'utilisation d'un standard afin de vérifier que son comportement chromatographique et sa fragmentation coïncident. Dans les cas contraires, d'autres méthodes complémentaires devront être employées, les plus fréquentes étant la

RMN, l'UV, et l'IR afin d'enrichir les informations sur le métabolite (Werner *et al.*, 2008b).

Seul le métabolite 5 génère un spectre de fragmentation exploitable menant à l'identification de la propionyl-carnitine, confirmée par l'utilisation du standard de cette molécule. Pour les 3 autres métabolites, un enrichissement par pré-purification est nécessaire, afin de pouvoir obtenir des spectres de fragmentations exploitables.

Dans le cas des 67 autres métabolites, la plupart ont des masses supérieures à 500 Da. En admettant que tous ces composés soient contenus dans les bases de données, même un enrichissement par purification partielle ne garantirait ni la détermination de leur formule brute ni leur identification étant donné le nombre élevé de molécules proposées. Un recours à la RMN impliquerait la purification de chaque métabolite et l'obtention de quantité de l'ordre de la micro-mole à une dizaine de nano-mole en fonction du spectromètre utilisé.

#### **4.2.2. Utilisation d'une stratégie originale**

Dans notre objectif d'identifier des métabolites clés impliqués dans la symbiose mycorhizienne, nous avons élaboré une stratégie qui associe une analyse du métabolome à une analyse d'expression de gènes affectés durant la symbiose. L'analyse différentielle du métabolome a pour but de cribler un ensemble de métabolites candidats en sélectionnant ceux qui sont d'avantage présents dans les racines mycorhizées. Quant à l'analyse transcriptomique, elle a pour but de sélectionner parmi ces métabolites criblés ceux qui présentent un intérêt biologique, reflété par leur activité sur le transcriptome du champignon MA. Seuls les métabolites soupçonnés d'avoir un rôle régulateur dans la symbiose justifient une identification structurale. De plus cette stratégie permet d'obtenir les premiers éléments d'informations pour élucider le rôle biologique de chaque métabolite criblé grâce aux fonctions des gènes dont il module l'expression.

Pour limiter le coût et le temps d'analyse, nous devons faire un choix entre réaliser une analyse transcriptomique sur des gènes fongiques ou des gènes végétaux. Grâce à notre maîtrise de la culture du champignon MA et nos compétences en transcriptomique au sein de l'équipe, et à notre participation au consortium de *R. irregularis* qui nous permet de disposer de données sur le

transcriptome du champignon MA, nous avons choisi d'étudier l'expression de gènes fongiques. Nous avons choisi 91 gènes dont les expressions sont affectées durant la symbiose. La stimulation des spores du champignon MA avec des extraits méthanoliques de racines mycorhizées ou non mycorhizées fractionnées par HPLC a permis d'observer des variations d'expression de certains gènes. Ce résultat est remarquable puisque dans un système expérimental sans la présence de la plante et avec le champignon MA dans un état physiologique différent de celui de la symbiose, des gènes spécifiques de la symbiose ont été régulés par la présence d'extraits racinaires. Cela nous permet de valider l'hypothèse que nous faisons, à savoir que l'on peut dans une certaine mesure simuler les conditions *in planta*, avec des spores en germination, par l'apport d'extraits racinaires. Cela rappelle les travaux de Hildebrandt et collaborateurs qui avaient montré que les hyphes de *R. irregularis* Sy167 en présence de bactéries *Paenibacillus validus* (DSM ID617 et ID618) pouvaient croître un certain temps sans la présence de la plante en produisant des structures ressemblants à des arbuscules et des spores filles capable de germer. Ils avaient également mis en évidence des inductions d'expression génique chez le champignon en présence d'exsudats bactériens (Hildebrandt *et al.*, 2002; Hildebrandt *et al.*, 2006). L'ensemble de ces observations suggèrent que la biotrophie du champignon MA pourrait en partie être contrôlée par des signaux externes. On peut espérer un jour créer un système expérimental *ex planta* pour étudier les mécanismes de régulation de la symbiose endomycorhizienne.

Les fractions 1, 5, 6, 8, 9 et 10 sont les plus actives sur la régulation des gènes spécifiques de la symbiose chez le champignon MA. Cependant pour les fractions 8 et 10, l'analyse métabolique n'a criblé aucun métabolite discriminant. Cela pourrait s'expliquer par la nature plus apolaire des métabolites contenus dans ces fractions, l'ionisation de type ESI étant moins efficace sur les composés plus hydrophobes. La perte de sensibilité pénalise l'analyse différentielle dans cette zone du chromatogramme. Une source d'ionisation de type APCI ou une analyse par GC-MS seraient probablement plus efficaces. La nature chimique de la colonne chromatographique n'est peut être pas adaptée aux molécules actives de ces fractions. Une autre possibilité serait que la concentration des molécules actives soit très faible. La technologie utilisée ne permettrait alors pas de les identifier. Une autre hypothèse pourrait être que les concentrations des molécules actives et présentes dans les fractions 8, 9 et 10 ne seraient pas dix fois plus concentrées dans les

racines mycorhizées. Le caractère extrêmement complémentaire des deux approches métabolomique et transcriptomique offre ici la possibilité de revenir sur des données déjà acquises pour y extraire de nouvelles informations. La recherche de nouveaux ions discriminants à des temps de rétention correspondants aux fractions 8, 9 et 10, a conduit à cribler potentiellement 24 métabolites supplémentaires dont les concentrations sont de 2 à 9,9 fois plus importantes dans les racines mycorhizées. Ces ions mériteront d'être étudiés plus amplement dans le futur et plus particulièrement ceux présents dans la fraction 10.

Parmi les métabolites que nous avons criblés dans la fraction 5, qui est très active sur l'expression des gènes du champignon MA, le métabolite 38 a la même composition atomique que 39 composés présents dans la base de données DNP. Certains sont caractérisés par une activité antimicrobienne et antifongique, comme la chromomoric acid C (Liu *et al.*, 1994; Ragasa *et al.*, 2008), la ML 236A, de la famille des statines inhibitrices des 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A reductase (HMG-CoA réductase) impliquée dans la synthèse des stérols (Endo *et al.*, 1976; Endo *et al.*, 1977) et la bakuchiol, molécule composée d'une fonction phénol et d'une structure partielle de terpènes (meroterpène), retrouvée dans *Psoralea corylifolia* (babchi) et *Otholobium pubescens*, des plantes médicinales de la famille des Fabaceae, tout comme *Medicago truncatula* (Katsura *et al.*, 2001; Hsu *et al.*, 2009). Cette fraction 5 contient des molécules responsables d'un effet inhibiteur sur l'expression de six gènes. L'activité biologique connue des molécules pouvant correspondre au métabolite 38 concorde avec l'action de la fraction 5 sur l'expression des gènes fongiques. De plus, parmi les gènes dont l'expression est réprimée par la fraction 5, le gène 11 code pour une lyso-phosphatidylcholine-O-acyltransferase, impliquée dans la synthèse de lyso-phosphatidylcholine. Or Drissner et collaborateurs avaient démontré que la lyso-phosphatidylcholine régulait positivement l'expression d'un transporteur de phosphate spécifique de la mycorhization et essentiel dans le maintien de la symbiose (Drissner *et al.*, 2007). Ces travaux ne déterminaient pas si la lyso-phosphatidylcholine était un signal d'origine fongique ou végétal. La fraction 5 est très intéressante puisqu'elle contient potentiellement un métabolite pouvant réguler la production de lyso-phosphatidylcholine, elle même jouant un rôle dans la symbiose mycorhizienne. Le métabolite 38 est donc un candidat intéressant. Cependant, il faudrait vérifier qu'un extrait pré-purifié du métabolite 38 est bien capable d'inhiber la transcription du gène

impliqué dans la synthèse de la lyso-phosphatidylcholine, avant de se concentrer sur son identification.

A moyen terme, l'objectif est d'identifier les métabolites qui affectent l'expression de gènes spécifiques de la symbiose chez le champignon MA. Pour cela, les métabolites criblés dans les fractions HPLC les plus actives, comme le métabolite 38, devront être prioritairement isolés avant de tester individuellement leurs effets sur le champignon MA. Dans le cas où ils affectent le transcriptome du champignon MA des investigations seront menées afin d'identifier leurs structures. De nouvelles acquisitions en spectrométrie de masse avec un échantillon pré-purifié permettront d'obtenir des profils isotopiques de meilleure qualité par rapport aux mélanges complexes des extraits racinaires bruts et ainsi de faciliter la détermination d'une formule brute. Si l'interrogation des bases de données et l'exploitation des spectres de masse ne permettent pas une identification du métabolite alors des analyses en RMN devront être envisagées sur des molécules pures.

#### **4.2.2.1. La propionyl-carnitine**

La propionyl-carnitine est détectée exclusivement dans les racines en symbiose, cette molécule appartient à une famille de composés, les acylcarnitines, dont l'unité de base est la carnitine, découverte en 1905 par des chercheurs russes, Gulewitsch et Krimberg, alors qu'ils étudiaient des extraits de muscle de bœuf. Le nom de la carnitine provient du mot latin « carnis » qui signifie chair. Les acylcarnitines sont au cœur du métabolisme énergétique. Elles interviennent dans le métabolisme oxydatif des acides gras. Fritz est le premier à l'avoir mis en évidence en 1955 (Fritz, 1955). La carnitine est un transporteur d'acyles, elle fait transiter les acyles aux travers de la membrane interne des mitochondries, afin d'alimenter les cycles du glyoxylate et le cycle de Krebs ou à l'inverse d'alimenter la synthèse des acides gras. Elle permet le transfert des acyles grâce à une condensation, ainsi les acylcarnitines formées peuvent traverser la membrane interne des mitochondries via des transporteurs spécifiques d'acylcarnitines, caractérisés chez l'homme (Rubio-Gozalbo *et al.*, 2004). Dans les génomes de champignons, comme *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*, sont retrouvés trois acylcarnitines transférases

putatives (Elgersma *et al.*, 1995; Kawachi *et al.*, 1996; Prigneau *et al.*, 2004; Strijbis *et al.*, 2008). Le métabolisme énergétique des champignons MA est très largement relié aux lipides qui constituent la forme très majoritaire de réserve carbonée et d'énergie (Beilby *et* Kidby, 1980; Bago *et al.*, 2002). De plus, les champignons MA sont des biotrophes obligatoires, incapables de réaliser leur cycle de vie sans un flux de carbone délivré par la plante sous forme de monosaccharides. Le métabolisme carboné est au cœur de la dépendance du partenaire fongique vis-à-vis de la plante. Or le traitement des spores de *Rhizophagus irregularis* avec la propionyl-carnitine ne montre aucun effet sur l'expression des gènes affectés par la fraction 1. Ce métabolite n'est pas une molécule « signal » perçue par le champignon MA. Il semble aussi peu probable qu'il soit issu de l'oxydation des acides gras puisque en symbiose le champignon synthétise ces acides gras contrairement à la phase pré-symbiotique où il puise dans ces réserves lipidiques pour croître. Or la propionyl-carnitine s'accumule spécifiquement lors de la symbiose MA. Deux hypothèses peuvent être formulées à ce stade : (i) la propionyl-carnitine est produite par la plante et non par le champignon MA, soit (ii) elle est un substrat dans la synthèse des acides gras à longues chaînes avec un nombre de carbone impair.

### 4.3. Les perspectives à plus long terme

Dans une perspective à plus long terme, des analyses transcriptomiques identiques à celles effectuées sur le champignon MA devront être réalisées sur la plante. Un travail de sélection des gènes de plante, dont l'expression est modulée lors de la symbiose, a déjà été accompli, ainsi que la détermination des couples d'amorces associées pour réaliser des analyses d'expression génique par qRT-PCR. D'autre part, des analyses du métabolome de plantes mutantes affectées dans le fonctionnement de la symbiose, permettraient de mettre en évidence des métabolites « clés » dans la régulation de cette interaction. La plupart des mutants décrits dans la littérature altère l'initiation de la symbiose. Néanmoins, certains ont un impact dans les phases plus tardives comme le mutant B9 chez *Medicago truncatula* avec une augmentation de la fréquence des arbuscules (Morandi *et al.*, 2009). De même, des mutants de pois sur les gènes Sym36, Sym33, et Sym40 présentent une diminution et une dégénérescence des arbuscules (Jacobi *et al.*, 2003; Kuznetsova *et al.*,

2010). Et enfin, l'élargissement du champ d'investigation de l'analyse métabolique pourrait être réalisé, via une exploration plus vaste du métabolome, avec la mise en place de nouvelles méthodes analytiques incluant les métabolites plus hydrophiles et plus hydrophobes.

#### 4.4. Conclusions

Ce travail de thèse a permis de mettre en place une méthode d'analyse métabolique non ciblée par LC-MS visant à identifier des métabolites impliqués dans la symbiose mycorhizienne à arbuscules. Cette méthode a été axée sur des métabolites de polarité intermédiaire. L'ensemble des étapes du processus analytique a été optimisé. La culture des racines a été réalisée de façon à diminuer la variabilité du taux de mycorhization et à faciliter le prélèvement des racines, sans induire de perturbation métabolique avant l'extraction, grâce à une culture *in vitro* sur gélose et papier filtre. Les différents paramètres chromatographiques et de spectrométrie de masse ont été définis pour obtenir les meilleures résolutions possibles. Le traitement des données a été adapté aux appareils utilisés (UPLC-Q-TOF) et à des extraits de type racinaire. Cette méthode a été validée dans un projet annexe, qui consistait à identifier des changements dans le métabolome de racines cultivées avec de fortes et de faibles fertilisations en phosphate (Laparra *et al.*, 2011).

L'analyse métabolique a permis la discrimination de 71 molécules qui sont au moins 10 fois plus présentes dans les racines mycorhizées que dans les racines non mycorhizées. Parmi elles, une cinquantaine de métabolites n'avaient jamais été criblés comme caractéristiques de la mycorhization. Bien que seule la propionyl-carnitine ait été identifiée, nous fournissons pour les autres métabolites des informations sur leur masse ou/et leur profil de fragmentation. Ces informations représentent une bibliothèque de données, obtenues avec des organismes modèles, qui s'ajouteront aux données génomiques, transcriptomiques et protéomiques déjà existantes et qui pourront être exploitées comme ces dernières par l'ensemble de la communauté des scientifiques qui étudient la symbiose MA. L'apport de l'analyse transcriptomique permet de cibler les métabolites ayant potentiellement un rôle

important dans la symbiose et contribue à fournir les premières pistes dans une étude fonctionnelle grâce aux fonctions biologiques que l'on attribue aux gènes affectés.

L'exploitation agronomique de la symbiose MA pour réduire les besoins en irrigation, en engrais chimique et en pesticides est encore extrêmement limitée. Elle bute sur notre incapacité à maîtriser correctement la culture des champignons MA pour produire de l'inoculum à grande échelle et bon marché. Nos connaissances sur les mécanismes génétiques et moléculaires qui sous tendent la reconnaissance des partenaires, la mise en place de la symbiose, son efficacité et sa durabilité, sont encore trop fragmentaires. L'identification de métabolites affectant la symbiose endomycorhizienne et la caractérisation de leur rôle biologique permettra de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors de l'interaction entre les plantes mycotrophes et les champignons MA. Ces connaissances contribueront, peut être un jour, à mieux contrôler la symbiose pour développer de nouvelles technologies en agriculture durable.

## 5. ANNEXES

### 5.1. Matériels et méthodes

#### 5.1.1. Culture des racines et mise en germination du champignon MA

##### 5.1.1.1. Culture de racines mycorhizées et non mycorhizées

Dans une boîte de Petri ronde (145Ø x 20 mm) sont introduit 100 ml de milieu minimum (milieu M) (Bécard *et* Fortin, 1988) avec 10 g/L<sup>-1</sup> de sucrose (Sigma) et gélifié par 3 g/L<sup>-1</sup> de phytigel (Sigma, Steinheim, Germany). Après la solidification de la gélose, un papier filtre (Wattman n°1 qualitatif) préalablement stérilisé est déposé à sa surface. L'extrémité d'une racine latérale (d'une longueur ≈ 5 cm) de *Medicago truncatula* transformée par Ri T-DNA d'*Agrobacterium rhizogenes* est apposée au centre du papier filtre. Pour obtenir des racines mycorhizées, 500 spores stériles de *Rhizophagus irregularis* DAOM 194757 (Agronutrition) sont déposées sur les racines. La culture de racines composites dure huit semaines, à 24°C, à 80% d'humidité et dans l'obscurité.

Pour les racines composites produites par Agronutrition, les conditions de culture sont identiques, mais adaptées à l'échelle de l'unité de production et le temps de culture est prolongé jusqu'à dix semaines.

##### 5.1.1.2. La germination de spores du champignon MA

Les spores de *Rhizophagus irregularis* (DAOM 197198) sont mises à germer dans une boîte de Pétri ronde (145Ø x 20 mm), dans 50 ml de milieu M sans sucrose, pendant 5 jours, dans l'obscurité, à 28°C, avec une atmosphère à 2% de CO<sub>2</sub>. Pour les spores stimulées par une strigolactone de synthèse, 100µl de GR 24 dissout dans un mélange eau /acétone (80/20) à 10<sup>-6</sup> M, sont ajoutés pour atteindre une concentration finale de 5.10<sup>-8</sup> molaire.

### **5.1.2. Extraction et quantification du taux de mycorhization**

Les racines humides sont placées dans un mortier contenant de l'azote liquide puis partiellement broyées avec le pilon pour obtenir des fragments d'environ un centimètre.

#### **5.1.2.1. Quantification du taux de mycorhization**

Le mélange de fragments racinaires est homogénéisé, environ un gramme de racine est prélevé pour quantifier le taux de mycorhization. Les racines sont placées dans une solution de potasse caustique à 10%, portées à 90°C, pendant 6 minutes, puis rincées abondamment à l'eau froide. Elles sont ensuite plongées dans une solution d'acide acétique 5% et d'ancre de Shaeffer 5% et portée à ébullition durant 6 minutes (Vierheilig *et al.*, 1998b). Des rinçages successifs à l'eau sont effectués avant l'estimation du taux de mycorhization par la Gridline Intersect Method (Giovannetti *et Mosse*, 1980), un minimum de 600 intersections sont comptabilisées par échantillon.

#### **5.1.2.2. Extraction des racines**

Les fragments racinaires pré-broyés en fragments sont introduits dans un bol en acier contenant de l'azote liquide et broyés à 6000 rpm pendant 20 secondes dans un broyeur mécanique, cette opération est répétée trois fois, jusqu'à obtention d'une fine poudre.

##### **5.1.2.2.1. Pour l'analyse du métabolome**

La poudre de racines fraîches (150 mg) est extraite au méthanol pur dans un tube en verre (1 ml) en subissant trois fois : une minute de sonication suivi d'une minute de vortex. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 6 000 rpm durant 5 minutes à 20°C, le surnageant est ramené à sec sous un flux d'azote à 30°C et conservé à -80°C.

#### **5.1.2.2. Pour l'analyse transcriptomique**

La poudre de racines fraîches (7 g) est extraite au méthanol pur (47 ml) dans une ampoule à décanter subissant trois fois : une minute de sonication suivie d'une minute d'agitation. Les débris cellulaires sont éliminés par filtration sur papier (Wattman qualitatif N°1), le filtrat est ramené à sec avec un évaporateur rotatif, à 30 C° puis conservé à -80 C°.

#### **5.1.2.3. Extraction de *Rhizophagus irregularis***

Environ 100 000 spores de *Rhizophagus irregularis* (DAOM 197198) non germées ou germées (avec ou sans une strigolactone synthétique (GR 24) à  $5 \cdot 10^{-8}$  M) sont broyées dans l'azote liquide avec un mortier et un pilon, puis extraites avec 1 ml de méthanol pur, en réalisant trois fois : une minute de sonication suivie d'une minute de vortex. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 6 000 rpm durant 5 minutes, le surnageant est ramené à sec sous un flux d'azote à 30 C° et conservé à -80 C°.

### **5.1.3. Analyse par LC-MS**

#### **5.1.3.1. Reprise des échantillons**

Les échantillons d'extraits racinaires (issus de 150mg de racines) et les extraits de spores (issus de 100 000 spores) sont repris dans 100 µl d'eau / méthanol (80 / 20).

#### **5.1.3.2. Analyse par UPLC-Q-TOF (Waters)**

Les analyses en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse ont été accomplies sur un système Waters Acquity™ Ultra Performance Liquide Chromatographie (Waters Corporation, Milford, USA) équipé d'une pompe binaire, d'un dégazeur en ligne, un injecteur automatique réfrigéré. Une colonne UPLC BEH C<sub>18</sub> (2,1 x 150 mm, 1,7 µm) a été utilisée pour la séparation des composés avec une température de 40C°. Un gradient d'élution binaire est constitué de l'éluant A (eau et 0,05% d'acide formique), et de l'éluant B (acétonitrile et 0,05% acide formique), dans des proportions : 0 à 0,5 min, B 5% ; 0,5 à 11 min, B 5-50% ; 11 à 15min, B 50-100% ; 15 à 16 min, B 100%. L'injecteur automatique est conditionné à 5 C°, le volume d'injection est de 10 µl, en mode « partial loop » et le débit est fixé à 400 µl.min<sup>-1</sup>. Le spectromètre de masse utilisé est un Q-TOF Premier (Waters, Co., UK) équipé d'un Lock Spray et du logiciel d'exploitation MassLynx. Le voltage du capillaire est réglé sur 3 kV et le voltage du cône sur 30 V. La température de la source est paramétrée sur 100C° et la température de dé-solvatation sur 350C°. L'azote et l'argon sont respectivement utilisés comme gaz pour le cône et la cellule de collision. Au niveau du cône et pour la dé-solvatation, les débits de gaz sont de 60 et 600 L.h<sup>-1</sup>, respectivement. Les données de spectrométrie de masse sont acquises en mode full scan avec une gamme de masse de 100 à 1000 m/z et 100 à 1500 m/z. La leucine enképhaline est utilisée comme calibrant interne, infusée par la Lock Spray. La vitesse de scan est de 0,4 secondes, avec un interscan à 0,05 secondes, un spectre de leucine enképhaline est enregistré toutes les 10 secondes.

Les acquisitions en mode SIM ont été réalisées avec les mêmes paramètres, hormis que le quadripôle a servi à sélectionner les ions de m/z souhaités. De même les paramètres de la cellule linéaire en amont du tube à temps de vol sont redéfinis automatiquement par l'appareil en fonction de la m/z de l'ion sélectionné en mode « full enhanced ».

### 5.1.3.3. Analyse par UHPLC-Q-TOF (Bruker Daltonics)

Les analyses ont été accomplies sur une chaîne UHPLC Ultimate 3000 (Dionex), équipée d'une pompe quaternaire, d'un dégazeur en ligne, un injecteur automatique réfrigéré, l'ensemble piloté par Chromaléon (Dionex). Tous les paramètres chromatographiques sont identiques à ceux appliqués précédemment pour l'UPLC Waters. Le spectromètre de masse utilisé est un Q-TOF Maxis (Bruker Daltonics). Le voltage du capillaire est réglé sur 4,5 kV, le « Set End plate Offset » à -500V, le « Nebulizer » à 40,6 psi, le « Dry Heater » à 190°C et le « Gas Dry » à 12 l/min. Les données sont acquises en mode full scan avec une gamme de masse de 100 à 1000 m/z et 500 à 3000 m/z. Le méthyl-stéarate est utilisé comme calibrant interne. La vitesse de scan est d'une seconde avec un délai interscan à 0,05 seconde. Les données sont exportées par Compass dans le format netCDF puis retransformées par X-Bridges (Waters) au format de MarkerLynx pour permettre le retraitement des données.

### 5.1.3.4. Génération de formules brutes

Les formules brutes sont générées grâce au logiciel SmartFormula3D. Les différentes contraintes imposées sont la précision de masse de 2 ppm et la composition atomique réduite aux éléments suivants : C, H, O, N, P, S, I, Cl, Na, et K.

### 5.1.4. Traitements des données (métabolomique différentielle)

Le traitement des données LC-MS est réalisé grâce au logiciel MarkerLynx (Waters), sur une gamme de masse de 100 à 1000 m/z, de 0 à 15 minutes et une précision de masse définie à 0,05 Da. La résolution des pics chromatographiques (à 5%) est définie par le logiciel, ainsi que l'estimation du bruit de fond. Les chromatogrammes ne sont pas réalignés en fonction de l'injection d'un standard et

ne subissent aucun lissage. La détection des pics chromatographiques s'effectue avec une valeur seuil d'intensité, fixée à trois fois le bruit de fond et d'une intensité spectrale de 100 coups pour les analyses sur le Q-TOF Premier (Waters) et 1000 coups pour les analyses sur le Q-TOF Maxis (Bruker Daltonics).

#### **5.1.5. Constitution des fractions par HPLC préparative**

Les extraits, obtenus à partir de 7g de racines fraîches broyées et extraites au méthanol pur, sont repris dans 1 ml d'un mélange eau/acétonitrile (95/5) et 5% de diméthylsulfoxyde (DMSO). Les extraits de trois échantillons « mycorhizés » ou « non mycorhizés » sont fractionnés sur un système d'auto purification HPLC / MS (Waters) composé d'un injecteur 2767, d'une pompe binaire 2545, d'un détecteur par photodiodes 2998 et d'un spectromètre de masse (3100 Mass Detector), le tout piloté par les logiciels MassLynx et FractionLynx (Waters). Pour chaque échantillon, le millilitre est injecté sur une colonne XBridge C18 OBD (10µm, 50 x 150 mm) (waters), avec un débit de 17 ml.min<sup>-1</sup> et un gradient d'élution constitué de l'éluant A (eau et 0,05% d'acide formique), et de l'éluant B (acétonitrile et 0,05% acide formique), avec le programme suivant : 0 à 2 min, B 0% ; 2 à 15 min, B 0-50% ; 15 à 20min, B 50-100% ; 20 à 22 min, B 100%. Les fractions sont récoltées toutes les 2 minutes, à partir de la deuxième minute, regroupées par condition pour être séchées à l'évaporateur rotatif à 30°C.

#### **5.1.6. Stimulation des spores pré germées de *Rhizophagus irregularis***

##### **5.1.6.1. Par les fractions issus des extraits racinaires**

Toutes les fractions sont reprises dans un volume de 700µl dans des proportions eau / acétonitrile (95/5). Dans chaque boîte de Pétri ronde (35Ø x 10 mm), 20 000 spores de *Rhizophagus irregularis* (DAOM 197198) (Agronutrition) sont

introduites avec 10 ml de milieu M et pré-germées deux jours à l'obscurité sous atmosphère à 2% de CO<sub>2</sub> et à 30°C. A 48 h les spores sont induites par 100 µl de chaque fraction HPLC, pendant 24 h ou 7 jours. Trois réplicas biologiques sont effectués par fraction HPLC et par temps d'induction.

#### 5.1.6.2. Par la propionyl-carnitine

De la même façon que pour les fractions HPLC, 100 µl d'une solution de propionyl-carnitine (Sigma-Aldrich) dissoute dans l'eau, à des concentrations finales de 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-7</sup> et 10<sup>-5</sup> M, a été ajouté aux spores pré-germées pour une induction de 24 h, 48 h et 7 jours. Trois répétitions biologiques sont réalisées pour chaque test.

#### 5.1.7. Analyse transcriptomique

Les gènes ciblés ont été choisis à partir de données globales d'expression géniques, réalisées par le consortium Glomus (<http://mycor.nancy.inra.fr/IMGC/>), sur des hyphes extra-racinaires et intra racinaires, ainsi que sur des spores de *Rhizophagus irregularis*. Un groupe de 91 gènes a été sélectionné en fonction de leur niveau d'expression, leurs amorces PCR ont été définies à l'aide du logiciel Primers 3, afin que les produits de PCR soient compris entre 90 et 110 bp avec un T<sub>m</sub> entre 58 et 62°C. La qualité des amorces et leur spécificité ont été testées et validées par qPCR avec des cDNAs de *M. truncatula* colonisé par *Rhizophagus irregulare* (culture de 7 semaines et un taux de mycorhization de 70%) et avec des cDNAs de spores de *Rhizophagus irregulare* après 6 jours de germination à 30°C, 2% CO<sub>2</sub> dans du milieu M. Les spores de *Rhizophagus irregulare* mises en présence des fractions HPLC ont été filtrées et plongées dans l'azote liquide, les temps d'induction 24 h et 7 jours ont été regroupés. Chaque échantillon a été broyé à froid avec le Lysing Matrix A (MP Biomedical), par agitation. Les ARNs ont été extraits avec le RNeasy plant mini kit (Qiagen) suivant les recommandations du fabricant puis quantifiés par Nanodrop®, la qualité des extractions d'ARN a été vérifiée par Agilent®. La Réverse transcription a été réalisée avec le Verso cDNA kit (Thermo

Science) en utilisant 1µg d'ARN. Les ADNc obtenus ont été dilués à 5 ng/µl et leur qualité a été vérifiée par PCR.

La mesure de l'expression des 96 gènes de spores de *Rhizophagus irregularis* en germination et stimulés par les fractions HPLC a été réalisée par le système Biomark II (Fluidigm) selon le protocole de la Plateforme Génomique de Toulouse. La quantification relative du niveau d'expression de chaque gène a été réalisée selon la méthode des  $\Delta\Delta Ct$ . Les différences d'expressions géniques entre fraction mycorhizées et non mycorhizées ont été validés par un t-test ( $p < 0,05$ ), la robustesse des répétitions biologiques a été évalué par la méthode du jackknife.

## 5.2. Liste des gènes utilisés pour l'analyse transcriptomique

Gene id	Gene list	Associated metabolism	Ratio infected root Medicago/ spores	Putative function	e-value	Primer forward Primer reverse
remain_c782	Gene_1	Cell cycle related protein	27,23	Centromere-associated protein NUF2	3,E-33	CGGATGCAACACTATTCGAC CAGAGTGGAGTGGACCGATAA
step3_c2733	Gene_2	Other	0,00	Uncharacterized methyltransferase C1B3.06c OS=Schizosaccharomyces pombe	4,E-06	CGAACGATATAAATGATGTTGATAGG ATCATCTTCAATCGGGGAAG
remain_c6205	Gene_3	Energy production and conversion	0,24	NADH-cytochrome b5 reductase-like protein OS=Arabidopsis thaliana	5,E-05	GCCGGTGGAGGTACAGAATA TTATCAAAACCACCGCCAAT
step3_c687	Gene_4	Other	0,02	Leucine-rich repeat-containing protein DDB0188916 OS=Dictyostelium discoideum	3,E-09	ACGGCAAAGACTTGACTGTTGA GTTTTACTTCCCGGTAGCA
step3_c664	Gene_5	Amino acid transport and metabolism	3,38	Phosphoadenosine phosphosulfate reductase OS=Emericella nidulans	6,E-65	TTTAGCCCATTTGGGATTTTG GCCAATCACCAACTGAACG
remain_c10423	Gene_6	Other	0,05	Extended-synaptotagmin-1 OS=Homo sapiens	1,E-12	ACGTAAGGGTCGCTTTTACCG CATCATAACATCATGACTAAAGGAA
step3_rep_c943	Gene_7	Transcription/translation	1,32	Eukaryotic translation initiation factor 3 135 kDa subunit OS=Schizosaccharomyces	1,E-40	AAGAGGCCATCGAGA ACTTG AACATTTTGCTGTTGCTGGA
remain_c6389	Gene_8	Lipid transport and metabolism	3,12	HMDH_PHYBL 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMG-CoA	e-114	ACCCAAAAACTCCTGGAACAA CAAA TGACCCGCAGCTAAAG
remain_c2692	Gene_9	Other	0,00	Uncharacterized glycosyltransferase H11696 OS=Haemophilus influenzae	6,E-06	ATAGACGATGGGGATGTTCC CAATTTGGATGATGGGTCCT
remain_c9455	Gene_10	Carbohydrate transport and metabolism	3,97	Alpha-amylase 1 OS=Lipomyces kononenkoae	9,E-26	GGAGTAGAACAGATTTACAGG TTGGAGTTGTTGAGAGTATGATG
remain_c5699	Gene_11	Other	5,36	Lysophosphatidylcholine acyltransferase OS=Mus musculus	4,E-38	CCATTAGCGTCATAACCATTGAG AGGAAAAATCTCCTTTACGAAGTATC
remain_c5098	Gene_12	Signal transduction mechanisms	0,46	Cutinase gene palindromic-binding protein [Pyrenopeziza tritici-repentis Pt-1C-BFP]	4,E-47	CGGCAGTGTACAGTTAACAC TCATGAAGTAGATTTTCCACAGAA
step3_rep_c608	Gene_13	Carbohydrate transport and metabolism	0,41	Regulation of carbohydrate metabolism-related protein [Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21]	2,E-21	GCATATTTGAAGACCCGGTATAA ATCAACCACCACAAATTTGTCA
remain_c3445	Gene_14	Other	0,39	Uncharacterized high-glucose-regulated protein	3,E-06	TCTGTGCCACGAAAATCTCC TCCAATTTCCACCCATGTA
step3_c486	Gene_15	Other	0,27	Uncharacterized high-glucose-regulated protein	2,E-08	CGCTCACGATTATTCATCCA GTGGAGTTGGAGGAGTCCGT
remain_c5312	Gene_16	Carbohydrate transport and metabolism	0,25	Permease of the major facilitator superfamily	8,E-08	TGCTGCTCTACTCCTAATGG TGATCATCTTTGTCTTCTTCTTC
remain_c7013	Gene_17	Growth	0,00	chitin synthase		GCTGTGCAAGGTCTTTGGAG CATCTTGCGCTTTTGGTTTT
remain_c5026	Gene_18	Carbohydrate transport and metabolism	27,43	High affinity nitrate transporter NrtB	9,E-33	CCACTAAGGCCAACTGGAATAG TTTTTCGTACACTATTGGACCAT
remain_c25428	Gene_19	Signal transduction mechanisms	19,95	Serine/threonine-protein kinase pk61c	3,E-08	GACCAGAAATTATAGAAGGCACAGA TGATAATCTTTCCGAGTTGGT
step3_c2425	Gene_20	Carbohydrate transport and metabolism	15,44	Glycogen [starch] synthase OS=Neurospora crassa	9,E-29	CCTTTGGCCTACAAGACTGC ACATCCATTTGACCCCTTGA
remain_c12627	Gene_21	Inorganic ion transport and metabolism	4,36	Ammonium transporter 1 OS=Schizosaccharomyces pombe	2,E-28	CATGGAGGTGCAATAGATGG TGCAGAAATACAAAAGGAATATGT
remain_c11853	Gene_22	Other	3,57	Ankyrin repeat protein nuc-2 OS=Neurospora crassa	3,E-10	TGTCCAATCGTTACGGCATA CGGTCATAGTGAGGCAGCTA

## ANNEXES

remain_c2226	Gene_23	Carbohydrate transport and metabolism	2,33	Galactose oxidase OS=Gibberella zeae	4,E-09	GAAGAGACCGGATGGTGCTA ATGATCCTGCCGAACAAAAC
remain_c13673	Gene_24	Growth	1,13	Extracellular protein SEL-1 and related proteins	6,E-08	TGTTCTGTTTCTTCTCCATCATTG GAAATGTTTTCAAGAGCGTCA
step3_c1607	Gene_25	Other	0,27	STE3, Pheromone A receptor..	2,E-06	GCTTGGTCCTTTTCTGTGTAA AGGGACGAAACCTTCCAAAA
step3_c3477	Gene_26	Carbohydrate transport and metabolism	0,25	Aquaporin	4,E-06	CGCTTAAATGGCTACGAACC CAAGTCAATGAGCCATGATCC
step3_c2660	Gene_27	Other	0,20	Protein FUN34 [Loedderomyces elongisporus NRRL YB-4239]	2,E-28	TGGAGTTATCGCTGCTTTTTG TCGGCCAAATTTTTAAAGTGA
step3_c1192	Gene_28	protein turnover, chaperones	0,20	Alkyl hydroperoxide reductase/ Thiolspecific antioxidant/ Maliallergen	2,E-27	AACGTGGATTACGTTTTTCGAT GTAACCTGGTTGGACCTGGTCTTC
remain_c1497	Gene_29	Carbohydrate transport and metabolism	0,00	GDP-D-mannose-3,5-epimerase [Malpighia glabra]	2,E-16	TGATTGCATTGAAACTTGAAGAA CAGCAAATATGGGAGGTGTC
step3_c1274	Gene_30	Growth	0,37	chitin synthase		ATACTTGCCATGCCTGCTTT TTTCTCTTATCCGCCACTAC
remain_c17373	Gene_31	Other	1,46	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 OS=Mus musculus	5,E-19	GCTGAATGGTTAACAGAAGCTG TGATGTCATATTTTTCAATCC
remain_c14551	Gene_32	Lipid transport and metabolism	77,06	Elongation of fatty acids protein 3 OS=Saccharomyces cerevisiae	2,E-12	TAACCCCAATAACCGAGAGC GTTTCGTATCTCCGCTCGTT
remain_c27546	Gene_33	Lipid transport and metabolism	26,39	Vacuolar endopolyphosphatase, putative [Neosartorya fischeri NRRL#1]	2,E-22	TTTGTGATTCTCCGGTTGGT GCCTAGAGTTATCACCAGTCCAT
remain_c8626	Gene_34	Lipid transport and metabolism	15,37	Acetyl-CoA acetyltransferase OS=Schizosaccharomyces pombe	e-142	ATGGGTATGGCAGCTGAAGA CCTGTTGTGCACGTTGATAAG
remain_c25442	Gene_35	Lipid transport and metabolism	3,66	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 5 OS=Homo sapiens	2,E-17	TGATTCTGAAGGGTGGCTTC ATTCGCCGCTTTTTGTGTC
step3_rep_c1221	Gene_36	Growth	3,17	chitin synthase		TTGGCTTTCCTTGTGTTTTC ACCTTTTTACCCAGAACGA
remain_c904	Gene_37	Lipid transport and metabolism	1,31	Polysaturated fatty acid elongation enzyme [Mortierella alpina]	2,E-34	TTTTCTTGGTCTCTTTGAGTTCAT CCTTCTTCTGATCTTACTTCAGGATT
step3_rep_c394	Gene_38	Lipid transport and metabolism	1,31	Enoyl reductase C646.07c OS=Schizosaccharomyces pombe	8,E-75	TAGAAATTTGTGCCAAGCA GTATGGTCCCTGGAATGCTG
remain_c825	Gene_39	Lipid transport and metabolism	1,64	Long-chain acyl-CoA synthetases (AMP-forming)	1,E-06	GGTTCTGCCCTTTAGATCC TTGCAACACCTTCAGTCTGC
step3_c1014	Gene_40	Lipid transport and metabolism	0,07	Lipase OS=Thermomyces lanuginosus	3,E-05	TCCGCTCGCATAATAAGAAAA AATGATCAGGAGGATCAGGAGA
remain_c12085	Gene_41	Other	13,60	Steroidogenic acute regulatory protein, mitochondrial OS=Bos taurus	4,E-05	GGCAGATCAGCAACGGAATA TTTCTCTCTGTGGTTTTGTC
remain_c6920	Gene_42	Signal transduction mechanisms	1,08	Oxysterol-binding protein-like protein 1 OS=Schizosaccharomyces pombe	2,E-15	ACTGGAAGTTGGAGAGGTCAA TTTACTTGCTTTGGAACAGCTTC
step3_c1211	Gene_43	Lipid transport and metabolism	0,58	Hormone-sensitive lipase OS=Spermophilus tridecemlineatus	7,E-12	GACGAATCGACATTGCAGTC CTGAACCACTTCCCGACTT
remain_c12136	Gene_44	Lipid transport and metabolism	0,52	Oxysterol-binding protein-related protein 3 OS=Homo sapiens	1,E-26	AGAAATGGCAGAAAGACTGGA TCCTGAAACTGCAAAATGCTGA
remain_c9083	Gene_45	Other	70,91	DASH complex subunit dad1 OS=Schizosaccharomyces pombe	5,E-09	GAATCTGGTGCTAAAATCCGTA GGTTTTAGCAGCTTCACATTGTT
step3_rep_c2948	Gene_46	Transcription/translation	1,29	Ras-like protein Ras1[Ustilago maydis]	2,E-37	TTAAAACCTTGCATTTTTCTTT AAAAACCAAGATGCATAATCCTAT
remain_c12512	Gene_47	Signal transduction mechanisms	0,60	MAP kinase kinase kinase wis4 OS=Schizosaccharomyces pombe GN=wis4 PE=2 SV=1	3,E-27	TGACAGCCATAAGATCTCCAGT GATGGCAACAAGGCAAAATTTATAG
remain_c3147	Gene_48	Other	0,50	Kinesin heavy chain OS=Syncephalastrum racemosum	2,E-23	ATATCGCGTGAGATGGCTTT AGGAGGAGGAGCATTAATTGG
step3_c1457	Gene_49	Growth	14,39	chitin synthase		TTAAATGAACTGCGCTGAA GGAAAGATTGGGAACGAACAA

step3_rep_c3002	Gene_50	Energy production and conversion	3,52	Chito oligosaccharide deacetylase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae	4,E-07	TTTAGGCACAGCCGTAAAGG GCATGCGTATTTGAATGGAG
remain_c3586	Gene_51	Growth	2,94	Chitin synthase 1 OS=Phycomyces blakesleeana	4,E-43	GGTGGTAATGGAGCTCAACC AGCGTTGATGTCTTGTCTTTCA
remain_c28302	Gene_52	Growth	2,23	Chitin synthase [Gigaspora margarita]	1E-35	GGTAAACCTGTTACGGGTCAT TGGAATTGATCTATCGGAACC
step3_c1457	Gene_53	Growth	1,46	Chitin synthase 1 OS=Cryptococcus neoformans var. grubii	e-138	GTTGGGAAGATTGGGAACGA TTAAATGAACTGCGCTGAA
step3_c2624	Gene_54	Growth	1,32	Chitin synthase export chaperone OS=Fusarium oxysporum	3,E-80	ATGGTTTCGTCGGATTCCA TCAAGAAAGAAAACGCAACGA
remain_c1562	Gene_55	Growth	1,07	CHS1_PHYBL Chitin synthase 1 (Chitin-UDP acetyl-glucosaminyl transferase 1)	2,E-38	TTGGATCCTTTCTAATGCTGCT CTGTTGCTACGTCGTTCTTCC
step3_rep_c2866	Gene_56	Growth	0,55	Chitin syntase 2 [Malassezia pachydermatis]	1E-13	TTTCAACCCACTCAATCACCT CGATGCAAGTGCGATTTT
step3_c1107	Gene_57	Growth	0,41	Chitin deacetylase OS=Mucor rouxii	5,E-19	ACATCCTGTACCGCAATGGT GAGCGACAGGAGGCAATC
default_c2512	Gene_58	Other	28,28	Endopolyphosphatase OS=Schizosaccharomyces pombe	5,E-07	CGAATACCCAAATGCGGATG CCCATAAGGCGCTATTAAGTTC
step3_c3531	Gene_59	Growth	2,81	chitin synthase		GCGAAACAGAAAAGTCGAG GATACGAGCACGTTCCCAAT
remain_c5050	Gene_60	Growth	1,69	chitin synthase		ACGCGGATTTTTCACATCAC CCGTACACACCTCCATTTCC
remain_c4281	Gene_61	Inorganic ion transport and metabolism	1,52	Nitrogen regulatory protein NUT1 OS=Magnaporthe grisea	5,E-07	AACACCTTATGGCGAAAAGA GCATAGCGATAGGACGGTCT
remain_c4899	Gene_62	Inorganic ion transport and metabolism	0,85	nitrite reductase (NAD(P)H) large subunit [Planctomyces maris DSM 8797]	3,E-23	CCAATTTACAAGACACGAATGA TGATTTCACTCCAGGACTCTA
remain_c4779	Gene_63	Inorganic ion transport and metabolism	0,55	Inorganic phosphate transporter PHO84 OS=Saccharomyces cerevisiae	3,E-52	TACTTGGTTGGGAGCCGTA GACGCTTTCATTAGATTTCTTTCA
step3_c2831	Gene_64	Inorganic ion transport and metabolism	0,31	Inorganic phosphate transporter PHO84 OS=Saccharomyces cerevisiae	8,E-34	TGCAACAGTGGCTTCAGCA CACCAATACCGATACCCATGAT
remain_c1795	Gene_65	Other	0,61	Glucose-repressible protein and related proteins [General function prediction only].	1E-06	ATTGATCAGCTTGGTGCATT CAGTCCGGGTGTTGTTCTAA
remain_c2198	Gene_68	Transcription/translation	16,97	DNA binding/transcription factor [Arabidopsis thaliana]	3,E-08	CCAAAACAGGTCAACCTCAAA TCAGTTTAACAAAAATGTTACAGACA
remain_c6073	Gene_69	Other	7,67	E1_DerP2_DerF2_ML domain. ML domain - M D-2-related lipid recognition domain.	pfam02221	CCAGTTGTACAGGCCAAA TTCGTCCTTAAAAATGCGGTA
step3_c1270	Gene_70	Lipid transport and metabolism	0,22	Lipase [Rhizopus microsporus var. chinensis]	5,E-24	CTTATGAACATCCTAGCGGTGA TTGGATCTTCTGGACCTTG
remain_c3360	Gene_71	Lipid transport and metabolism	1,65	Putative elongation of fatty acids protein 1 OS=Schizosaccharomyces	8,E-14	CATCGGTTGGGATTATTCT AAACACCCACGACAAACTGC
remain_c4549	Gene_72	Growth	1,00	CHS1_PHYBL Chitin synthase 1	e-112	ACGTAGTATGCATAGTGTCCGATG CACCATCTGTAAACGCCAATAG
step3_rep_c759	Gene_73	Growth	0,52	Chitin deacetylase [Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21]	1E-49	TTAATGCCAGTTACCAGGAA TAGGAGCTTTCGGAACCTGTG
step3_c3245	Gene_74	Growth	0,49	Chitin deacetylase [Rhizopus stolonifer]	1E-08	CCTGCTACTACCGGTCATATTTT CCAGCTTTTGTACGATTGG
remain_c5937	Gene_75	Growth	0,44	Chitin synthase/hyaluronan synthase (glycosyltransferases)	7,E-06	GCCTAACAAACAAAATACGC GCATACCATTGAATTCGTCAT
step3_c1699	Gene_76	Secondary metabolites biosynthesis,	1,95	Iron/ascorbate family oxidoreductases.	4,E-67	GAGGAGTCTTTTTGGGTTATGAG TTCACCGCAGCTAACACCTA
step3_c860	Gene_77	Signal transduction mechanisms	1,31	7tm_7, 7tm Chemosensory receptor.	4,E-05	TCCTCCAAATGAACTCCCTTCT AACCATGAAAATGCTGCGTA
remain_c2490	Gene_78	Posttranslational modification,	0,57	Heat shock 70 kDa protein 12A OS=Mus musculus	1E-23	CCTGGCCAAGTATGGTTTTGT TGCTTTAGATTTCTGGGACGA

## ANNEXES

remain_c3520	Gene_79	Other	0,49	Uncharacterized high-glucose-regulated protein [General function prediction only].	9,E-32	ACCAACAAGTCCAGGTGTGG CCACTTCCACCGTTCAAATTA
step3_c3430	Gene_80	Posttranslational modification,	0,21	Heat shock 70 kDa protein 12A OS=Mus musculus	9,E-09	AAATCATTTTGTTCGGTTGC TTTTATTGGGATGACGCTCAC
remain_c2942	Gene_81	Posttranslational modification,	0,14	Heat shock 70 kDa protein 12A OS=Mus musculus	1E-09	AAATATCTCAACTCTGAGTCAACCTG CATCAAGCTTTTTGACTGTTGTA
step3_c3021	Gene_82	Posttranslational modification,	0,09	Heat shock 70 kDa protein 12A OS=Mus musculus	2,E-06	AAGCACTTATGAGCCCGATG GACATAATTAATGAACGATTTGTCA
step3_c509	Gene_83	Posttranslational modification,	0,11	Heat shock 70 kDa protein 12A OS=Mus musculus	2,E-13	CCAAGAATATTTACGCCAGGA TGAATCACAATAATCTGCATCC
remain_c3702	Gene_85	Transcription/translation	0,02	Putative transferase caf 17, mitochondrial OS=Aspergillus niger	5,E-20	CATTATGCGACGAGAAACCA AATTGTAAGTAGATGTTCAACCAAGC
remain_c4572	Gene_86	Posttranslational modification,	0,02	Putative chaperone protein [Lyngbya sp. PCC 8106]	3,E-23	CAGGTTTCATCAGAACTTTGC CACTGTTGATCATCTTCATCCTC
step3_c1352	Gene_87	Posttranslational modification,	0,01	Heat shock 70 kDa protein 12B OS=Homo sapiens	6,E-11	ACATTCCCACCTCCAAAT GAAAATTTCAATTAAGATTGCCAGA
remain_c13348	Gene_88	Other	0,00	Sacsin OS=Homo sapiens GN=SACS	8,E-32	TTTGAAAGGATTGGCAAGGAC TCTTCTGTTTTCCGCCAAC
remain_c14530	Gene_89	Other	0,00	Hypothetical protein DDBDRAFT_0184339 [Dictyostelium discoideum AX4]	2,E-11	CTCCAGGAATGAGCGATACG AATGACGGCAGTTAATGATCC
remain_c19940	Gene_90	Secondary metabolites biosynthesis,	10426,85	Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies	2,E-10	CTTCCTGGACATAATCTTAATCCTT TAATCCTGATGGATGGATGGA
remain_c15064	Gene_91	Lipid transport and metabolism	4,24	Acyl-CoA oxidase [Lipid transport and metabolism].	1E-10	CGTGGATTAGAAACAACGCAA CCCATTCCAATCCATATTTTTG
step3_c2923	Gene_92	Lipid transport and metabolism	0,01	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 OS=Bos taurus	3,E-13	TCCTTCAAATTTGGCTCAAGA CAATTTTGATCTATTAATTCCTTTCAA
remain_c1512	Gene_93	Other	42,82	Arylester hydrolase [Agrobacterium tumefaciens str. C58]	7,E-11	TGGATCCACAATGGTTTG GTTATCGGGTTTATCGCTCCT
remain_c1512	Gene_94	Lipid transport and metabolism	1,76	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial OS=Mus musculus	2,E-74	TCCATCACAAGCACTTCCAG GCACGAGCTACGACTGAA
remain_c825	Gene_95	Lipid transport and metabolism	1,81	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1 [Pyrenophora tritici-repentis Pt-1C-BFP]	1E-34	TTTGGGACCAGAACTGTGG ACCTTCGGAGCCAATTGAA
remain_c25442	Gene_96	Lipid transport and metabolism	3,66	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 5 OS=Homo sapiens	2,E-19	TGAGGAGAAAGGTTACTGTTGA GCTGTTTGTCTGGACGTTT
step3_c2354	No c4	Other		Nucleolar complex protein 4 homolog OS=Gallus gallus	3,E-31	CATTGCTTTTTCATGGGATCTG GAGCATGTTAACAATTTGGGAAG
step3_c1641	Tubulin	Growth		Tubulin, alpha, ubiquitous [Batrachomyxium dendrobatidis JAM 8]	e-114	TGCCACCATCAAGACAAA AAGATCACCAACAGGGACAA
step3_rep_c11	ATP synthase	Energy production and conversion		ATP synthase subunit beta [Coprinopsis cinerea okayama]	e-100	TGGGTGGTATGCAGGAAAGAA TGGATCAGTCAAATCGTCAGCC

### 5.3. Données des analyses métabolomiques

Tableau des métabolites criblés comme étant au moins dix fois plus concentrés dans les racines mycorhizées (M) par rapport aux racines non mycorhizées (NM). Lorsqu'un ion n'est pas détecté une valeur par défaut lui est attribuée, elle est égale à 0,1 pour les acquisitions effectuées sur le Q-TOF Premier et de 5 pour le Q-TOF Maxis. Les formules brutes générées par SmartFormula3D sont en gras si une seule composition atomique est proposée ou si le score de la première proposition est 10 fois supérieur à celle du second rang, dans le cas contraire la formule est en italique.

métabolite	R <sub>t</sub> (min)	ion détecté (H <sup>+</sup> ) (m/z)	Q-TOF Premier (Waters)				Q-TOF Maxis (Bruker)				Formule brute	fraction (HPLC)				
			full scan		Pseudo-SIM		full scan									
			S/N (rms)	aire M	aire NM	ratio (M/NM)	S/N (rms)	aire M	aire NM	ratio (M/NM)			aire M	aire NM	ratio (M/NM)	
1	0,67	426,0928	380	7,6	0,1	76	3403	36	1,0	36				1		
2	0,83	397,1241	41	1,6	0,1	16					196,0	5,0	39		2	
3	0,85	265,0835	132	6,5	0,1	65	1121	31	2,5	12					2	
4	0,99	752,2221 388,1361	144 280	4,8 13,2	0,1 0,1	48 132	541	7	0,1	70					1	
5	1,05	218,1385	1636	84,5	0,1	845					3133,3	5,0	627	<b>C10H20NO4</b>	1	
6	1,59	345,1445 182,0811	291 655	20,6 23,4	0,1 0,1	206 234					703,6 182,1	5,0 4,5	141 40	<b>C18H21N2O5</b> <b>C9H12NO3</b>	2	
7	1,90	232,1543	372	17,5	0,1	175	261	64	0,1	640				<b>C11H22NO4</b>	1	
8	3,17	984,3148	282	4,6	0,1	46	2562	26	0,1	260					2	
9	3,25	1275,45695 638,2324 849,3021 843,33075 422,1693 (H2+) 805,3850 736,3286 447,1124 441,1518 425,1769 403,1960 241,1434 223,1327 221,0751 205,1240 195,1379 159,1173	214	3,6	0,1	36	1692	28	0,5	61		318,9	5,0	64		2
											472,6 1090,8 430,5	5,0 5,0 5,0	95 218 86			
			139	8,1	0,1	81	881	47	1,8	27		921,5	16,8	55		
			498	29,5	0,1	295	5423	149	4,0	37		2739,8	71,5	38	<b>C19H31O9</b>	
			450	16,4	0,2	85					9406,5	278,1	34	<b>C13H21O4</b>		
			781	21,5	1,1	20					1726,3	5,0	345	<b>C13H19O3</b>		
			241,1434	1774	65,2	2,1	31				590,1	5,0	118			
			223,1327	1693	52,9	1,2	45									
			221,0751													
			205,1240	89	11,8	0,1	118									
			195,1379	1251	48,8	2,4	20				1013,5	5,0	203	<b>C12H19O2</b>		
			159,1173	98	13,8	0,1	138									
10	3,42	555,22075 278,1143(H2+)									633,8	5,0	127		2	
11	3,44	2259,09135 1130,0496 (H2+) 753,6917 (H3+)									589,6	5,0	118		2	





## ANNEXES

63	7,80	741,2964 723,2863 459,2278 211,1704	243 9,3 0,5 19 193 6,1 0,4 15 169 16,0 0,5 31 203 16,0 1,1 15	1268 36 0,1 360 1096 24 1,0 240	1239,3 153,2 8	C35H42N8NaO9	5
64	8,13	283,0963	455 37,9 0,1 379	2577 126 0,1 1260	372,1 5,0 74	C17H15O4	5
65	8,20	725,26895 363,1384 687,3219 525,2691 507,2595 489,2525 463,2713 445,2591 419,2276 277,2156 259,2075	832 48,4 0,4 133 225 9,2 0,1 152 148 8,8 0,1 88 157 4,8 0,1 48 335 10,0 0,1 100 1122 78,1 0,1 781 155 8,9 0,1 89	474 8 0,1 80	221,7 5,0 44 707,7 5,4 132 1887,7 5,0 378  224,8 5,0 45	C27H41O10  C20H35O9 C18H29O2	5
66	8,60	644,3271 621,2300 605,2567 583,2745 335,2216 311,1141 275,2026 257,1908	196 6,4 0,1 49 597 8,4 0,1 84 780 20,1 0,4 57 944 26,9 0,7 41 26 6,2 0,1 75 2236 ##### 1,9 73 532 24,8 0,6 39	2703 44 0,1 440 7756 133 7,0 19	283,9 18,7 15 211,9 9,1 23 580,8 16,2 36 5675,6 205,7 28 1340,6 59,7 22 350,3 18,7 19 572,1 5,0 114	C29H43O12 C20H31O4  C18H27O2	5
67	9,18	586,3225 570,3307 563,2271 282,1116 (H <sup>2+</sup> ) 547,2514 525,2692 507,2595 489,2484 463,2705 445,2602 282,1116 277,2161 259,2067	261 8,5 0,1 81 211 14,7 0,1 100 599 32,1 0,8 38 829 58,3 1,6 36 394 18,2 0,3 73 283 21,4 0,4 50 315 11,9 0,1 123 738 26,5 0,6 42 2337 ##### 8,4 20 450 26,7 0,1 267	2114 49 1,2 41 2617 133 4,5 30  741 29 1,0 31 288 17 0,8 22  154 76 1,0 76	473,4 21,6 22  523,1 20,8 25 763,7 40,4 19 9077,2 294,1 31  523,1 20,8 25 1962,1 53,6 37	C27H41O10   C18H29O2	6
68	9,24	837,3591	168 4,0 0,1 40	694 30 1,0 30			6
69	9,49	863,3696	290 10,0 0,1 100	1400 69 0,1 1380	437,8 5,0 88		7
70	9,95	275,2010	105 11,4 0,5 23	325 30			9
71	10,34	587,2871	103 4,1 0,1 41	860 35 0,1 350			9

## 5.4. Références bibliographiques

- Afendi FM, Okada T, Yamazaki M, Hirai-Morita A, Nakamura Y, Nakamura K, Ikeda S, Takahashi H, Altaf-Ul-Amin M, Darusman LK, *et al* (2012) KNApSAcK family databases: integrated metabolite-plant species databases for multifaceted plant research. *Plant Cell Physiology* 53: e1
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435: 824–827
- Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM (2007) How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? *New Phytologist* 173: 808–816
- Azcon-Aguilar, Barea JM (1997) Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6: 457–464
- Baggett BR, Cooper JD, Hogan ET, Carper J, Paiva NL, Smith JT (2002) Profiling isoflavonoids found in legume root extracts using capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 23: 1642–1651
- Bago B, Pfeffer PE, Abubaker J, Jun J, Allen JW, Brouillette J, Douds DD, Lammers PJ, Shachar-Hill Y (2003) Carbon Export from Arbuscular Mycorrhizal Roots Involves the Translocation of Carbohydrate as well as Lipid. *Plant Physiology* 131: 1496–1507
- Bago B, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y (2000) Carbon Metabolism and Transport in Arbuscular Mycorrhizas. *Plant Physiology* 124: 949–958
- Bago B, Zipfel W, Williams RM, Jun J, Arreola R, Lammers PJ, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y (2002) Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* 128: 108–124
- Baier MC, Keck M, Gödde V, Niehaus K, Küster H, Hohnjec N (2010) Knockdown of the symbiotic sucrose synthase MtSucS1 affects arbuscule maturation and maintenance in mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 152: 1000–1014
- Bais HP, Park S-W, Weir TL, Callaway RM, Vivanco JM (2004) How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Science* 9: 26–32
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review Plant Biology* 57: 233–266
- Balzergue C, Puech-Pagès V, Bécard G, Rochange SF (2011) The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events. *Journal Experimental Botany* 62: 1049–1060
- Baran R, Kochi H, Saito N, Suematsu M, Soga T, Nishioka T, Robert M, Tomita M (2006) MathDAMP: a package for differential analysis of metabolite profiles. *BMC Bioinformatics* 7: 530
- Baranov V (2004) Ion energy in quadrupole mass spectrometry. *Journal American Society Mass Spectrometry* 15: 48–54

- Baranov VI (2003) Analytical approach for description of ion motion in quadrupole mass spectrometer. *Journal America Society Mass Spectrometry* 14: 818–824
- Barker SJ, Stummer B, Gao L, Dispain I, O'Connor PJ, Smith SE (1998) A mutant in *Lycopersicon esculentum* with highly reduced VA mycorrhizal colonization: isolation and preliminary characterisation. *The Plant Journal* 15: 791–797
- Bécard G, Fortin JA (1988) Early events of vesicular–arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist* 108: 211–218
- Bécard, G., Roux, C., Séjalon-Delmas, N., Puech, V., Roy, S. (2004). Modulators of the development of mycorrhizal fungi with arbuscules and uses thereof. WO Patent 2005/077177.
- Beilby JP, Kidby DK (1980) Biochemistry of ungerminated and germinated spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus caledonius*: changes in neutral and polar lipids. *Journal Lipid Research* 21: 739–750
- Bell CJ, Dixon RA, Farmer AD, Flores R, Inman J, Gonzales RA, Harrison MJ, Paiva NL, Scott AD, Weller JW, *et al* (2001) The *Medicago* Genome Initiative: a model legume database. *Nucleic Acids Research* 29: 114–117
- Besserer A, Bécard G, Jauneau A, Roux C, Séjalon-Delmas N (2008) GR24, a synthetic analog of strigolactones, stimulates the mitosis and growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* by boosting its energy metabolism. *Plant Physiology* 148: 402–413
- Besserer A, Bécard G, Roux C, Séjalon-Delmas N (2009) Role of mitochondria in the response of arbuscular mycorrhizal fungi to strigolactones. *Plant Signaling and Behavior* 4: 75–77
- Besserer A, Puech-Pagès V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, Roy S, Portais J-C, Roux C, Bécard G, Séjalon-Delmas N (2006) Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology* 4: e226
- Bestel-Corre G, Dumas-Gaudot E, Poinot V, Dieu M, Dierick J-F, van TD, Remacle J, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (2002) Proteome analysis and identification of symbiosis-related proteins from *Medicago truncatula Gaertn.* by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis* 23: 122–137
- Bonanomi A, Oetiker JH, Guggenheim R, Boller T, Wiemken A, Vögeli-Lange R, Bonanomi A, Oetiker JH, Guggenheim R, Boller T, *et al* (2001) Arbuscular mycorrhiza in mini-mycorrhizotrons: first contact of *Medicago truncatula* roots with *Glomus intraradices* induces chalcone synthase, *New Phytologist*, *New Phytologist* 150, 150: 573, 573–582, 582
- Bonfante P, Genre A (2010) Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communication* 1: 48
- Bonfante P, Perotto S (1995) Tansley Review No. 82. *New Phytologist* 130: 3–21
- Bouwmeester HJ, Roux C, Lopez-Raez JA, Bécard G (2007) Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends in Plant Science* 12: 224–230
- Branscheid A, Devers EA, May P, Krajinski F (2011) Distribution pattern of small RNA and degradome reads provides information on miRNA gene structure and regulation. *Plant Signaling and Behavior* 6:

- Branscheid A, Sieh D, Pant BD, May P, Devers EA, Elkrog A, Schauser L, Scheible W-R, Krajinski F (2010) Expression pattern suggests a role of MiR399 in the regulation of the cellular response to local Pi increase during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Molecular Plant Microbe Interactions* 23: 915–926
- Brechenmacher L, Weidmann S, van Tuinen D, Chatagnier O, Gianinazzi S, Franken P, Gianinazzi-Pearson V (2004) Expression profiling of up-regulated plant and fungal genes in early and late stages of *Medicago truncatula*-*Glomus mosseae* interactions. *Mycorrhiza* 14: 253–262
- Breuillin F, Schramm J, Hajirezaei M, Ahkami A, Favre P, Druège U, Hause B, Bucher M, Kretschmar T, Bossolini E, *et al* (2010) Phosphate systemically inhibits development of arbuscular mycorrhiza in *Petunia hybrida* and represses genes involved in mycorrhizal functioning. *Plant Journal* 64: 1002–1017
- Bucher M, Wegmüller S, Drissner D (2009) Chasing the structures of small molecules in arbuscular mycorrhizal signaling. *Current Opinion Plant Biology* 12: 500–507
- Buée M, Rossignol M, Jauneau A, Ranjeva R, Bécard G (2000) The Pre-Symbiotic Growth of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Is Induced by a Branching Factor Partially Purified from Plant Root Exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 693–698
- Cannon SB, Crow JA, Heuer ML, Wang X, Cannon EKS, Dwan C, Lamblin A-F, Vasdewani J, Mudge J, Cook A, *et al* (2005) Databases and information integration for the *Medicago truncatula* genome and transcriptome. *Plant Physiology* 138: 38–46
- Cappellazzo G, Lanfranco L, Fitz M, Wipf D, Bonfante P (2008) Characterization of an amino acid permease from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiology* 147: 429–437
- Catford J-G, Staehelin C, Lerat S, Piché Y, Vierheilig H (2003) Suppression of arbuscular mycorrhizal colonization and nodulation in split-root systems of alfalfa after pre-inoculation and treatment with Nod factors. *Journal Experimental Botany* 54: 1481–1487
- Catoira R, Galera C, de Billy F, Penmetsa RV, Journet E-P, Maillet F, Rosenberg C, Cook D, Gough C, Dénarié J (2000) Four Genes of *Medicago truncatula* Controlling Components of a Nod Factor Transduction Pathway. *Plant Cell* 12: 1647–1666
- Chabaud M, Venard C, Defaux-Petras A, Bécard G, Barker DG (2002) Targeted inoculation of *Medicago truncatula in vitro* root cultures reveals MtENOD11 expression during early stages of infection by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 156: 265–273
- Chabot S, Bécard G, Piché Y (1992) Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. *Mycologia* 84: 315–321
- Chan ECY, Yap S-L, Lau A-J, Leow P-C, Toh D-F, Koh H-L (2007) Ultra-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry based metabolomics of raw and steamed *Panax notoginseng*. *Rapid Communication Mass Spectrometry* 21: 519–528
- Cloarec O, Dumas M-E, Craig A, Barton RH, Trygg J, Hudson J, Blancher C, Gauguier D, Lindon JC, Holmes E, *et al* (2005) Statistical Total Correlation Spectroscopy: An Exploratory Approach for Latent Biomarker Identification from Metabolic 1H NMR Data Sets. *Analytical Chemistry* 77: 1282–1289

## ANNEXES

- Codignola A, Verotta L, Spanu P, Maffei M, Scannerini S, Bonfante-Fasolo P (1989) Cell wall bound-phenols in roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *New Phytologist* 112: 221–228
- Coleman J, Green PJ, Inouye M (1984) The use of RNAs complementary to specific mRNAs to regulate the expression of individual bacterial genes. *Cell* 37: 429–436
- Crotti S, Seraglia R, Traldi P (2011) Some thoughts on electrospray ionization mechanisms. *European Journal Mass Spectrometry (Chichester, Eng)* 17: 85–99
- Czaja LF, Hogeckamp C, Lamm P, Mailliet F, Andres Martinez E, Samain E, Dénarié J, Küster H, Hohnjec N (2012) Transcriptional responses towards diffusible signals from symbiotic microbes reveal MtNFP- and MtDMI3-dependent reprogramming of host gene expression by AM fungal LCOs. *Plant physiology*. doi: 10.1104/pp.112.195990
- Dakora FD, Joseph CM, Phillips DA (1993) Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Root Exudates Contain Isoflavonoids in the Presence of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiology* 101: 819–824
- Dan M, Su M, Gao X, Zhao T, Zhao A, Xie G, Qiu Y, Zhou M, Liu Z, Jia W (2008) Metabolite profiling of *Panax notoginseng* using UPLC-ESI-MS. *Phytochemistry* 69: 2237–2244
- Dinda B, Debnath S, Mohanta BC, Harigaya Y (2010) Naturally occurring triterpenoid saponins. *Chemistry and Biodiversity* 7: 2327–2580
- Ding L, Kumashiro S (2006) Ion motion in the rectangular wave quadrupole field and digital operation mode of a quadrupole ion trap mass spectrometer. *Rapid Communication Mass Spectrometry* 20: 3–8
- Dixon RA (2001a) Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411: 843–847
- Dixon RA (2001b) Phytochemistry in the genomics and post-genomics eras. *Phytochemistry* 57: 145–148
- Drissner D, Kunze G, Callewaert N, Gehrig P, Tamasloukht M, Boller T, Felix G, Amrhein N, Bucher M (2007) Lyso-phosphatidylcholine is a signal in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Science* 318: 265–268
- Dumas-Gaudot E, Valot B, Bestel-Corre G, Recorbet G, St-Arnaud M, Fontaine B, Dieu M, Raes M, Saravanan RS, Gianinazzi S (2004) Proteomics as a way to identify extra-radicular fungal proteins from *Glomus intraradices* RiT-DNA carrot root mycorrhizas. *FEMS Microbiology Ecology* 48: 401–411
- Dunn WB (2008) Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes. *Physical Biology* 5: 011001
- Dunn WB, Bailey NJC, Johnson HE (2005) Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst* 130: 606–625
- Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, Brown M, Knowles JD, Halsall A, Haselden JN, *et al* (2011) Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature Protocols* 6: 1060–1083

- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494–498
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001b) RNA interference is mediated by 21 and 22-nucleotide RNAs. *Genes and Development* 15: 188–200
- Elgersma Y, van Roermund CW, Wanders RJ, Tabak HF (1995) Peroxisomal and mitochondrial carnitine acetyltransferases of *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by a single gene. *EMBO Journal* 14: 3472–3479
- Endo A, Kuroda M, Tsujita Y (1976) ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinium*. *Journal Antibiotics* 29: 1346–1348
- Endo A, Tsujita Y, Kuroda M, Tanzawa K (1977) Inhibition of cholesterol synthesis *in vitro* and *in vivo* by ML-236A and ML-236B, competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *European Journal Biochemistry* 77: 31–36
- Evelin H, Kapoor R, Giri B (2009) Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Annual Botany* 104: 1263–1280
- Fernie AR, Trethewey RN, Krotzky AJ, Willmitzer L (2004) Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5: 763–769
- Fester T, Hause B, Schmidt D, Halfmann K, Schmidt J, Wray V, Hause G, Strack D (2002) Occurrence and localization of apocarotenoids in arbuscular mycorrhizal plant roots. *Plant Cell Physiology* 43: 256–265
- Finlay RD (2008) Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany* 59: 1115–1126
- Floss DS, Hause B, Lange PR, Küster H, Strack D, Walter MH (2008) Knock-down of the MEP pathway isogene 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase 2 inhibits formation of arbuscular mycorrhiza-induced apocarotenoids, and abolishes normal expression of mycorrhiza-specific plant marker genes. *Plant Journal* 56: 86–100
- Floß DS, Hause B, Lange PR, Küster H, Strack D, Walter MH, Floß DS, Hause B, Lange PR, Küster H, *et al* (2008) Knock-down of the MEP pathway isogene 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase 2 inhibits formation of arbuscular mycorrhiza-induced apocarotenoids, and abolishes normal expression of mycorrhiza-specific plant marker genes. *The Plant Journal* 56, 56: 86, 86–100, 100
- Fritz I (1955) The effect of muscle extracts on the oxidation of palmitic acid by liver slices and homogenates. *Acta Physiologica Scandinavica* 34: 367–385.
- Genre A, Chabaud M, Faccio A, Barker DG, Bonfante P (2008) Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *Plant Cell* 20: 1407–1420
- Genre A, Chabaud M, Timmers T, Bonfante P, Barker DG (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell* 17: 3489–3499

- Giovannetti M, Mosse B (1980) An evolution of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84: 489–500
- Gomez SK, Javot H, Deewatthanawong P, Torres-Jerez I, Tang Y, Blancaflor EB, Udvardi MK, Harrison MJ (2009) *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC Plant Biology* 9: 10
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pages V, Dun EA, Pillot J-P, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais J-C, *et al* (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455: 189–194
- Govindarajulu M, Pfeffer PE, Jin H, Abubaker J, Douds DD, Allen JW, Bücking H, Lammers PJ, Shachar-Hill Y (2005) Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* 435: 819–823
- Grunwald U, Nyamsuren O, Tamasloukht M, Lapopin L, Becker A, Mann P, Gianinazzi-Pearson V, Krajinski F, Franken P (2004) Identification of mycorrhiza-regulated genes with arbuscule development-related expression profile. *Plant Molecular Biology* 55: 553–566
- Gu M, Xu K, Chen A, Zhu Y, Tang G, Xu G (2010) Expression analysis suggests potential roles of microRNAs for phosphate and arbuscular mycorrhizal signaling in *Solanum lycopersicum*. *Physiologia Plantarum* 138: 226–237
- Guether M, Balestrini R, Hannah M, He J, Udvardi MK, Bonfante P (2009) Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. *New Phytologist* 182: 200–212
- Güimil S, Chang H-S, Zhu T, Sesma A, Osbourn A, Roux C, Ioannidis V, Oakeley EJ, Docquier M, Descombes P, *et al* (2005) Comparative transcriptomics of rice reveals an ancient pattern of response to microbial colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 8066–8070
- Gutjahr C, Novero M, Guether M, Montanari O, Udvardi M, Bonfante P (2009) Presymbiotic factors released by the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* induce starch accumulation in *Lotus japonicus* roots. *New Phytologist* 183: 53–61
- Gutjahr C, Paszkowski U (2009) Weights in the Balance: Jasmonic Acid and Salicylic Acid Signaling in Root-Biotroph Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 763–772
- Hahlbrock K, Bednarek P, Ciolkowski I, Hamberger B, Heise A, Liedgens H, Logemann E, Nürnberger T, Schmelzer E, Somssich IE, *et al* (2003) Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant/pathogen interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100 Suppl 2: 14569–14576
- Harrison MJ (2005a) Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology* 59: 19–42
- Harrison MJ (2005b) Signaling in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Annual Review of Microbiology* 59: 19–42
- Harrison MJ (1999) Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 361–389

- Harrison MJ (1993) Isoflavonoid Accumulation and Expression of Defense Gene Transcripts During the Establishment of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Associations in Roots of *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6: 643
- Harrison MJ, van Buuren ML (1995) A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378: 626–629
- Harrison MJ, Dixon RA (1994) Spatial patterns of expression of flavonoid/isoflavonoid pathway genes during interactions between roots of *Medicago truncatula* and the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *The Plant Journal* 6: 9–20
- Hartmann T, Kutchan TM, Strack D (2005) Evolution of metabolic diversity. *Phytochemistry* 66: 1198–1199
- Hause B, Maier W, Miersch O, Kramell R, Strack D (2002) Induction of Jasmonate Biosynthesis in Arbuscular Mycorrhizal Barley Roots. *Plant Physiology* 130: 1213–1220
- Hause B, Mrosk C, Isayenkov S, Strack D (2007) Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochemistry* 68: 101–110
- Heinig K, Henion J (1999) Determination of carnitine and acylcarnitines in biological samples by capillary electrophoresis–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 735: 171–188
- Heinonen M, Rantanen A, Mielikäinen T, Kokkonen J, Kiuru J, Ketola RA, Rousu J (2008) FiD: a software for ab initio structural identification of product ions from tandem mass spectrometric data. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22: 3043–3052
- Helber N, Wippel K, Sauer N, Schaarschmidt S, Hause B, Requena N (2011) A Versatile Monosaccharide Transporter That Operates in the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus sp* Is Crucial for the Symbiotic Relationship with Plants. *The Plant Cell Online*. doi: 10.1105/tpc.111.089813
- Hijikata N, Murase M, Tani C, Ohtomo R, Osaki M, Ezawa T (2010) Polyphosphate has a central role in the rapid and massive accumulation of phosphorus in extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* 186: 285–289
- Hilario M, Kalousis A, Pellegrini C, Müller M (2006) Processing and classification of protein mass spectra. *Mass Spectrometry Review* 25: 409–449
- Hildebrandt U, Janetta K, Bothe H (2002) Towards growth of arbuscular mycorrhizal fungi independent of a plant host. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1919–1924
- Hildebrandt U, Ouziad F, Marner F-J, Bothe H (2006) The bacterium *Paenibacillus validus* stimulates growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* up to the formation of fertile spores. *FEMS Microbiology Letters* 254: 258–267
- Hildebrandt U, Regvar M, Bothe H (2007) Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 68: 139–146
- Hohnjec N, Vieweg MF, Pühler A, Becker A, Küster H (2005) Overlaps in the transcriptional profiles of *Medicago truncatula* roots inoculated with two different *Glomus* fungi provide insights into

- the genetic program activated during arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology* 137: 1283–1301
- Hsu P-J, Miller JS, Berger JM (2009) Bakuchiol, an antibacterial component of *Psoraleidium tenuiflorum*. *Natural Product Research* 23: 781–788
- Ipsen A, Want EJ, Lindon JC, Ebbels TMD (2010) A Statistically Rigorous Test for the Identification of Parent–Fragment Pairs in LC-MS Datasets. *Analytical Chemistry* 82: 1766–1778
- Isayenkov S, Mrosk C, Stenzel I, Strack D, Hause B (2005) Suppression of allene oxide cyclase in hairy roots of *Medicago truncatula* reduces jasmonate levels and the degree of mycorrhization with *Glomus intraradices*. *Plant Physiology* 139: 1401–1410
- Jacobi LM, Zubkova LA, Barmicheva EM, Tsyganov VE, Borisov AY, Tikhonovich IA (2003) Effect of mutations in the pea genes Sym33 and Sym40. II. Dynamics of arbuscule development and turnover. *Mycorrhiza* 13: 9–16
- Javot H, Penmetsa RV, Terzaghi N, Cook DR, Harrison MJ (2007) A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 1720–1725
- Jorgenson JW (2010) Capillary liquid chromatography at ultrahigh pressures. *Annual Review of Analytical Chemistry* 3:129-50
- Jun JH, Fiume E, Fletcher JC (2008) The CLE family of plant polypeptide signaling molecules. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65: 743–755
- Kape R, Wex K, Parniske M, Görge E, Wetzell A, Werner D (1993) Legume root metabolites and VA-mycorrhiza development. *Journal of Plant Physiology* 141: 54–60
- Katajamaa M, Miettinen J, Oresic M (2006) MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. *Bioinformatics* 22: 634–636
- Katsir L, Davies KA, Bergmann DC, Laux T (2011) Peptide signaling in plant development. *Current Biology* 21: R356–364
- Katsura H, Tsukiyama R-I, Suzuki A, Kobayashi M (2001) In Vitro Antimicrobial Activities of Bakuchiol against Oral Microorganisms. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 45: 3009–3013
- Kawachi H, Atomi H, Ueda M, Hashimoto N, Kobayashi K, Yoshida T, Kamasawa N, Osumi M, Tanaka A (1996) Individual expression of *Candida tropicalis* peroxisomal and mitochondrial carnitine acetyltransferase-encoding genes and subcellular localization of the products in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biochemistry* 120: 731–735
- Kell DB, Oliver SG (2004) Here is the evidence, now what is the hypothesis? The complementary roles of inductive and hypothesis-driven science in the post-genomic era. *BioEssays* 26: 99–105
- Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah JA, Franken O, Verbruggen E, Fellbaum CR, Kowalchuk GA, Hart MM, Bago A, *et al* (2011) Reciprocal Rewards Stabilize Cooperation in the Mycorrhizal Symbiosis. *Science* 333: 880–882
- Kind T, Fiehn O (2006) Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm. *BMC Bioinformatics* 7: 234

- Kind T, Fiehn O (2007) Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC Bioinformatics* 8: 105
- King R, Bonfiglio R, Fernandez-Metzler C, Miller-Stein C, Olah T (2000) Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *Journal of America Society Mass Spectrometry* 11: 942–950
- Kistner C, Parniske M (2002) Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *Trends Plant Science* 7: 511–518
- Kosuta S, Hazledine S, Sun J, Miwa H, Morris RJ, Downie JA, Oldroyd GED (2008) Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 9823–9828
- Kuhn H, Küster H, Requena N (2010) Membrane steroid-binding protein 1 induced by a diffusible fungal signal is critical for mycorrhization in *Medicago truncatula*. *New Phytologist* 185: 716–733
- Küster H, Vieweg MF, Manthey K, Baier MC, Hohnjec N, Perlick AM (2007) Identification and expression regulation of symbiotically activated legume genes. *Phytochemistry* 68: 8–18
- Kuznetsova E, Seddas-Dozolme PMA, Arnould C, Tollot M, van Tuinen D, Borisov A, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (2010) Symbiosis-related pea genes modulate fungal and plant gene expression during the arbuscule stage of mycorrhiza with *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza* 20: 427–443
- De La Peña E, Echeverría SR, Van Der Putten WH, Freitas H, Moens M (2006) Mechanism of control of root-feeding nematodes by mycorrhizal fungi in the dune grass *Ammophila arenaria*. *New Phytologist* 169: 829–840
- Lanzotti V, Barile E, Antignani V, Bonanomi G, Scala F (2012) Antifungal saponins from bulbs of garlic, *Allium sativum* L. var. *Voghiera*. *Phytochemistry* 78: 126–134
- Laparra J, Balzergue C, Rochange S, Ludwiczak P, Letisse F, Portais JC, Bécard G, Puech-Pages V (2011) Metabolite profiling of pea roots in response to phosphate availability. *Plant Signaling and Behavior* 6: 837–839
- Larose G, Chenevert R, Moutoglis P, Gagne S, Piche Y, Vierheilig H (2002) Flavonoid levels in roots of *Medicago sativa* are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of plant physiology* 159: 1329–1339
- Lauressergues D, Delaux P-M, Formey D, Lelandais-Brière C, Fort S, Cottaz S, Bécard G, Niebel A, Roux C, Combier J-P (2012) The microRNA miR171h modulates arbuscular mycorrhizal colonization of *Medicago truncatula* by targeting NSP2. *The Plant Journal*
- Lei Z, Dai X, Watson BS, Zhao PX, Sumner LW (2011) A legume specific protein database (LegProt) improves the number of identified peptides, confidence scores and overall protein identification success rates for legume proteomics. *Phytochemistry* 72: 1020–1027
- Lei Z, Elmer AM, Watson BS, Dixon RA, Mendes PJ, Sumner LW (2005) A two-dimensional electrophoresis proteomic reference map and systematic identification of 1367 proteins from a cell suspension culture of the model legume *Medicago truncatula*. *Molecular and Cellular Proteomics* 4: 1812–1825

## ANNEXES

- Liu A, Wang B, Hamel C (2004) Arbuscular mycorrhiza colonization and development at suboptimal root zone temperature. *Mycorrhiza* 14: 93–101
- Liu J, Blaylock LA, Endre G, Cho J, Town CD, VandenBosch KA, Harrison MJ (2003) Transcript Profiling Coupled with Spatial Expression Analyses Reveals Genes Involved in Distinct Developmental Stages of an Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *The Plant Cell Online* 15: 2106–2123
- Liu J, Maldonado-Mendoza I, Lopez-Meyer M, Cheung F, Town CD, Harrison MJ (2007) Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *The Plant Journal* 50: 529–544
- Liu Z-Y, Dong H, Chu X-J (1994) Total synthesis and structural revision of chromomoric acid C-I and C-II methyl esters. *Tetrahedron* 50: 12337–12348
- Logi, Sbrana, Giovannetti (1998) Cellular events involved in survival of individual arbuscular mycorrhizal symbionts growing in the absence of the host. *Applied Environmental Microbiology* 64: 3473–3479
- Lohse S, Hause B, Hause G, Fester T (2006) FtsZ characterization and immunolocalization in the two phases of plastid reorganization in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Plant Cell Physiology* 47: 1124–1134
- Lohse S, Schliemann W, Ammer C, Kopka J, Strack D, Fester T (2005) Organization and metabolism of plastids and mitochondria in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 139: 329–340
- Lommen A (2009) MetAlign: interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data preprocessing. *Analytical Chemistry* 81: 3079–3086
- López-Pedrosa A, González-Guerrero M, Valderas A, Azcón-Aguilar C, Ferrol N (2006) GintAMT1 encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the extraradical mycelium of *Glomus intraradices*. *Fungal Genetics and Biology* 43: 102–110
- Lopez-Raez JA, Charnikhova T, Fernandez I, Bouwmeester H, Pozo MJ (2011) Arbuscular mycorrhizal symbiosis decreases strigolactone production in tomato. *Journal of Plant Physiology* 168: 294–297
- Lytovchenko A, Beleggia R, Schauer N, Isaacson T, Leuendorf JE, Hellmann H, Rose JK, Fernie AR (2009) Application of GC-MS for the detection of lipophilic compounds in diverse plant tissues. *Plant Methods* 5: 4
- Magori S, Kawaguchi M (2009) Long-distance control of nodulation: molecules and models. *Molecules and Cells* 27: 129–134
- Maillet F, Poinso V, Andre O, Puech-Pages V, Haouy A, Gueunier M, Cromer L, Giraudet D, Formey D, Niebel A, *et al* (2011) Fungal lipochitoooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469: 58–63
- Makkar HPS, Siddhuraju P, Becker K (2007) Plant secondary metabolites. *Methods in Molecular Biology* 393: 1–122
- Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR, Harrison MJ (2001) A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated

- in response to phosphate in the environment. *Molecular Plant Microbes Interactions* 14: 1140–1148
- Marginean I, Kelly RT, Page JS, Tang K, Smith RD (2007) Electrospray characteristic curves: in pursuit of improved performance in the nanoflow regime. *Analytical Chemistry* 79: 8030–8036
- Marsh JF, Schultze M (2001) Analysis of arbuscular mycorrhizas using symbiosis-defective plant mutants. *New Phytologist* 150: 525–532
- Matsuda F, Yonekura-Sakakibara K, Niida R, Kuromori T, Shinozaki K, Saito K (2009a) MS/MS spectral tag-based annotation of non-targeted profile of plant secondary metabolites. *Plant Journal* 57: 555–577
- Mihaleva V, Vorst O, Maliepaard C, Verhoeven H, de Vos R, Hall R, van Ham R (2008) Accurate mass error correction in liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry based metabolomics. *Metabolomics* 4: 171–182
- Miller RM, Jastrow JD, Reinhardt DR (1995) External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. *Oecologia* 103: 17–23
- Mizuno T, Chou MY, Inouye M (1984) A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 1966–1970
- Mizutani M, Sato F (2011) Unusual P450 reactions in plant secondary metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 507: 194–203
- Moco S, Bino RJ, Vorst O, Verhoeven HA, de Groot J, van Beek TA, Vervoort J, de Vos CHR (2006) A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. *Plant Physiology* 141: 1205–1218
- Morandi D, le Signor C, Gianinazzi-Pearson V, Duc G (2009) A *Medicago truncatula* mutant hyper-responsive to mycorrhiza and defective for nodulation. *Mycorrhiza* 19: 435–441
- Mortier V, Den Herder G, Whitford R, Van de Velde W, Rombauts S, D’Haeseleer K, Holsters M, Goormachtig S (2010) CLE peptides control *Medicago truncatula* nodulation locally and systemically. *Plant Physiology* 153: 222–237
- Mrosk C, Forner S, Hause G, Küster H, Kopka J, Hause B (2009) Composite *Medicago truncatula* plants harbouring *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots reveal normal mycorrhization by *Glomus intraradices*. *Journal Experimental Botany* 60: 3797–3807
- Müller C, Schäfer P, Störtzel M, Vogt S, Weinmann W (2002) Ion suppression effects in liquid chromatography-electrospray-ionisation transport-region collision induced dissociation mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological analysis with mass spectra libraries. *Journal of Chromatography B Analytical Technology Biomedical Life Sciences* 773: 47–52
- Nagy R, Drissner D, Amrhein N, Jakobsen I, Bucher M (2009) Mycorrhizal phosphate uptake pathway in tomato is phosphorus-repressible and transcriptionally regulated. *New Phytologist* 181: 950–959

## ANNEXES

- Nehls U (2008) Mastering ectomycorrhizal symbiosis: the impact of carbohydrates. *Journal Experimental Botany* 59: 1097–1108
- Oka-Kira E, Kawaguchi M (2006) Long-distance signaling to control root nodule number. *Current Opinion Plant Biology* 9: 496–502
- Oláh B, Brière C, Bécard G, Dénarié J, 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 Journal* 44: 195–207
- Osbourn AE (2003) Saponins in cereals. *Phytochemistry* 62: 1–4
- Parniske M (2005) Plant-fungal associations: Cue for the branching connection. *Nature* 435: 750–751
- Parniske M (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Review Microbiology* 6: 763–775
- Parniske M (2004) Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion Plant Biology* 7: 414–421
- Paszkowski U (2006) A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses 2006. *New Phytologist* 172: 35–46
- Patti GJ (2011) Separation strategies for untargeted metabolomics. *Journal of Separation Science*. doi: 10.1002/jssc.201100532
- Pawlowska TE, Douds Jr DD, Charvat I (1999) *In vitro* propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*. *Mycological Research* 103: 1549–1556
- Pérez-Tienda J, Testillano PS, Balestrini R, Fiorilli V, Azcón-Aguilar C, Ferrol N (2011) GintAMT2, a new member of the ammonium transporter family in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Fungal Genetics and Biology* 48: 1044–1055
- Pfeffer, Douds Jr DD, Becard, Shachar-Hill (1999) Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology* 120: 587–598
- Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Oresic M (2010) MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* 11: 395
- Pozo MJ, Azcon-Aguilar (2007) Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 393–398
- Prigneau O, Porta A, Maresca B (2004) *Candida albicans* CTN gene family is induced during macrophage infection: homology, disruption and phenotypic analysis of CTN3 gene. *Fungal Genetics and Biology* 41: 783–793
- Pumplin N, Harrison MJ (2009) Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in *Medicago truncatula* roots during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* 151: 809–819
- Pumplin N, Mondo SJ, Topp S, Starker CG, Gantt JS, Harrison MJ (2010) *Medicago truncatula* Vapyrin is a novel protein required for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Journal* 61: 482–494

- Ragasa CY, Tepora MM, Espinelli DH, Mandia EH, Rideout JA (2008) Chromomoric acid derivatives from *Tectona philippinensis*. *Journal of Natural Products* 71: 701–705
- Recorbet G, Valot B, Robert F, Gianinazzi-Pearson V, Dumas-Gaudot E (2010) Identification of in planta-expressed arbuscular mycorrhizal fungal proteins upon comparison of the root proteomes of *Medicago truncatula* colonised with two *Glomus* species. *Fungal Genetics and Biology* 47: 608–618
- Redecker D, Raab P (2006) Phylogeny of the glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. *Mycologia* 98: 885–895
- Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H (1994) Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 11841–11843
- Roessner U, Wagner C, Kopka J, Trethewey RN, Willmitzer L (2000) Technical advance: simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant Journal* 23: 131–142
- Rubio-Gozalbo ME, Bakker JA, Waterham HR, Wanders RJA (2004) Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency, clinical, biochemical and genetic aspects. *Molecular Aspects of Medicine* 25: 521–532
- Sato D, Awad AA, Takeuchi Y, Yoneyama K (2005) Confirmation and quantification of strigolactones, germination stimulants for root parasitic plants *Striga* and *Orobanche*, produced by cotton. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 69: 98–102
- Sbrana C, Giovannetti M (2005) Chemotropism in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* 15: 539–545
- Schliemann W, Ammer C, Strack D (2008) Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* 69: 112–146
- Schliemann W, Schmidt J, Nimtz M, Wray V, Fester T, Strack D (2006) Accumulation of apocarotenoids in mycorrhizal roots of *Ornithogalum umbellatum*. *Phytochemistry* 67: 1196–1205
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C (2001) A New Fungal Phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and Evolution. *Mycological Research* 105: 1413–1421
- Sélosse M-A, Rousset F (2011) The Plant-Fungal Marketplace. *Science* 333: 828–829
- Shaw LJ, Morris P, Hooker JE (2006) Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environmental Microbiology* 8: 1867–1880
- Shinbo Y, Nakamura Y, Altaf UL, Manin M, Ashi H, Kurkawa K, Arita M, Saito K, Ohta D, Shibata D, Kanaya S (2006) KNApSACK : A Comprehensive Species-Metabolite Relationship Database. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 57. *Plant Metabolomics*, Berlin : Springer. pp 165–181
- Simon L, Bousquet J, Lévesque RC, Lalonde M (1993) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67–69

## ANNEXES

- Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G (2006) XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical Chemistry* 78: 779–787
- Smith GS, Roncadori RW (1986) Responses of Three Vesicular – Arbuscular Mycorrhizal Fungi at Four Soil Temperatures and Their Effects on Cotton Growth. *New Phytologist* 104: 89–95
- Smith S, Read D (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*. London Academic Press
- Solaimanand MZ, Saito M (1997) Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry. *New Phytologist* 136: 533–538
- Staelin C, Xie Z-P, Illana A, Vierheilig H (2011a) Long-distance transport of signals during symbiosis. *Plant Signaling and Behavior* 6: 372–377
- Staelin C, Xie Z-P, Illana A, Vierheilig H (2011b) Long-distance transport of signals during symbiosis: are nodule formation and mycorrhization autoregulated in a similar way? *Plant Signaling and Behavior* 6: 372–377
- Stewart A, Mansfield J w. (1985) The composition of wall alterations and appositions (reaction material) and their role in the resistance of onion bulb scale epidermis to colonization by *Botrytis allii*. *Plant Pathology* 34: 25–37
- Strack D, Fester T (2006) Isoprenoid metabolism and plastid reorganization in arbuscular mycorrhizal roots. *New Phytologist* 172: 22–34
- Strijbis K, van Roermund CWT, Visser WF, Mol EC, van den Burg J, MacCallum DM, Odds FC, Paramonova E, Krom BP, Distel B (2008) Carnitine-dependent transport of acetyl coenzyme A in *Candida albicans* is essential for growth on nonfermentable carbon sources and contributes to biofilm formation. *Eukaryotic Cell* 7: 610–618
- Sumner LW, Mendes P, Dixon RA (2003) Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* 62: 817–836
- Taguchi R, Nishijima M, Shimizu T (2007) Basic analytical systems for lipidomics by mass spectrometry in Japan. *Methods in Enzymology* 432: 185–211
- Takeda N, Sato S, Asamizu E, Tabata S, Parniske M (2009) Apoplastic plant subtilases support arbuscular mycorrhiza development in *Lotus japonicus*. *Plant Journal* 58: 766–777
- Tiller SA, Parry AD, Edwards R (1994) Changes in the accumulation of flavonoid and isoflavonoid conjugates associated with plant age and nodulation in alfalfa (*Medicago sativa*). *Physiologia Plantarum* 91: 27–36
- Tisserant E, Kohler A, Dozolme-Seddas P, Balestrini R, Benabdellah K, Colard A, Croll D, Da Silva C, Gomez SK, Koul R, *et al* (2012) The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytologist* 193: 755–769
- Trépanier M, Bécard G, Moutoglis P, Willemot C, Gagné S, Avis TJ, Rioux J-A (2005) Dependence of arbuscular-mycorrhizal fungi on their plant host for palmitic acid synthesis. *Applied Environmental Microbiology* 71: 5341–5347

- Tyrkkö E, Pelander A, Ojanperä I (2010) Differentiation of structural isomers in a target drug database by LC/Q-TOFMS using fragmentation prediction. *Methods in Enzymology* 2: 259–270
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, *et al* (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455: 195–200
- Valot B, Dieu M, Recorbet G, Raes M, Gianinazzi S, Dumas-Gaudot E (2005) Identification of membrane-associated proteins regulated by the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Molecular Biology* 59: 565–580
- Valot B, Negroni L, Zivy M, Gianinazzi S, Dumas-Gaudot E (2006) A mass spectrometric approach to identify arbuscular mycorrhiza-related proteins in root plasma membrane fractions. *Proteomics* 6 Suppl 1: S145–155
- Van Deemter JJ, Zuiderweg FJ and Klinkenberg A (1956). Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of non ideality in chromatography. *Chemical Engineering Science* 5: 271–289.
- Vierheilig H, Bago B, Albrecht C, Poulin MJ, Piché Y (1998a) Flavonoids and arbuscular-mycorrhizal fungi. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 439: 9–33
- Vierheilig H, Coughlan AP, Wyss U, Piché Y (1998b) Ink and Vinegar, a Simple Staining Technique for Arbuscular-Mycorrhizal Fungi. *Applied Environmental Microbiology* 64: 5004–5007
- Volpin H, Phillips DA, Okon Y, Kapulnik Y (1995) Suppression of an Isoflavonoid Phytoalexin Defense Response in Mycorrhizal Alfalfa Roots. *Plant Physiology* 108: 1449–1454
- Wang G, Fiers M (2010) CLE peptide signaling during plant development. *Protoplasma* 240: 33–43
- Watson BS, Asirvatham VS, Wang L, Sumner LW (2003) Mapping the proteome of barrel medic (*Medicago truncatula*). *Plant Physiology* 131: 1104–1123
- Weidmann S, Sanchez L, Descombin J, Chatagnier O, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (2004) Fungal elicitation of signal transduction-related plant genes precedes mycorrhiza establishment and requires the *dmi3* gene in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 17: 1385–1393
- Werner E, Croixmarie V, Umbdenstock T, Ezan E, Chaminade P, Tabet J-C, Junot C (2008a) Mass Spectrometry-Based Metabolomics: Accelerating the Characterization of Discriminating Signals by Combining Statistical Correlations and Ultrahigh Resolution. *Analytical Chemistry* 80: 4918–4932
- Werner E, Heilier J-F, Ducruix C, Ezan E, Junot C, Tabet J-C (2008b) Mass spectrometry for the identification of the discriminating signals from metabolomics: current status and future trends. *Journal of Chromatography B Analytical Technology Biomedical Life Sciences* 871: 143–163
- Wiklund S, Johansson E, Sjöström L, Mellerowicz EJ, Edlund U, Shockcor JP, Gottfries J, Moritz T, Trygg J (2008) Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Analytical Chemistry* 80: 115–122

## ANNEXES

- Whipps JM (2004) Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany* 82: 1198–1227
- Yang S-Y, Paszkowski U (2011) Phosphate import at the arbuscule: just a nutrient? *Molecular Plant Microbe Interactions* 24: 1296–1299
- Yoneyama K, Yoneyama K, Takeuchi Y, 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
- Young ND, Debellé F, Oldroyd GED, Geurts R, Cannon SB, Udvardi MK, Benedito VA, Mayer KFX, Gouzy J, Schoof H, *et al* (2011) The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* 480: 520–524
- Zhang Q, Blaylock LA, Harrison MJ (2010) Two *Medicago truncatula* half-ABC transporters are essential for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Cell* 22: 1483–1497
- Zhou B, Xiao JF, Tuli L, Ransom HW (2011) LC-MS-based metabolomics. *Molecular BioSystems*. doi: 10.1039/C1MB05350G

**Title: Development of an analytical strategy for the identification of key metabolites involved in mycorrhizal symbiosis between *Medicago truncatula*-*Rhizophagus irregularis*.**

**Abstract:**

The arbuscular mycorrhizal (MA) symbiosis is a mutualist interaction between soil fungi (Glomeromycota) and roots of most plant species. During symbiosis AM fungi provide plants with minerals and water, and obtain in return photoassimilates to carry out its life cycle. If some symbiotic signals involved in the early stages of the AM symbiosis have been characterized in recent years, our knowledge is very limited on regulatory molecules exchanged between the symbiotic partners in planta. In this context, we have developed an analytical strategy in order to identify key metabolites involved in mycorrhizal symbiosis. We associate a differential analysis of the metabolome of mycorrhizal roots and not mycorrhizal an analysis of the expression of genes specific mycorrhizal symbiosis. The analysis of metabolic coupling the high performance liquid chromatography (UPLC) and high resolution mass spectrometry (Q-TOF) analysis with statistical unsupervised type OPLS-DA, has highlighted 71 metabolites at least 10 times more prevalent in mycorrhizal roots. Among these metabolites fifty had never been identified as characteristics mycorrhization, including propionyl-carnitine. As for the transcriptomic analysis, it was to select among these those screened metabolites may have a role in regulating the symbiosis signals reflected by their activity on the transcriptome MA of the fungus. We conducted an analysis of the expression of specific genes on the symbiosis of spores of *Rhizophagus irregularis* stimulated by root extracts fractionated by HPLC. The complementarity of the two analysis (transcriptomics and metabolic), more metabolites present in mycorrhizal roots and detected in HPLC fractions that modulate the expression of fungal genes were identified as potential candidates.