



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
recherche scientifique
جامعة زيان عاشور-الجلفة
Université Ziane Achour – Djelfa
كلية علوم الطبيعة و الحياة
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie



Projet de fin d'études

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Microbiologie Appliquée
Option : Microbiologie Appliquée

Thème

**Identification de protéines impliquées lors de la
symbiose par l'analyse du protéome de *M.
truncatula* et du mutant *symCRK***

Présenté par : AIT HOCINE SELMA
- GHEZAL WIDAD

Devant le jury :

Président : BOUTAIBA S.

M.C.A. Univ. Djelfa

Promoteur : BERRABAH F.

M.C.B. Univ. Djelfa

Examineur 1 : OUNISSI M.

M.A.A. Univ. Djelfa

Examineur 2 : BELAOUNI H.A.

M.A.A. Univ. Djelfa

Année universitaires : 2017/2018

Remerciement

Tout d'abord, nous tenons à remercier le bon Dieu le tout Puissant de nous avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail.

Nos remerciements vont au docteur **BERRABAH Fathi** notre encadreur pour nous avoir guidé dans la réalisation de ce projet.

Nous remercions vivement les étudiants du Master de microbiologie appliquée pour leur aide morale durant toute la période de préparation.

Nous voudrions remercier ensuite les membres de jury d'avoir accepté d'évaluer notre travail

Enfin, nous tenons à remercier tous ceux qui nous ont aidé et assisté durant nos études

Dédicace

*C'est avec grande gratitude et sincère mots que je dédie ce
modeste travail de fin d'étude :*

*À mon père et meilleur ami, l'épaule solide, l'œil attentif
compréhensif et la personne la plus digne de mon estime et de
mon respect.*

*À ma très chère mère et meilleure amie qui m'a donnée la vie,
la tendresse et le courage pour réussir pour son grand amour
et soutien .tout ce que je peux offrir ne pourra exprimer
l'amour et la reconnaissance que je la porte*

À mes frères : Kheire Eddine, Walid, Mohammed

À ma chère sœur :Meriem

À toute ma famille sans exception.

*À mes très chères amis :Widad, Nesrrine, Bouchra, Khouloud,
Maroua,Chemsa, Sarah, Thoria, Zineb, Soumia, Chrifa,
Hanan, Sihem, Nourhan, Fadila, Dode, Hassiba, Mourad et
Saad .*

À tous ceux qui se reconnaîtront en ce mot (ami).

À tous mes professeurs.

Selma

Dédicace

Je dédie ce mémoire :

A la mémoire de mon père, j'aurais tant aimé que tu sois présent que dieu ait ton âme dans sa sainte miséricorde

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ;
MAMA que j'adore.*

A mes chères et adorable frères et sœur :

Hassiba, Hamid, Younes

A tous mes amis qui m'ont aidé et m'ont soutiennent : Selma, Anna, Zizou ,Aicha, Nesrin, Katy, Siham, Biha , Norhane ,Fadila, Khadidja , Achora, Mourad et Saad .

Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous,. Puisse Dieu vous garder et protéger pour moi

A toute ma famille, mes amies, et tous ceux qui me sont chers, et que j'ai omis de les citer involontairement.

widad

Sommaire

I. Introduction	1
II. Synthèse bibliographique	2
1. Les interactions plantes-microorganismes	2
1.1. Les interactions plantes-pathogènes	2
1.2. Les interactions plantes-symbiotes	2
2. Réponse des plantes aux microorganismes	3
2.1. La perception, premier phase de l'interaction	3
2.2. Que perçoit la plante ?	3
2.3. Suite à la perception, la mise en route de la réponse	4
2.4. Réponse des plantes aux pathogènes	4
2.5. Les différents types de réponse immunitaire	5
3. La symbiose fixatrice d'azote	6
3.1. La reconnaissance légumineuse-rhizobia	6
3.2. La mise en place de la nodosité fixatrice d'azote	7
3.3. Ultrastructure d'une nodosité indéterminée	7
3.4. La différenciation bactérienne chez <i>M. truncatula</i>	8
3.5. L'immunité au cours de la symbiose	9
3.6. Les mutants <i>Nodule Defective in Immuno Repression</i>	9
4. Introduction à l'étude réalisée	10
4.1. Point de départ de nos recherches	11
4.2. Problématique et questions abordées	11

Sommaire

Partie III. Matériels & méthodes	12
1. Méthode d'analyse des données issues du protéome	12
2. Analyse statistique	13
3. Analyse transcriptomique	14
Partie IV. Résultats & discussion	15
1. <i>symCRK</i> présente une accumulation de protéines impliquées dans la défense	15
2. <i>S. medicae</i> intervient dans la régulation des processus physiologiques de l'hôte	15
3. <i>symCRK</i> accumule des protéines de <i>S. medicae</i> impliquées dans le métabolisme	17
4. Necrotic and Ethylen inducing Protein (NEP) potentiellement requis dans le contrôle de l'immunité	18
5. Le symbiosome chez le WT accumule des protéines végétales associées au métabolisme	18
6. Plusieurs nodulines accumulées au sein du symbiosome	21
7. Le symbiosome de <i>symCRK</i> accumule une quantité importante de protéines végétales	22
8. Les gènes accumulés dans le symbiosome de WT présente une expression différentielle	22
9. <i>symCRK</i> présente des protéines préférentiellement exprimées au sein du méristème et en zone d'infection distale	23
10. Identification des protéines inversées	26
11. Nature des protéines inversées	26
Partie V. Conclusion & perspective	28
Partie VI. Bibliographie	30
Partie VII. Annexe	37

Liste des tableaux & figures

Figure 1. La signalisation immunitaire	5
Figure 2. Modèle Zig-Zag	6
Figure 3. La symbiose <i>Medicago-Sinrozhizobium</i>	8
Figure 4. Le mutant <i>symCRK</i>	10
Figure 5. Méthode d'analyse des données du protéome	13
Figure 6. Les zones des nodosités utilisées lors de l'étude de Roux et <i>al</i>	14
Figure 7. Expression des gènes dont les protéines sont accumulées dans le symbiosome du WT	24
Figure 8. Expression des gènes correspondant aux protéines accumulées dans le symbiosome de <i>symCRK</i>	26
Figure 9. Fonctions influencées par les partenaires symbiotiques et modifications expliquant le phénotype du mutant <i>symCRK</i> .	30

Liste des tableaux & figures

Tableau 1. Protéines de bactérie enrichies dans les fractions de la plante WT et/ou <i>symCRK</i>	17
Tableau 2. Protéines de plante enrichies en fraction S chez WT et/ou <i>symCRK</i> .	19-21
Tableau 3. Nombre de protéine dont la répartition est modifiée entre le WT et <i>symCRK</i>	27
Annexe 1. Protéines spécifiquement accumulés chez le WT	39-43
Annexe 2. Protéine spécifiquement accumulés chez <i>symCRK</i>	44-52
Annexe 3. Liste des protéines dont la répartition est modifiée entre le WT et le mutant	53-57

Liste des tableaux & figures

AHL : N-acyl homoserine lactose

BAK1 : Brassinosteroid Associated Kinase 1

ETS : Effector Triggered Sensitivity

FLS2 : FLageline Sensing 2

LRRs : Leucine Reach Reapeat

LYS M : Lysine Motif

MCP : Mort Cellulaire Programmée

MAMPS : Microbial Associated Molecular Pattern

MAPKs: Mitogen Associated Protein Kinase

NBS-LRR : Nucleotide Binding site-LRR

NCRs : Nodule Cystein Reach

NDIR :Nodule Defective in Immuno Repression

NEP : Necrosis and Ethylen inducing Protein

NFP : Nodulation Factor Perception

NOP : Nodule Outer Protein

PAMPs : Pathogen Associated Molecular Pattern

PR10 :Pathogenesis Related Protein

PRRs: Pathogens Recognition Receptor

PTI : PAMP Triggered Immunity

RLK :Receptor-Like Kinase

ROS : Reactive Oxygen Species

RT-QPCR : Reverse Transcription quantitative Polymerase Chaine Reaction

SYM CRK :Symbiotic Cystein Reach Kinase

WT : la plante sauvage

I. Introduction

Lors de notre étude nous nous sommes intéressés aux mécanismes contrôlant la symbiose fixatrice d'azote entre la légumineuse *Medicago truncatula* et son partenaire symbiotique bactérien *Sinorhizobium medicae*. Au cours de ce phénomène les bactéries infectent de manière intracellulaire les racines de la plante et provoquent la formation d'un nouvel organe, la nodosité fixatrice d'azote, au sein de laquelle le microorganisme transforme l'azote atmosphérique en forme assimilable par l'hôte.

Afin d'améliorer notre compréhension de l'interaction *Medicago-Sinorhizobium*, nous avons réalisé une série d'analyses de protéomes, transcriptomes d'une plante sauvage (WT) et du protéome du mutant *symCRK* qui forme des nodosités non-fonctionnelles et présentant une perte de répression de l'immunité. L'objectif de nos recherches consistait à vérifier s'il y avait une communication endocellulaire entre les deux partenaires et si oui, d'identifier les acteurs de ce phénomène. Le phénotype du mutant *symCRK* a toujours été considéré uniquement du point de vue immunitaire, ainsi nous avons cherché à vérifier s'il y avait d'autres types de modifications expliquant le dysfonctionnement observé chez ce mutant, pour cela plusieurs hypothèses non-exclusives ont été testées en utilisant les méthodes d'analyses convenables.

II. Synthèse bibliographique

1. Les interactions plantes-microorganismes

Il existe plusieurs types d'interactions plantes-microorganismes, elles peuvent être sans effet sur l'hôte, bénéfiques dans le cas des symbioses ou à l'inverse néfastes dans le cas des pathogènes ¹.

1.1. Les interactions plantes-pathogènes

Un grand nombre de bactéries, de champignons et d'oomycètes sont capables d'infecter les plantes, causant des symptômes allant de l'altération de la croissance à la mort de l'individu infecté¹. Par exemple la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* produit la maladie de la tumeur du collet caractérisée par la production d'une masse résultant de l'hyper prolifération des cellules du cortex au niveau de la jonction racine-tige des hôtes infectés². *Ralstonia solanacearum* est quant à elle capable de pénétrer les racines de l'hôte via le méristème et les jonctions entre la racine principale et les racines secondaires, une fois dans l'hôte la bactérie se multiplie au sein des tissus vasculaires et se propage dans l'individu conduisant ainsi à sa mort³. Le pouvoir pathogène d'une souche diffère d'un hôte à l'autre, par exemple, un microorganisme infectant un hôte ne sera pas obligatoirement pathogène chez une autre plante⁴.

1.2. Les interactions plantes-symbiontes

La symbiose est définie comme étant une association à bénéfices mutuelle établie entre l'hôte et ces partenaires¹. Dans le cas des plantes on peut distinguer deux grands types de symbioses, la première est la symbiose mycorhizienne qui est une association plante-champignon, répandue chez de nombreuses plantes elle permet à l'hôte d'obtenir le phosphate et certains éléments nutritifs inaccessibles dans le sol⁵. Le second type est la symbiose fixatrice d'azote, identifiée notamment chez les légumineuses, qui sont des plantes de la famille des fabacées capables d'interagir avec des bactéries du sol fixatrices d'azote, les rhizobies⁵. Cette interaction permet à l'hôte d'obtenir l'azote indispensable à la croissance et au développement.

II. Synthèse bibliographique

2- Réponse des plantes aux microorganismes

Au cours de leur évolution les végétaux ont développés un ensemble de mécanismes leur permettant de discriminer entre les différents types de microorganismes (neutre, pathogène ou symbionte) et d'apporter la réponse adéquate⁶.

2.1. La perception, premier phase de l'interaction

Les plantes ont la capacité de percevoir les microorganismes directement ou indirectement^{7,8}. Des récepteurs membranaires, extra ou intracellulaires sont employés afin de discriminer entre pathogène et symbionte⁹. Les récepteurs localisés dans les membranes plasmiques sont les plus décrits dans la littérature, ils sont composés d'une partie extra cellulaire impliquée dans la perception, d'un domaine transmembranaire d'ancrage à la membrane ainsi qu'un domaine intracellulaire impliqué dans l'activation de phénomène de signalisation menant à la réponse de l'hôte¹. Certains récepteurs peuvent présenter des domaines modifiés ou absents, dans ce cas ils peuvent former des homo/hétéro, di/multimère avec d'autres récepteurs afin de mener à bien leur fonction^{10,11}.

2.2. Que perçoit la plante ?

Plusieurs éléments peuvent être perçus par la plante, les MAMPs (Microbial Associated Molecular Pattern) et PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern) correspondent à des molécules partagées entre les microorganismes et les pathogènes respectivement¹². En fonction de la nature chimique de ces molécules, le domaine de perception du récepteur va être différent, ainsi les LysM (Lysine Motif) interagissent avec des glucanes, alors que les LRRs (Leucine Repeat) reconnaissent des peptides^{13,14}. L'un des LRR RLK (Receptor-Like Kinase) les mieux documentés est FLS2 (Flagellin Sensing 2) qui reconnaît le peptide flg22 présent dans le flagelle des bactéries, formant un complexe avec le récepteur BAK1 (Brassinosteroid Associated Kinase 1), ils activent la signalisation immunitaire¹¹. Les plantes peuvent aussi détecter de manière indirecte les microorganismes par la perception des effets potentiels engendrés par ces derniers, par exemple dans le cas des pathogènes, la dégradation des parois cellulaires libère des oligogalacturonates perçus par la plante¹⁵.

II. Synthèse bibliographique

2.3. Suite à la perception, la mise en route de la réponse

Après la liaison du ligand à son récepteur, une activation de la signalisation cellulaire est observée¹¹. Ce phénomène comprend un ensemble d'évènements fondamentalement similaires quel que soit le type de microorganismes, mais dont l'amplitude ou les acteurs sont variables d'un microbe à un autre. Dès l'activation du récepteur, une dépolarisation membranaire impliquant des échanges d'ions a lieu, elle stimule des protéines de signalisation directement ou indirectement via l'influx de calcium au sein de la cellule hôte¹⁶. Ce dernier se fixe sur des protéines ayant des domaines de fixation de Ca^{+2} , telle que les calmodulines¹⁷ et vont être responsables du déclenchement de cascades de signalisations comportant plusieurs dizaines de protéines s'activant les uns-les autres¹⁸. Le récepteur kinase active aussi cette cascade par phosphorylation des protéines impliquées dans la chaîne de signalisation et d'enzymes synthétisant des espèces réactives de l'oxygène ou ROS (Reactive Oxygen Species)¹⁹ (figure 1). Les MAPKs (Mitogen Associated Protein Kinase) est une famille de protéines dont certains membres jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire²⁰. Elles agissent sous forme de module composé de 3 types de MAPK : MAPKKK, MAPKK et MAPK qui se phosphorylent en cascade menant à la fin à la stimulation de la MAPK, impliquée dans l'activation de facteurs de transcriptions responsables de l'induction d'expression de gènes immunitaires au sein du noyau cellulaire²⁰.

2.4. Réponse des plantes aux pathogènes

La perception des pathogènes s'effectue via des récepteurs nommés PRRs (Pathogens Recognition Receptor) qui activent la signalisation immunitaire caractérisée par les modifications physiologiques précédemment citées¹⁸. Une réponse immunitaire est alors déclenchée et conduit à différents évènements : tel que l'expression de gènes immunitaires, la production et la libération de composés toxiques (exemple : les phénols) et à la MCP (Mort Cellulaire Programmée) des cellules infectées²¹ (figure 1). Dans certains cas les plantes peuvent perturber les signaux de communication employés par les pathogènes tel que les AHL (N-acyl homoserine lactone) du quorum sensing bactérien²².

II. Synthèse bibliographique

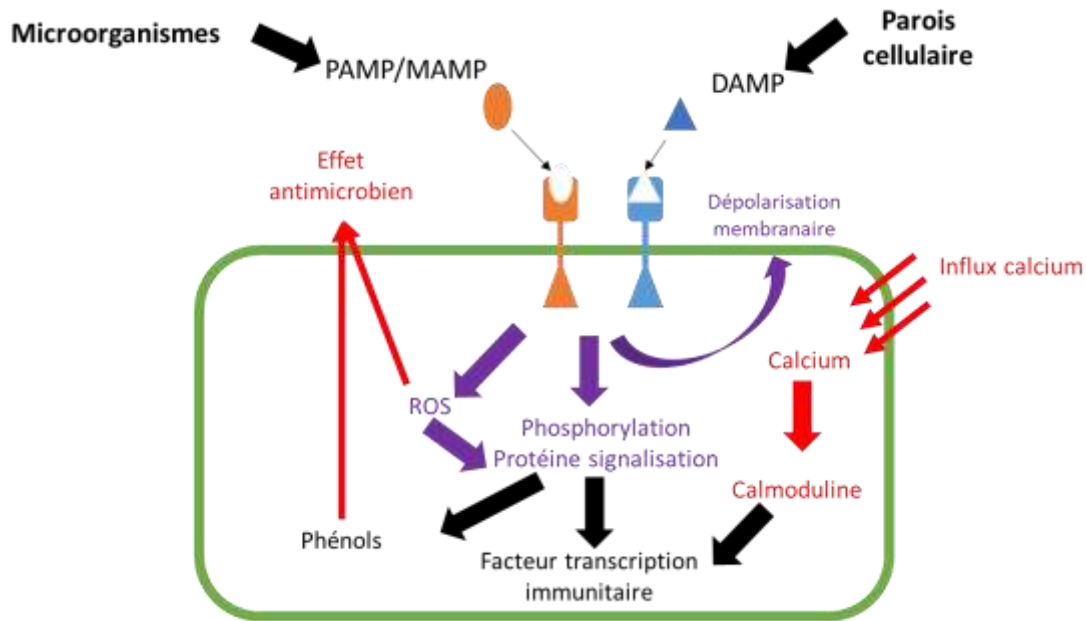


Figure 1. La signalisation immunitaire. Suite à la perception des PAMP/MAMPs ou DAMP par les RLKs, une dépoliarisation membranaire à lieu et conduit à l'accumulation du calcium dans la cellule. Ce dernier active des protéines telles que les calmodulines. Les récepteurs peuvent activer par phosphorylation des protéines de signalisation immunitaire et les enzymes responsables de la production de ROS, molécules ayant un effet antimicrobien et qui induisent des modifications post traductionnelles sur les protéines de signalisation. L'ensemble de ces événements abouti à l'activation de facteurs de transcriptions stimulant l'expression de gènes immunitaire, enfin les composés antimicrobiens tels que les phénols sont secrétés dans le milieu extracellulaire.

2.5. Les différents types de réponse immunitaire

Il existe plusieurs niveaux de réponses associés à plusieurs niveaux de reconnaissances²³, le premier est la PTI (PAMP Triggered Immunity) qui résulte de la perception des PAMP/MAMP, elle conduit à l'expression de gènes immunitaires et à la libération de substances toxiques²³. Certains pathogènes ont la capacité d'inhiber la PTI par l'injection de petites protéines appelées effecteurs au sein de la cellule hôte, les effecteurs agissent comme des perturbateurs de la signalisation immunitaire^{24,25}. Dans le cas où ils arrivent à stopper la PTI, on parlera alors d'ETS (Effector Triggered Sensitivity). Certaines plantes possèdent des récepteurs intracellulaires NBS-LRR (Nucleotide Binding site-LRR) capables de détecter les effecteurs²⁶, suite à leur activation, une réponse plus intense conduisant à la MCP est observée²⁷. La figure 2 présente le modèle

II. Synthèse bibliographique

Zigzag proposé par Jones et Dangl décrivant les niveaux de perception et de réponse au cours des interactions plantes-microorganismes²⁷.

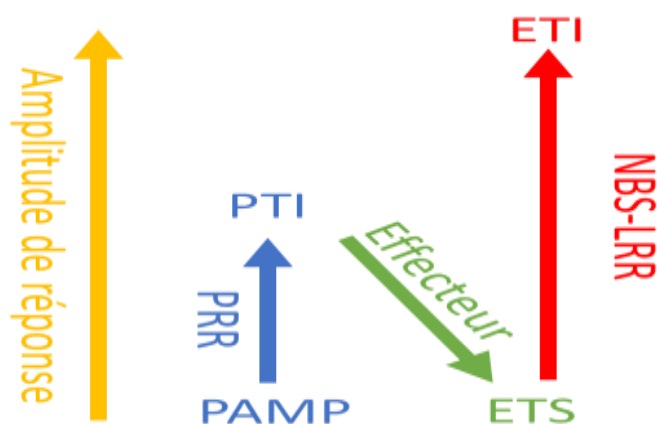


Figure 2. Modèle Zigzag. Suite à la perception des PAMPs par les PRRs, une PTI est déclenchée, elle produit une réponse d'amplitude moyenne. Les pathogènes peuvent utiliser des effecteurs qui bloquent la PTI et conduisent à l'ETS. Enfin les plantes ayant des récepteurs NBS-LRR adéquats déclenchent une ETI d'amplitude maximale. Figure Modifiée de²⁷.

3- La symbiose fixatrice d'azote

L'azote peut être apporté aux plantes sous forme minérale par l'ajout d'engrais azotés²⁸. L'inconvénient de ce type d'apport est que les engrais minéraux à long terme détruisent les sols et les habitats naturels²⁹. L'alternative est l'utilisation de plantes possédant la capacité naturelle de produire de l'azote, tel que *Medicago truncatula*, une légumineuse qui obtient cette molécule au cours d'une interaction symbiotique avec les rhizobies³⁰.

Notre projet de recherche se focalisant sur la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents à l'interaction entre M. truncatula et son partenaire symbiotique Sinorhizobium medicae, ce chapitre se propose de décrire plus en détail cette symbiose.

3.1. La reconnaissance légumineuse-rhizobies

En condition de carence azotée, les légumineuses via leurs racines synthétisent et libèrent des flavonoïdes qui sont perçus par les rhizobies³¹. Cette perception passe par la fixation des flavonoïdes au facteur de transcription bactérien NodD, après son activation, il déclenche la

II. Synthèse bibliographique

biosynthèse de facteurs de nodulation ou facteurs nod qui sont des chitooligosaccharides³². Une fois dans la rhizosphère, ces facteurs sont perçus par des RLK de type LysM tel qu'NFP (Nodulation factor Perception)³³. Une fois activé, ces derniers enclenchent une signalisation cellulaire symbiotique indispensable à la mise en place de l'interaction⁵.

3.2. Formation de la nodosité fixatrice d'azote

La signalisation symbiotique conduit à de deux évènements, le premier est l'infection des racines par les bactéries qui forment un cordon d'infection pénétrant via les poils absorbants racinaires³⁴. Le cordon d'infection croit en direction du cortex, parallèlement à cela, le deuxième évènement est enclenché et consiste à la réactivation de la division des cellules du cortex au point d'infection³⁴. Enfin les bactéries sont re-larguées au sein des cellules corticales³¹. Ces phénomènes conduisent à la mise en place d'un nouvel organe racinaire la nodosité fixatrice d'azote qui accueille les rhizobia³¹(figure 3).

3.3. Ultrastructure d'une nodosité indéterminée

On peut distinguer deux types de nodosités, celles qui sont déterminées, de forme arrondie et celles qui sont indéterminées, de forme allongée^{35,36}. *M. truncatula* produit le second type qui est caractérisé par une zonation des tissus³⁷ (figure 3). La zone I ou zone meristématique est responsable de la production des différents tissus de l'organe ainsi que de sa croissance en longueur, la zone II ou zone d'infection accueille les rhizobia qui infectent de manière intracellulaire les cellules de l'hôte, les bacteroids (forme intracellulaire des rhizobia) sont entourés d'une membrane appelée membrane peri-bacteroidienne dérivant de la membrane plasmique de l'hôte et séparée du bacteroid par un espace peri-bacteroidien, l'ensemble est appelé symbiosome. Au sein de la zone II les bacteroids immatures se différencient pour devenir des bacteroids matures fixant l'azote dans la zone III ou zone de fixation. Enfin quand la nodosité devient trop âgée, quand une source d'azote organique est ajoutée au milieu ou quand la plante est stressée, une zone IV ou zone de sénescence apparaît, au sein de laquelle les bactéries, mais aussi les composés de la plante sont dégradés et recyclés³⁷(figure 3).

II. Synthèse bibliographique

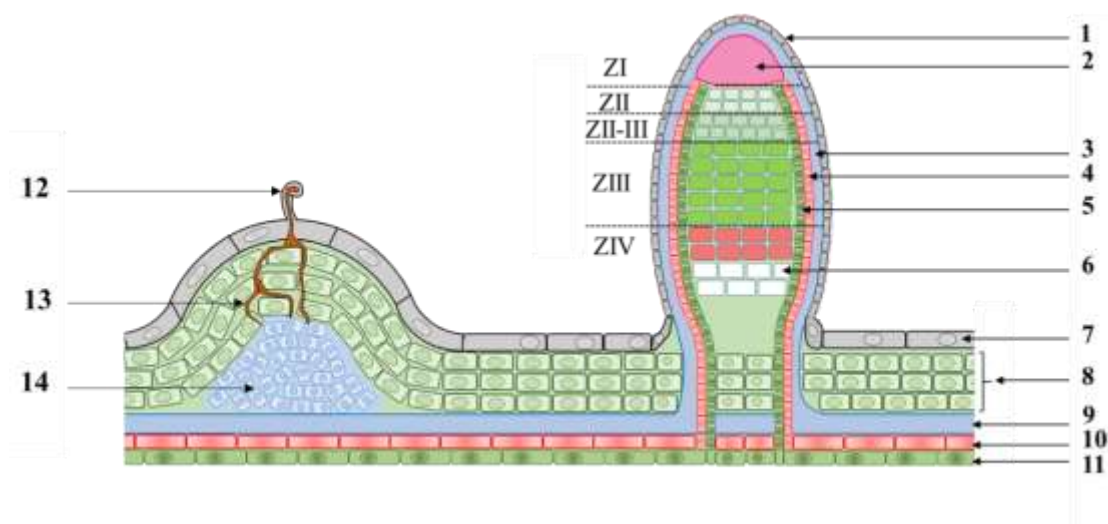


Figure 3. La symbiose *Medicago-Sinorhizobium*. Au cours de la symbiose, après la phase de reconnaissance les bactéries forment un cordon d'infection (13) qui pénètre au sein de la racine via les poils absorbants (12). En parallèle une réactivation de la division des cellules du cortex à lieu formant le future primordium nodulaire (14). L'interaction conduit à la formation d'une nodosité fixatrice d'azote composée d'un méristème apical (ZI), d'une zone d'infection (ZII) au sein de laquelle les rhizobia infectent de manière intracellulaire les cellules de l'hôte et se différencient. Au sein de la zone de fixation (ZIII) les bacteroids fixent l'azote atmosphérique pour le bénéfice de la plante. Enfin on observe la zone de sénescence (ZIV) au sein d'une nodosité âgée, d'une plante stressée ou après ajout de nitrate dans le milieu de culture. 1: épiderme nodulaire, 2: méristème, 3: cortex and endoderme nodulaire, 4: xylème, 5: phloème, 6: cellules vides, 7: épiderme racinaire, 8: cortex racinaire, 9: endoderme racinaire et péricycle, 10: xylème racinaire, 11: phloème racinaire (modifié de³⁷).

3.4. La différenciation bactérienne chez *M. truncatula*

Au cours de la symbiose, *Sinorhizobium sp* entame un processus de différenciation au cours duquel le bacteroid augmente en taille passant de 1 μm à 7 μm avec une endoreduplication du génome pouvant atteindre 32 copies³⁸. Ce processus est contrôlé chez *M. truncatula* par une famille de gène codant des NCRs (Nodule Cystein Reach) qui sont des petits peptides antimicrobiens adressés au bacteroid via l'endopeptidase Dnfl et internalisés au sein de la bactérie par le transporteur bactérien BacA³⁹. L'absorption des NCRs par la bactérie est essentielle afin de prévenir l'effet antibactérien des peptides³⁹, au sein du bacteroid les NCR interfèrent avec des protéines telles que FtZ (impliquée dans la division cellulaire) afin de stimuler la différenciation⁴⁰. Enfin le bacteroid mature produit la nitrogénase qui est l'enzyme

II. Synthèse bibliographique

impliquée dans la transformation de l'azote atmosphérique en forme assimilable (NH_3^+) par la plante⁴¹.

3.5. L'immunité au cours de la symbiose

La répression de l'immunité au cours des étapes précoces de la symbiose est un élément clé permettant la mise en place de l'interaction⁴². Plusieurs études ont montrées qu'une répression de l'expression des gènes immunitaires à lieu après la reconnaissance des rhizobia, elle résulte de l'activation de la signalisation symbiotique induite par les facteurs nod et dans certain cas de l'effet d'effecteurs symbiotiques appelés NOP (Nodule Outer Protein)⁴³. Afin d'éviter la stimulation de la réponse immunitaire, certaines rhizobia ont modifiées leurs MAMPs telle que *S. meliloti* qui présente un flg22 divergent de la structure canonique du peptide identifiée chez les bactéries⁴². Enfin les rhizobia peuvent réduire la stimulation immunitaire en empêchant la pénétration du calcium au sein des cellules de l'hôte⁴².

3.6. Les mutants *Nodule Defective in Immuno Repression*

Plusieurs mutants de *M. truncatula* ont la capacité de former des nodosités, mais ces dernières sont non fonctionnelles (non-fixatrices ou fix-)⁴⁴. Parmi ces mutants certain présente un dysfonctionnement de la répression immunitaire conduisant à la formation de nodosités nécrotiques accumulant les composés phénoliques et des protéines immunitaires telle que la PR10 (Pathogenesis Related protein)^{31,45-48}. Ces mutants ont été nommés NDIR (Nodule Defective in Immuno Repression)³⁷. Parmi eux le mutant altéré dans le gène *SymCRK* (*Symbiotic Cystein Reach Kinase*) qui code un RLK probablement impliqué dans la prévention de la réponse immunitaire au cours de l'infection des nodosités par les rhizobia (figure 4)⁴⁹, le mutant de ce gène présente notamment une accumulation de phénols et l'expression de gènes de défense au sein des nodosités (figure 4)⁴⁹.

II. Synthèse bibliographique

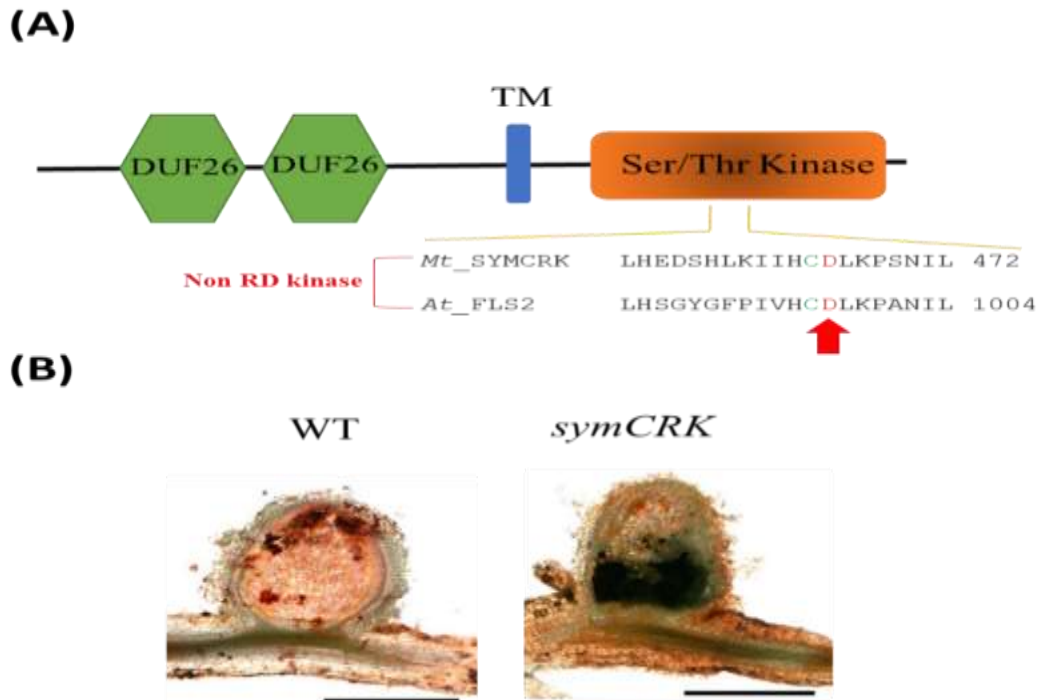


Figure 4. Le mutant *symCRK*. (A) Le gène *SymCRK* code un RLK avec deux domaines extracellulaires de fonction inconnue (DUF26), un domaine transmembranaire (TM) et un domaine intracellulaire Serine/Thréonine protéine kinase, ce dernier possède un motif non-RD caractéristique des PRRs tel que FLS2. (B) le mutant du gène présente des nodosités accumulant les phénols. WT : Wild type ou type sauvage. Figure issue de⁴⁹.

4. Introduction à l'étude réalisée

Nos travaux font suite à la publication du protéome de *M. truncatula* et du mutant *symCRK*⁴⁶. Les auteurs décrivent les phénotypes des mutants *symCRK* comparés au sauvage sur l'aspect protéomique, dans l'article, les auteurs se focalisent sur les protéines immunitaires et la voie de l'éthylène, ils démontrent qu'une partie du phénotype du mutant étudié est dépendant de l'activation de la réponse éthylénique conduisant à la dé-répression de l'immunité.

Dans l'étude publiée, seulement une partie des données ont été exploitées et beaucoup d'aspects liés à la symbiose chez *M. truncatula* et à la compréhension du phénotype de *symCRK* peuvent être encore prospectés. Notre projet consisté à re-analyser les données et de les recouper avec celles issues de transcriptomes afin d'améliorer notre compréhension de l'interaction étudiée.

II. Synthèse bibliographique

4.1. Point de départ de nos recherches

Notre point de départ été les données du protéome issus de Berrabah F et ces collègues⁴⁶. Le protéome présente des protéines de *M. truncatula* et de *S. medicae* identifiées dans trois fractions cellulaires correspondant : au cytosol et au microsome de l'hôte, ainsi qu'au symbiosome. Le fractionnement a été obtenu par centrifugation différentielle sur des broyas de nodosités issus de la plante sauvage (WT) ou du mutant *symCRK*. Nous avons aussi utilisé au cours de l'étude les données de transcriptome issue de l'étude de Roux et al⁵⁰ représentant les transcrits accumulés pour chaque zone de la nodosité chez la plante WT.

4.2. Problématique et questions abordées

Au cours de notre étude nous avons cherché à identifier de nouveaux acteurs impliqués dans la symbiose, notamment ceux qui été requis dans les échanges bacteroids-hôtes. Un autre aspect important de notre travail été d'expliquer d'autre différences de phénotype observés entre le sauvage et *symCRK* non décrites dans l'article publié. Pour cela différentes hypothèses testées par des méthodes de comparaisons adéquates ont été réalisées, enfin nous avons cherché a identifié des gènes candidats pour la réalisation d'études fonctionnelles.

III. Matériels & méthodes

La méthodologie d'obtention de protéomes est détaillée dans l'annexe

1. Méthode d'analyse des données issues du protéome

Au cours de notre travail nous nous sommes intéressés à plusieurs aspects du protéome chez le WT et/ou *symCRK* :

(i) Afin de comprendre les échanges bacteroid- plante : pour chaque génotype (WT ou *symCRK*, figure 5 ; comparaison intra génotype) nous avons cherché à identifier les protéines s'accumulant préférentiellement dans des fractions de telle sorte qu'on obtienne les protéines de bactéries (flèche jaune) accumulées dans les fractions de la plante (cytosol/microsome) et celle de la plante (flèche verte) accumulées en fraction symbiosome contenant le bacteroid (méthode a).

(ii) Afin d'expliquer les différences de phénotype entre sauvage et mutant : nous avons appliqués trois méthodes de recherche, **a)** la première consiste à comparer entre les génotypes (figure 5, comparaison inter génotype méthode b) les résultats obtenus par la méthode précédente (méthode a). **b)** La seconde est d'identifier les protéines spécifiquement accumulées chez le WT ou le mutant (comparaison inter génotype, méthode c). **c)** La troisième approche consiste à identifier les protéines qui présentes un changement de répartition au sein des fractions entre les deux génotypes (comparaison inter génotype, méthode d).

III. Matériels & méthodes

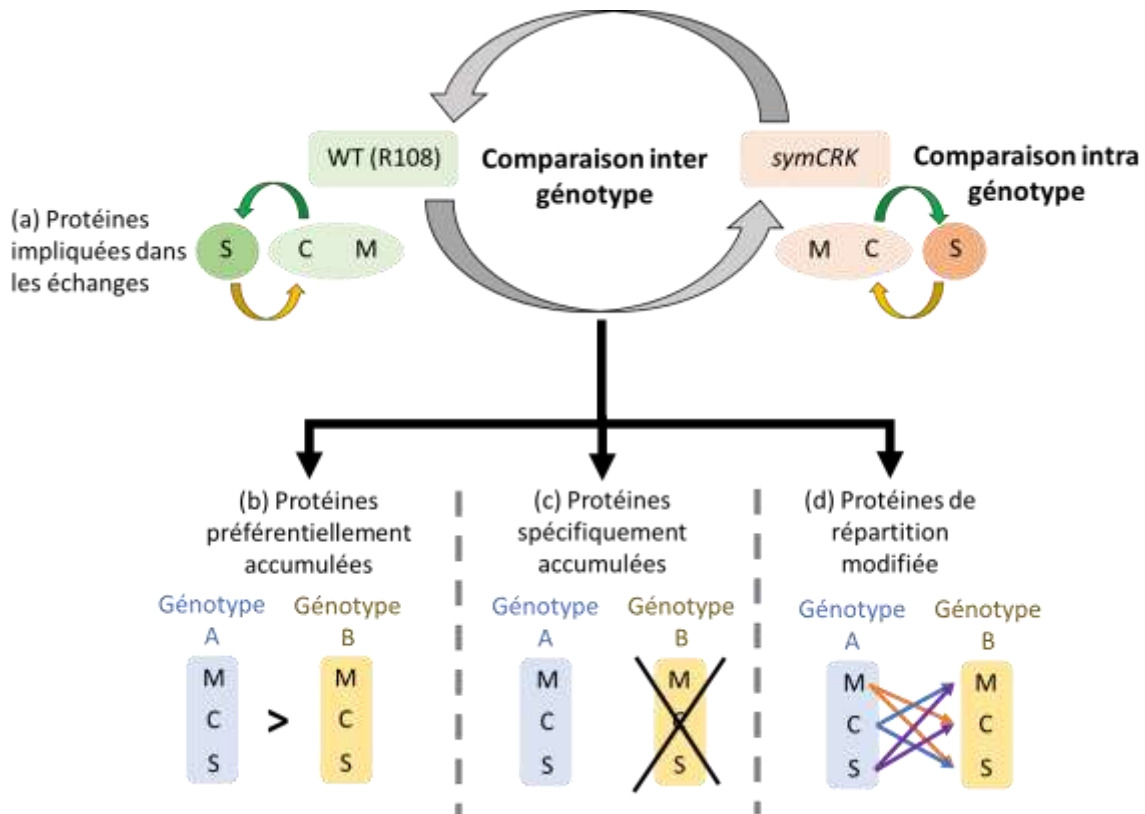


Figure 5. Méthode d'analyse des données protéomiques. Au cours des comparaisons intra génotype les protéines de plante (flèche verte) accumulées en fraction symbiosome et les protéines de bactéries (flèche jaune) accumulées en fraction de plante (cytosol/microsome) sont identifiées (méthode a). Dans les comparaisons inter géotypes sont identifiées les protéines communes et spécifiques isolées au cours de la méthode a entre WT et *symCRK* (méthode b), puis sont identifiées les protéines spécifiquement accumulées au sein d'un géotype sans prendre en considération la répartition entre les fractions (méthode c) et les protéines dont la répartition est modifiée entre les géotypes (méthode d). M : fraction microsomale, C : fraction cytosolique, S : fraction symbiosomale.

2. Analyse statistique

Après téléchargement des données, les moyennes des valeurs de détection des protéines ont été calculées pour chaque fraction, par la suite l'identification des protéines en utilisant les différentes méthodes citées est réalisée avec l'application de test logique et de filtrage disponibles sur Excel.

III. Matériels & méthodes

3-Analyse transcriptomique

Nous avons cherché pour chaque protéines isolées à déterminer la/les zone(s) d'expression dans la nodosité sauvage. Pour cela nous avons utilisé les données issues du transcriptome réalisé par Roux et ces collègues⁵¹. Lors de cette étude, les nodosités de *M. truncatula* WT ont été récoltées, fixées et disséquées par méthode de microdissection laser de telle sorte que cinq parties soient isolées (voir figure 6). Les transcrits pour chaque zone sont extraits puis analysés par technologie RNA-seq. Il est important d'indiquer que les résultats sont obtenus dans le contexte WT, ainsi l'expression des gènes correspondants aux protéines identifiées chez *symCRK* sera analysée chez le WT.

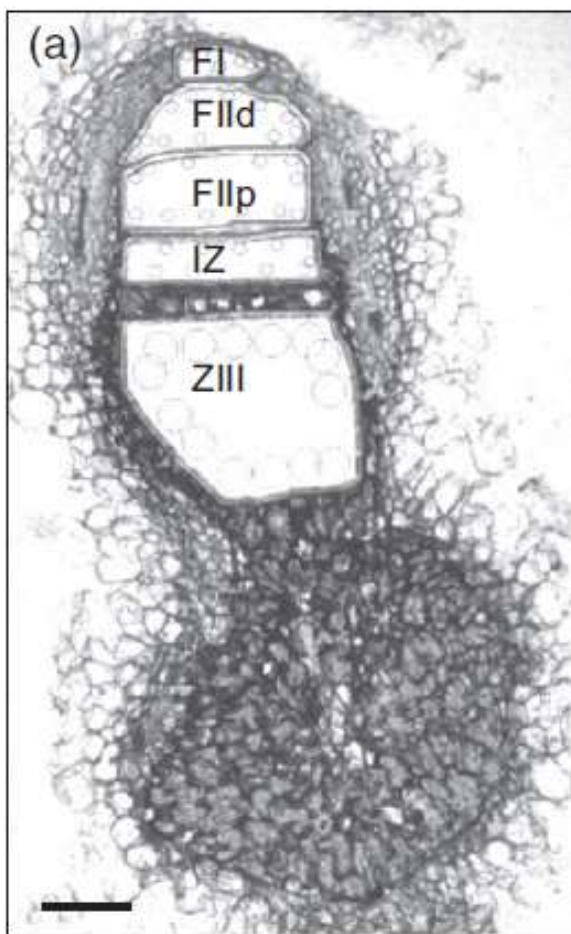


Figure 6. Représentation des zones produites au cours de l'étude de Roux et al. FI : méristème, FIId : zone d'infection distale, FIIP : zone d'infection proximale, IZ : inter zone séparant les zones II et III, ZIII : zone de fixation⁵¹.

IV. Résultats & discussion

Le volume des résultats obtenu étant très important et dans le but de faciliter la lecture de cette partie de notre manuscrit, nous allons discuter les résultats les plus pertinents.

1. *symCRK* présente une accumulation de protéines impliquées dans la défense

Nous avons tous d'abord réalisé une analyse des protéines spécifiquement accumulées au sein de chaque génotype (voir méthode c, matériel & méthode). Le tableau Annexe1 & Annexe2 en annexe présente les protéines spécifiquement accumulées chez le WT et *symCRK* respectivement. On détecte 113 protéines chez le WT contre 200 chez le mutant. La plante sauvage présente une accumulation de protéines ayant des fonctions variées, impliquées dans le métabolisme, la croissance, le développement, la régulation hormonale et possiblement dans le maintien de la survie intra cellulaire des bactéries (Annexe1), alors que chez le mutant on identifie des récepteurs immunitaires, des protéines de défense, des enzymes impliquées dans le stress redox et dans la biosynthèse de composés immunitaires (Annexe2). Ces résultats confirment l'hypothèse indiquant que le dysfonctionnement menant au phénotype de *symCRK* est lié à la perte de la biosynthèse de protéines normalement impliquées dans le fonctionnement de la nodosité et qui sont remplacées par des protéines impliquées dans la réponse immunitaire. Nos observations sont en accords avec celles réalisées par les auteurs de l'article présentant le protéome⁴⁶, ce qui valide notre démarche de recherche.

2. *S. medicae* intervient potentiellement dans la régulation des processus physiologiques de l'hôte

Dans le but d'aller plus loin, nous avons cherché à identifier les protéines de *S. medicae* influençant la physiologie de *M. truncatula*, pour cela les protéines de la bactérie accumulées dans les fractions du cytosol et du micrososome du WT et/ou de *symCRK* ont été identifiées (voir méthode a et b, matériel & méthode). La première partie du tableau 1 présente les résultats obtenus pour la plante sauvage. L'analyse révèle la présence de 25 protéines de *S. medicae* accumulées au sein de fraction du WT. Cette observation indique que la bactérie est capable d'exporter des protéines vers son partenaire symbiotique. Plusieurs travaux ont révélés que les rhizobia peuvent adresser des protéines au sein des cellules afin de contrôler des processus physiologique tel que l'immunité, c'est l'exemple de la souche NGR234 qui injecte des effecteurs symbiotiques au début de l'interaction afin d'inhiber les réactions de défense^{43,52}. Plusieurs protéines accumulées sont annotées en tant qu'interactant d'autres protéines telles que des récepteurs (tableau 1). Une hypothèse serait qu'elles interviennent dans la régulation de

IV. Résultats & discussion

processus physiologique de l'hôte en interagissant avec les protéines de ce dernier. Ce phénomène est observé chez des pathogènes intracellulaire tel que *Listeria monocytogène*, qui au sein de la cellule macrophagique à la capacité en utilisant des protéines diverses à manipuler la signalisation afin d'échapper à la dégradation⁵³. Certaines protéines isolées font partie de la famille des lipases et des lipoprotéines qui sont probablement impliquées dans le métabolisme/contrôle des phospholipides⁵⁴ (tableau 1). Il est possible que *S. medicae* utilise ces protéines afin de contrôler l'homéostasie lipidique de *M. truncatula*. Plusieurs pathogènes présentes la capacité de manipulent les phospholipides afin notamment de perturber la communication intracellulaire impliquant ce type de molécule⁵³. Enfin des enzymes bactériennes requises dans la production de ROS (NADPH oxydase et Cytocrome C oxydase) sont enrichies en fraction microsomal (tableau 1). Ces protéines interviennent probablement dans le contrôle de la balance d'oxydoréduction (redox) qui participent notamment dans l'immunité et le métabolisme⁵⁵⁻⁵⁷. L'ensemble des résultats indique qu'une fois dans la cellule le bacteroid continue à influencer son hôte probablement dans le but de maintenir l'interaction et complète les données présentes dans la bibliographie⁵⁸.

IV. Résultats & discussion

Tableau 1. Protéines de bactérie enrichies dans les fractions de plante WT et/ou *symCRK*.

Les valeurs représentent la moyenne de détection des protéines issue de trois répétitions biologiques pour chaque condition. S : symbiosome, M : micrososome, C : cytosol.

		WT			SymCRK		
		S	M	C	S	M	C
Augmentées dans micrososome et/ou cytosol du WT							
Smed_2392	Extracellular ligand-binding receptor	1,37	0,18	1,40	3,65	0,19	1,54
Smed_3416	Basic membrane lipoprotein	1,28	0,08	1,43	2,12	0,17	1,08
Smed_4889	Glycine betaine ABC transporter substrate-binding protein	0,06	0,00	0,13	0,53	0,00	0,10
Smed_0102	Periplasmic binding protein/LacI transcriptional regulator	0,95	0,07	1,11	2,05	0,12	0,69
Smed_2326	Extracellular solute-binding protein	0,48	0,00	0,48	1,02	0,00	0,30
Smed_1415	Basic membrane lipoprotein	0,51	0,07	0,70	1,07	0,06	0,27
Smed_3102	Extracellular solute-binding protein	0,66	0,00	0,68	0,95	0,00	0,31
Smed_0310	Extracellular solute-binding protein	0,33	0,00	0,35	0,70	0,00	0,36
Smed_4970	5-oxopent-3-ene-1,2,5-tricarboxylate decarboxylase	0,42	0,00	0,44	0,75	0,00	0,24
Smed_3227	Periplasmic binding protein/LacI transcriptional regulator	0,25	0,00	0,31	0,91	0,00	0,48
Smed_2041	ABC transporter binding protein	0,17	0,00	0,18	1,27	0,10	0,48
Smed_2305	Glycine betaine ABC transporter substrate-binding protein	0,11	0,00	0,40	0,73	0,00	0,34
Smed_5338	Basic membrane lipoprotein	0,15	0,00	0,26	0,70	0,00	0,16
Smed_1123	Endoribonuclease L-PSP	0,65	0,15	0,70	0,74	0,00	0,39
Smed_1728	Extracellular solute-binding protein	0,00	0,00	0,05	0,92	0,00	0,13
Smed_1079	GDSL family lipase	0,65	0,00	0,69	0,54	0,00	0,25
Smed_1129	Aliphatic sulfonates ABC transporter substrate-binding protein	0,12	0,00	0,13	0,44	0,00	0,00
Smed_2779	Keto-hydroxyglutarate-aldolase/keto-deoxy-phosphogluconate aldolase	0,22	0,00	0,24	0,91	0,00	0,12
Smed_3005	50S ribosomal protein L21	0,46	0,50	0,23	0,58	0,37	0,35
Smed_3485	50S ribosomal protein L20	0,53	0,53	0,32	0,71	0,26	0,47
Smed_5932	Cytochrome c oxidase, cbb3-type subunit III	0,27	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00
Smed_3491	Hypothetical protein	0,00	0,00	0,21	0,42	0,00	0,11
Smed_0948	NADH dehydrogenase	0,24	0,26	0,00	0,00	0,00	0,00
Smed_5873	Basic membrane lipoprotein	0,00	0,00	0,07	0,12	0,00	0,00
Smed_2827	Transketolase central region	0,08	0,00	0,09	0,17	0,07	0,00
Augmentées dans micrososome et/ou cytosol de <i>symCRK</i>							
Smed_6223	Nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain	4,30	0,43	0,94	0,13	0,23	0,53
Smed_1620	Cold-shock DNA-binding domain-containing protein	5,69	0,00	1,61	2,97	0,00	4,19
Smed_2005	Cold-shock DNA-binding domain-containing protein	1,96	0,00	0,95	0,58	0,00	1,40
Smed_2138	Riboflavin synthase subunit beta	0,26	0,00	0,26	0,19	0,00	0,23
Smed_0937	Acyl-CoA dehydrogenase domain-containing protein	0,10	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00
Augmentées dans micrososome et/ou cytosol de WT et <i>symCRK</i>							
Smed_1633	Necrosis-inducing protein	0,12	0,53	0,00	0,00	0,00	0,07
Smed_0448	FOF1 ATP synthase subunit C	2,37	2,60	0,96	1,16	0,87	1,19

3. *symCRK* accumule des protéines de *S. medicae* impliquées dans le métabolisme

La deuxième partie du tableau 1 présente les protéines de bacteroid accumulées au sein des fractions du mutant. Cinq protéines sont préférentiellement accumulées chez *symCRK*. Permis elle, la nitrogenase qui est normalement localisée au sein du bacteroid chez le WT, elle se retrouve en plus grande quantité dans le cytosol du mutant. Ceci peut être expliquée par le fait que chez *symCRK* les bactéries subissent une dégradation⁴⁹, il est possible que leur contenu intracellulaire se retrouve dans la cellule hôte. Plusieurs protéines chaperonnes sont préférentiellement accumulées dans le cytosol, dans le cas où leur localisation ne résulte pas d'un phénomène de dégradation de la bactérie, il est possible que ces protéines interviennent dans la

IV. Résultats & discussion

préservation de l'intégrité des cellules de la plante qui subissent un dommage par le système immunitaire.

4. Necrotic and Ethylen inducing Protein (NEP) potentiellement requis dans le contrôle de l'immunité

La dernière partie du tableau 1, présente deux protéines (NEP et FOF1) qui sont accumulés dans les fractions WT et *symCRK*. NEP présente une plus forte accumulation chez *symCRK*. Cette protéine est retrouvée chez plusieurs pathogènes, elle est responsable de l'induction de la nécrose ainsi que de la stimulation de la voie de l'hormone immunitaire, l'éthylène⁵⁹. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette observation, la plus plausible est que le bacteroid secrète cette protéine afin de contrôler l'immunité de l'hôte.

5. Le symbiosome chez le WT accumule des protéines végétales associées au métabolisme

Afin d'identifier les protéines de plante agissant sur le bacteroid, nous avons cherché celle qui s'accumulées préférentiellement dans le symbiosome (voir méthode a et b, matériel & méthode). Le tableau 2 présente les résultats obtenus. On observe 48 protéines présentant une accumulation chez *symCRK* et le WT, dont 15 préférentiellement accumulées chez ce dernier. Une grande partie des protéines identifiées sont des oxydo/reductases et des protéases (tableau 2). Les oxydo/reductases interviennent dans la régulation du potentiel oxydant⁶⁰, alors que les protéases régulent la dégradation des protéines^{61,62}. Ces deux voies biochimiques sont importantes lors de la fixation d'azote, plusieurs études ont montrées que le contrôle de la production des ROS (qui résulte de l'oxydo-reduction) par le bacteroid est essentiel pour le maintien de l'activité nitrogénase^{63,64}. Il se peut que la plante via l'utilisation de ces protéines contrôle la fonction de l'enzyme au sein du bacteroid afin d'optimiser la fixation d'azote. La majorité des autres protéines accumulées interviennent dans des aspects différents du métabolisme et de l'adressage des protéines, ce qui appuie l'hypothèse du contrôle par l'hôte du métabolisme bacteroidien dans le but d'améliorer la fixation d'azote et va dans le sens des hypothèses émises par Udvardi & Pool⁵⁸.

IV. Résultats & discussion

Tableau 2. Protéines de plante enrichies en fraction du symbiosome chez WT et/ou *symCRK*. Les valeurs représentent la moyenne de détection des protéines issue de trois répétitions biologiques pour chaque condition. S : symbiosome, M : micrososome, C : cytosol. En **jaune** les protéines dont l'expression des gènes n'a pas pu être analysée.

		WT			SymCRK		
		S	M	C	S	M	C
Augementés dans les symbiosomes du WT							
Medtr2g029850.1	Peroxidase family protein	0,85	0,74	0,80	1,21	0,75	1,79
Medtr5g036600.1	Pyruvate dehydrogenase complex E1 alpha subunit	0,08	0,00	0,05	0,11	0,00	0,14
Medtr6g077820.1	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha-2	0,39	0,08	0,39	0,35	0,07	0,41
Medtr7g084850.1	Acetate-CoA ligase	0,05	0,00	0,04	0,03	0,00	0,06
Medtr3g055480.1	EF-hand pair protein	0,54	0,14	0,48	0,00	0,00	0,00
Medtr1g011880.1	Cytochrome B-c1 complex subunit 7	0,41	0,31	0,00	0,19	0,29	0,00
Medtr1g080820.1	Chitinase / Hevein / PR-4 / Wheatwin2	0,60	0,00	0,00	0,90	0,87	0,92
Medtr8g091660.1	Alanine-glyoxylate aminotransferase-like protein	0,04	0,00	0,04	0,06	0,00	0,14
Medtr7g090950.1	Eukaryotic-type carbonic anhydrase	0,18	0,13	0,09	0,00	0,00	0,00
Medtr7g079300.1	Subtilisin-like serine protease	0,10	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00
Medtr2g035440.1	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain protein	0,11	0,00	0,11	0,00	0,00	0,11
Medtr7g016060.1	NADH-ubiquinone reductase complex 1 MLRQ subunit	0,60	0,42	0,00	0,00	0,00	0,00
Medtr4g018750.1	Uncoupling protein	0,08	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00
Medtr4g103495.1	Subtilisin-like serine protease	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Medtr4g069200.1	Lipid transfer protein	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Augementés dans les symbiosomes de <i>symCRK</i>							
Medtr2g010020.1	Heat shock 70 kDa protein	0,29	0,05	0,33	0,20	0,00	0,16
Medtr4g092920.1	Heat shock 70 kDa protein	0,20	0,07	0,30	0,27	0,00	0,17
Medtr2g038260.1	Heat shock cognate 70 kDa-like protein	0,38	0,49	0,51	0,55	0,49	0,50
Medtr1g090140.1	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	0,47	0,71	0,56	0,66	0,45	0,57
Medtr1g090130.1	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	0,37	0,60	0,51	0,59	0,39	0,48
Medtr7g094460.1	GTP-binding elongation factor Tu family protein	0,12	0,04	0,19	0,18	0,04	0,10
Medtr5g022560.1	Papain family cysteine protease	0,75	0,80	0,94	0,85	0,72	0,75
Medtr6g043240.1	Peroxidase family protein	0,45	0,71	0,81	1,23	1,18	1,19
Medtr6g011390.1	Porin/voltage-dependent anion-selective channel protein	1,05	1,27	0,15	1,27	1,21	0,31
Medtr3g028590.1	ADP/ATP carrier protein	1,97	2,15	0,32	2,61	1,88	0,60
Medtr4g078545.1	ADP/ATP carrier protein	0,32	0,46	0,05	0,57	0,40	0,11
Medtr8g064170.1	NAD-dependent aldehyde dehydrogenase family protein	0,50	0,12	0,65	0,53	0,18	0,46
Medtr3g106160.1	Chaperone ClpB, putative	0,02	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02
Medtr7g050870.1	Pectinesterase/pectinesterase inhibitor	0,04	0,16	0,44	0,50	0,29	0,50
Medtr1g030275.1	GDSL-like lipase/acylhydrolase	0,26	0,23	0,57	0,18	0,17	0,13
Medtr3g065130.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit	0,20	0,29	0,00	0,28	0,22	0,00
Medtr4g078200.1	Prohibitin complex protein	0,42	0,48	0,00	0,46	0,15	0,00
Medtr7g114040.1	Histone H2A 6	0,18	0,29	0,19	0,86	0,52	0,00
Medtr2g096610.1	Core histone H2A/H2B/H3/H4	0,75	0,79	0,96	1,64	0,74	0,00
Medtr7g108320.1	Histone H2A 6	0,17	0,21	0,19	0,93	0,58	0,00
Medtr2g096570.1	Core histone H2A/H2B/H3/H4	0,75	0,95	0,96	1,48	0,92	0,00
Medtr4g063410.1	Core histone H2A/H2B/H3/H4	0,60	0,74	0,96	1,48	0,68	0,00
Medtr7g113160.1	Histone H2A 6	0,00	0,00	0,32	0,60	0,00	0,00
Medtr8g086070.1	Dicarboxylate carrier protein	0,43	0,54	0,00	0,53	0,47	0,00
Medtr8g018770.1	Long form dihydrolipoamide acetyltransferase	0,15	0,30	0,11	0,22	0,17	0,07
Medtr6g079630.1	Chitinase	0,26	0,27	0,56	0,47	0,21	0,38
Medtr5g020050.1	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit	0,42	0,71	0,14	0,78	0,36	0,17
Medtr7g083790.1	Phosphate carrier protein	0,30	0,37	0,00	0,56	0,33	0,08
Medtr3g089005.1	Basic blue-like protein	1,52	0,74	1,64	0,26	0,00	0,23
Medtr4g076100.1	Gamma-aminobutyrate transaminase	0,18	0,00	0,28	0,41	0,00	0,32
Medtr3g008250.1	Prohibitin complex protein	0,36	0,52	0,00	0,41	0,17	0,00
Medtr7g074090.1	Transmembrane protein, putative	0,00	0,21	0,00	0,16	0,16	0,00
Medtr2g005690.1	70 kDa heat shock protein	0,00	0,08	0,35	0,29	0,00	0,22
Medtr4g063200.1	Core histone H2A/H2B/H3/H4	1,35	1,61	0,00	3,91	2,43	0,40
Medtr3g462950.1	Thiamine biosynthesis protein ThiC	0,04	0,00	0,17	0,04	0,00	0,04
Medtr4g057600.1	Serine carboxypeptidase-like protein	0,06	0,04	0,09	0,05	0,00	0,00

IV. Résultats & discussion

Medtr0036s0110.1	Eukaryotic aspartyl protease family protein	0,25	0,28	0,30	0,38	0,00	0,26
Medtr8g102230.1	Processing peptidase	0,28	0,37	0,00	0,27	0,23	0,00
Medtr4g007840.1	60S ribosomal protein L23a, putative	0,00	1,00	0,48	0,49	0,43	0,00
Medtr2g006820.1	2-oxoacid dehydrogenase acyltransferase family protein	0,20	0,27	0,11	0,18	0,13	0,13
Medtr8g092040.1	ATP synthase	0,23	0,43	0,15	0,34	0,29	0,08
Medtr6g023230.1	Cytochrome c1, heme protein	0,30	0,35	0,00	0,39	0,16	0,00
Medtr1g069455.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 39 kDa subunit	0,26	0,32	0,00	0,25	0,20	0,00
Medtr1g042300.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 51 kDa subunit	0,19	0,23	0,00	0,21	0,06	0,00
Medtr8g097320.1	Carboxy-terminal region remorin	0,44	0,97	0,00	0,27	0,18	0,00
Medtr8g097320.2	Carboxy-terminal region remorin	0,39	0,85	0,00	0,24	0,16	0,00
Medtr1g110510.1	S1/P1 nuclease family protein	0,20	0,12	0,81	0,12	0,00	0,07
Medtr1g087900.1	Fumarate hydratase	0,12	0,05	0,29	0,23	0,04	0,19
Medtr6g007160.1	Transmembrane protein, putative	0,35	0,67	0,00	0,81	0,62	0,16
Medtr1e116500.1	2-isopropylmalate synthase	0,00	0,00	0,24	0,25	0,03	0,15
Medtr2g008620.1	Beta-hydroxyacyl-ACP dehydratase	0,14	0,25	0,18	0,21	0,20	0,15
Medtr7g118060.1	60S acidic ribosomal protein	0,00	1,78	0,81	1,43	1,32	0,85
Medtr8g087710.1	Major intrinsic protein (MIP) family transporter	0,56	0,89	0,00	0,19	0,00	0,00
Medtr0212s0080.1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein	0,15	0,28	0,00	0,23	0,13	0,00
Medtr2g018290.1	Serine transhydroxymethyltransferase	0,00	0,04	0,26	0,13	0,00	0,07
Medtr2g030370.1	GTP-binding protein	0,00	0,05	0,31	0,05	0,03	0,00
Medtr8g463890.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motif) family protein	0,00	0,00	0,13	0,28	0,18	0,00
Medtr5g091710.1	Tropomyosin-like protein, putative	0,11	0,40	0,00	0,31	0,29	0,00
Medtr4g036300.1	Ripening related protein family	0,32	0,46	0,84	1,39	0,54	0,52
Medtr5g072570.1	Serine carboxypeptidase-like protein	0,15	0,10	0,26	0,15	0,13	0,10
Medtr2g034580.1	Dihydrolipoamide dehydrogenase	0,00	0,45	0,34	0,26	0,00	0,23
Medtr5g020850.1	Gamma carbonic anhydrase-like protein	0,22	0,24	0,00	0,27	0,17	0,00
Medtr5g053950.1	Allene oxide cyclase	0,00	0,06	0,12	0,22	0,15	0,17
Medtr3g112020.1	Gamma carbonic anhydrase-like protein	0,09	0,30	0,00	0,13	0,07	0,00
Medtr1g022405.1	Gamma carbonic anhydrase-like protein	0,00	0,11	0,00	0,10	0,06	0,00
Medtr5g040960.1	Ribonuclease T2 family protein	0,15	0,17	0,47	0,16	0,00	0,15
Medtr8g009960.1	NADH:ubiquinone oxidoreductase 17.2 kDa subunit	0,21	0,23	0,00	0,28	0,21	0,00
Medtr2g093280.1	Carbamoyl-phosphate synthase large chain	0,00	0,00	0,09	0,05	0,00	0,05
Medtr7g083870.1	Short-chain dehydrogenase/reductase	0,08	0,00	0,12	0,30	0,00	0,12
Medtr2g026500.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase complex I,	0,34	0,43	0,00	0,48	0,39	0,00
Medtr8g023780.1	Inactive purple acid phosphatase-like protein	0,00	0,00	0,41	0,40	0,00	0,38
Medtr4g103790.1	NOP56-like pre RNA processing ribonucleoprotein	0,04	0,04	0,00	0,10	0,07	0,00
Medtr7g066870.1	Acetyl-CoA carboxylase, carboxyl transferase, alpha subunit	0,00	0,03	0,05	0,05	0,04	0,00
Medtr4g088350.1	Triose phosphate/phosphate translocator	0,00	0,75	0,00	0,85	0,57	0,00
Medtr2g103360.1	Embryo-specific protein	0,25	0,31	0,00	0,16	0,00	0,00
Medtr8g087720.1	Major intrinsic protein (MIP) family transporter	0,24	0,61	0,00	0,19	0,00	0,00
Medtr2g100270.1	PRA1 (prenylated RAB acceptor) family protein	0,00	0,40	0,00	0,37	0,29	0,00
Medtr3g117550.1	NADH ubiquinone oxidoreductase B22-like subunit	0,19	0,36	0,00	0,29	0,11	0,00
Medtr7g088370.1	Histone-lysine N-methyltransferase	0,00	0,00	0,05	0,10	0,03	0,00
Medtr1g080990.1	MtN26	0,00	0,42	0,00	0,91	0,70	0,87
Medtr5g034820.1	Threonyl-tRNA synthetase/threonine-tRNA ligase, putative	0,00	0,06	0,02	0,02	0,00	0,02
Medtr8g093860.1	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase	0,00	0,00	0,21	0,14	0,00	0,12
Medtr2g014460.1	Glycogen/starch/alpha-glucan phosphorylase family	0,00	0,02	0,05	0,02	0,02	0,02
Medtr5g062430.1	Glycoside hydrolase family 3 protein	0,00	0,00	0,02	0,07	0,02	0,02
Medtr6g079520.1	Linker histone H1 and h5 family protein	0,00	0,00	0,00	0,22	0,14	0,00
Medtr8g101880.1	ATP synthase G subunit family protein	0,26	0,35	0,00	0,39	0,00	0,00
Medtr4g051270.1	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain domain	0,00	0,11	0,00	0,08	0,07	0,00
Medtr3g118110.1	Mago nashi family, integral exon junction complex protein	0,00	0,07	0,10	0,08	0,07	0,00
Medtr1g044720.1	Pre-mRNA-processing factor	0,00	0,00	0,07	0,10	0,00	0,00
Medtr3g084040.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motif) family protein	0,00	0,00	0,52	1,04	0,00	0,61
Medtr8g017080.1	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	0,00	0,00	0,03	0,05	0,03	0,03
Medtr5g057990.1	Alpha-glucosidase	0,00	0,08	0,00	0,06	0,02	0,00
Medtr3g011440.1	Histone-lysine N-methyltransferase	0,00	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00
Medtr7g080803.1	Cytochrome protein C	0,00	0,18	0,21	0,14	0,00	0,00
Medtr3g031380.1	Malonyl CoA-acyl carrier transacylase	0,00	0,00	0,12	0,06	0,00	0,00
Medtr2g014360.1	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein	0,00	0,00	0,17	0,12	0,00	0,00
Medtr5g044270.1	PPR containing plant protein	0,04	0,00	0,05	0,09	0,00	0,00
Medtr2g067660.1	Succinate-semialdehyde dehydrogenase	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,04

IV. Résultats & discussion

Augementés dans les symbiosomes du WT et de *symCRK*

Medtr1g108765.1	FOF1-type ATP synthase, beta subunit	1,34	1,17	0,49	1,48	0,94	0,76
Medtr0002s0650.1	FOF1-type ATP synthase, beta subunit	0,21	0,15	0,09	0,18	0,08	0,04
Medtr8g036880.1	ADP/ATP carrier protein	0,45	0,41	0,07	0,53	0,32	0,16
Medtr2g098070.1	ADP/ATP carrier protein	0,25	0,18	0,00	0,27	0,13	0,05
Medtr0212s0040.1	ATP synthase F1, alpha subunit	0,63	0,62	0,23	0,79	0,45	0,27
Medtr7g023770.1	E1 subunit-like 2-oxoglutarate dehydrogenase	0,32	0,22	0,06	0,32	0,15	0,05
Medtr7g053330.1	Processing peptidase	0,39	0,31	0,04	0,37	0,23	0,03
Medtr2g082220.1	Histone H2A 6	0,43	0,26	0,24	1,11	0,56	0,00
Medtr1g011750.1	Core histone H2A/H2B/H3/H4	0,30	0,00	0,24	0,61	0,41	0,00
Medtr4g129790.1	FOF1 ATP synthase subunit gamma	0,40	0,35	0,06	0,50	0,31	0,06
Medtr7g005380.1	Pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit	0,56	0,13	0,51	0,77	0,09	0,66
Medtr3g087950.1	Gamma-glutamyltranspeptidase	0,53	0,19	0,32	0,12	0,09	0,00
Medtr1g064070.1	NAD-dependent isocitrate dehydrogenase	0,48	0,12	0,44	0,33	0,06	0,31
Medtr3g028730.1	FOF1-type ATP synthase, delta subunit	0,47	0,38	0,14	0,41	0,19	0,13
Medtr8g074030.1	NAD-dependent isocitrate dehydrogenase	0,37	0,06	0,28	0,30	0,05	0,30
Medtr2g096100.1	Histone H4 domain protein	0,88	0,68	0,37	1,50	0,74	0,28
Medtr1g095830.1	ATP synthase D chain	0,63	0,49	0,18	0,79	0,38	0,19
Medtr5g026620.1	Ubiquinol oxidase 1a	0,29	0,20	0,00	0,06	0,05	0,00
Medtr2g030470.1	Stress up-regulated Nod 19 protein	0,06	0,04	0,00	0,16	0,10	0,03
Medtr4g130800.1	Plastocyanin-like domain protein	0,24	0,00	0,00	0,51	0,35	0,12
Medtr1g019810.1	Succinate dehydrogenase	0,28	0,21	0,00	0,16	0,08	0,00
Medtr7g084150.1	Cytochrome B-c1 complex subunit Rieske protein	0,21	0,15	0,00	0,26	0,16	0,07
Medtr4g130780.1	Early nodulin-like protein	1,00	0,76	0,42	0,49	0,39	0,33
Medtr8g008870.1	FOF1-type ATP synthase, epsilon subunit	0,41	0,32	0,00	0,21	0,17	0,00
Medtr0018s0260.1	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit	0,19	0,12	0,07	0,14	0,10	0,07
Medtr8g096820.1	Gamma carbonic anhydrase-like protein	0,19	0,16	0,00	0,22	0,07	0,00
Medtr6g053280.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase, putative	0,14	0,07	0,00	0,20	0,10	0,00
Medtr8g040150.1	NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 6	0,26	0,22	0,00	0,10	0,00	0,00
Medtr8g095220.1	Zn-dependent alcohol dehydrogenase family protein	0,12	0,00	0,12	0,13	0,00	0,06
Medtr7g096280.1	Linker histone H1 and h5 family protein	0,43	0,00	0,00	0,53	0,22	0,00
Medtr7g104570.1	Ubiquinol-cytochrome C reductase	0,26	0,17	0,00	0,38	0,00	0,00
Medtr1g091037.1	Long form dihydrolipoamide acetyltransferase	0,08	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00
Medtr8g088580.1	Leucine zipper EF-hand transmembrane protein	0,09	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00

6. Plusieurs nodulines accumulées au sein du symbiosome

L'analyse a révélé la présence de plusieurs nodulines s'accumulant préférentiellement au sein du symbiosome du WT et/ou de *symCRK* (tableau 2). Cette famille de gènes spécifique des légumineuses est exprimée lors de la symbiose⁵⁸. Les nodulines sont impliquées dans le contrôle de différents aspects de l'interaction symbiotique⁶⁵. Trois nodulines sont accumulées chez le WT et/ou *symCRK*: MtN26, early noduline like dont les fonctions exacte ne sont pas encore caractérisés dans la symbiose et stress up regulated nod 19, cette dernière est impliquée notamment dans la régulation des ROS au cours de la symbiose⁶⁸.

IV. Résultats & discussion

7. Le symbiosome de *symCRK* accumule une quantité importante de protéines végétales

L'étude indique la présence de 98 protéine s'accumulées dans le symbiosome de *symCRK* (tableau 2). Ce résultat montre que chez le mutant une grande quantité de protéines de l'hôte se retrouve dans le symbiosome, une partie d'entre elles intervient dans le métabolisme, certaines sont impliquées dans l'immunité, telle que la chitinase qui dégrade des oligo-GlcNAc des parois fongiques et bactérienne⁶⁶. Il est important de noter, que chez le WT une autre chitinase (PR4) est accumulé de manière importante (tableau 2), ce qui souligne l'importance de cette famille au cours de la symbiose temps dans un contexte sauvage que mutant. Enfin une papain cystéine protéase est présente en plus grand quantité dans le symbiosome de *symCRK* (tableau 2), ces protéines interviennent dans le recyclage des composés lors de la sénescence des nodosités⁶¹. Ce résultat est cohérent avec le phénotype du mutant qui présente une dégradation des tissus de la nodosité⁴⁶.

8. Les gènes accumulés dans le symbiosome de WT présente une expression différentielle

Dans un second temps nous avons cherché à déterminer le pattern d'expression des gènes correspondants aux protéines préférentiellement accumulées dans les symbiosomes (issues des méthodes a et b). Les données du transcriptome issu de l'article de Roux et al ont été exploitées⁵¹, elle présente l'expression des gènes au sein de différentes zones de la nodosité sauvage (voir matériel & méthode). Pour la quasi-totalité des protéines (sauf pour les protéines soulignées en orange dans le tableau 2) nous avons pu analyser l'expression des gènes. Le graphe 1 présente les résultats obtenus. On observe une expression hétérogène des gènes, selon le pattern d'expression on distingue cinq classes, la première présente des gènes préférentiellement exprimés dans le méristème, la seconde au sein de laquelle les gènes sont exprimés de manière proche dans le méristème et la zone d'infection, la troisième dont les gènes sont exprimés préférentiellement en inter zone (séparant la zone II et la zone III) et zone II distale. La quatrième classe inclue des gènes exprimés de manière importante en zone d'infection et de fixation d'azote, enfin la dernière classe présente des gènes avec une forte expression au sein de la zone de fixation, l'inter-zone et la zone d'infection distale. La chitinase (Medtr1g080820.1) et substilisine-like serine protéase (Medtr4g103495.1 et Medtr7g079300.1) accumulées dans la fraction symbiosome du WT sont classées dans la cinquième groupe de gènes avec une forte expression en zone d'infection proximale. Ces protéines interviennent dans la réponse immunitaire des plantes (chitinase)⁶⁶ ou participent dans la virulence des pathogènes bactériens (substilisine)⁶⁷, une hypothèse est que chez le WT certaines protéines

IV. Résultats & discussion

immunitaires/virulence sont requises dans la zone d'infection probablement pour contrôler les niveaux de colonisation du tissu par les rhizobia. Ces résultats constituent la première observation réelle de ce phénomène et contredit les théories actuelles stipulant l'absence d'expression de gènes immunitaires non-NCR au sein des nodosités fonctionnelles^{9,42}.

9. *symCRK* présente des protéines préférentiellement exprimées au sein du méristème et en zone d'infection distale

L'analyse de l'expression des gènes correspondant aux protéines accumulées au sein du symbiosome de *symCRK* indique que le profil est hétérogène avec des classes ayant des patterns d'expression différents (figure 7). L'analyse de la répartition des gènes codant les protéines identifiées montre qu'une grande partie (53%) des gènes de *symCRK* sont préférentiellement exprimés en zone meristématique et zone d'infection distale contre seulement 35% chez le WT (graphe 1 et figure 7a, 7b). Ces résultats sont cohérents avec le phénotype de *symCRK* qui présente un avortement précoce du processus symbiotique, il en résulte la formation de nodosités dépourvues de zone de fixation⁴⁹. La chitinase (Medtr6g079630.1) et la papain cystéine protéase (Medtr5g022560.1) accumulés chez *symCRK* sont normalement exprimés chez le WT au sein de la zone III (figure 7c), le mutant étant dépourvu de cette zone, ce résultat indique une modification du pattern d'expression de ces gènes, il est possible que le phénotype de *symCRK* résulte en partie d'une induction précoce de gènes impliqués dans l'immunité et la sénescence.

IV. Résultats & discussion

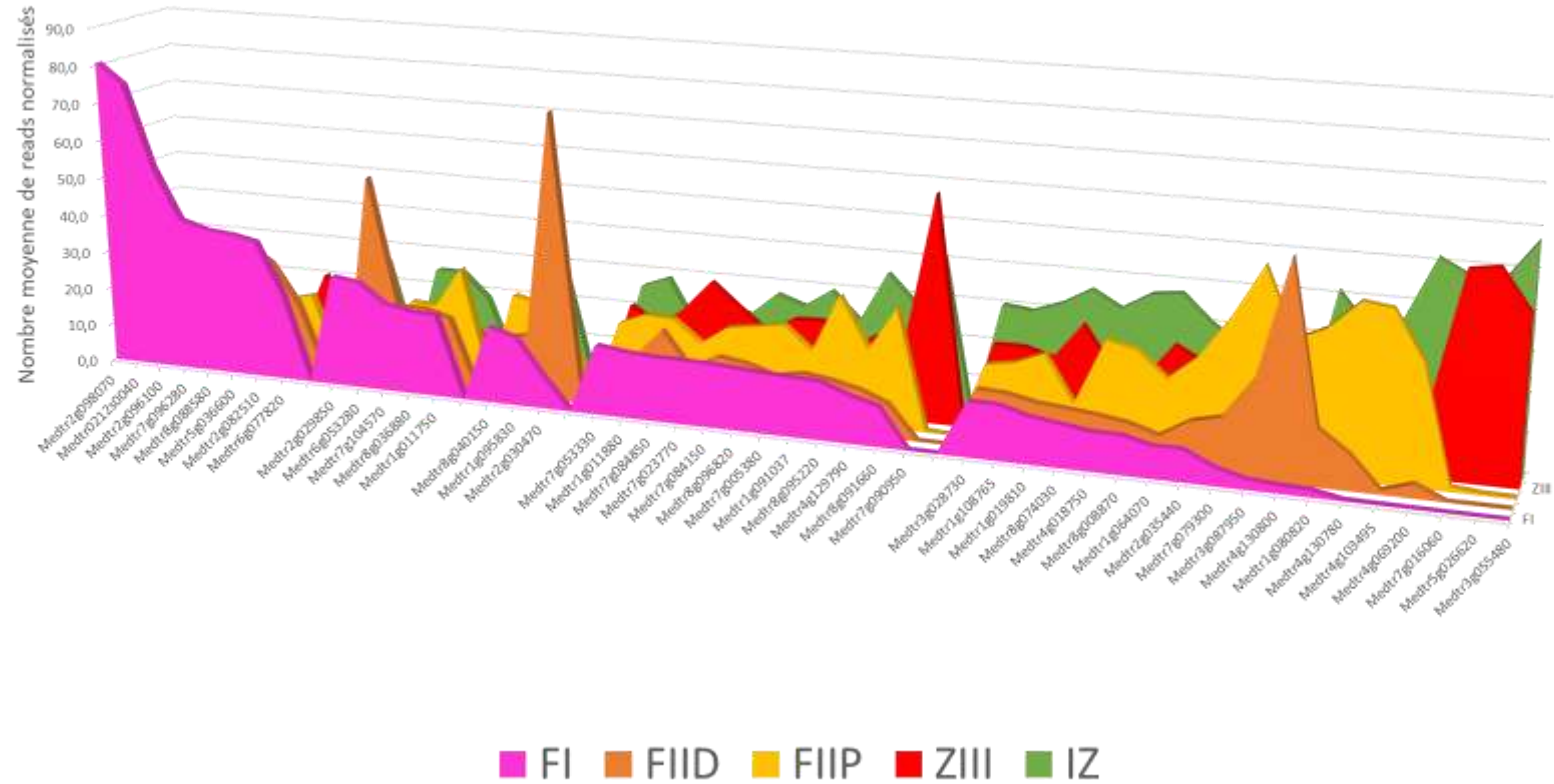


Figure 7. Expression des gènes dont les protéines sont accumulées dans le symbiosome du WT. Le graphe présente l'expression moyenne chez le WT des gènes sous forme de nombre de reads (séquence de lecture RNAseq) normalisés. FI : méristème, FII (D-P) : zone d'infection, ZIII : zone de fixation d'azote, IZ : zone séparant la zone d'infection et la zone de fixation. Données issues de ⁵¹

Partie III. Résultats & discussion

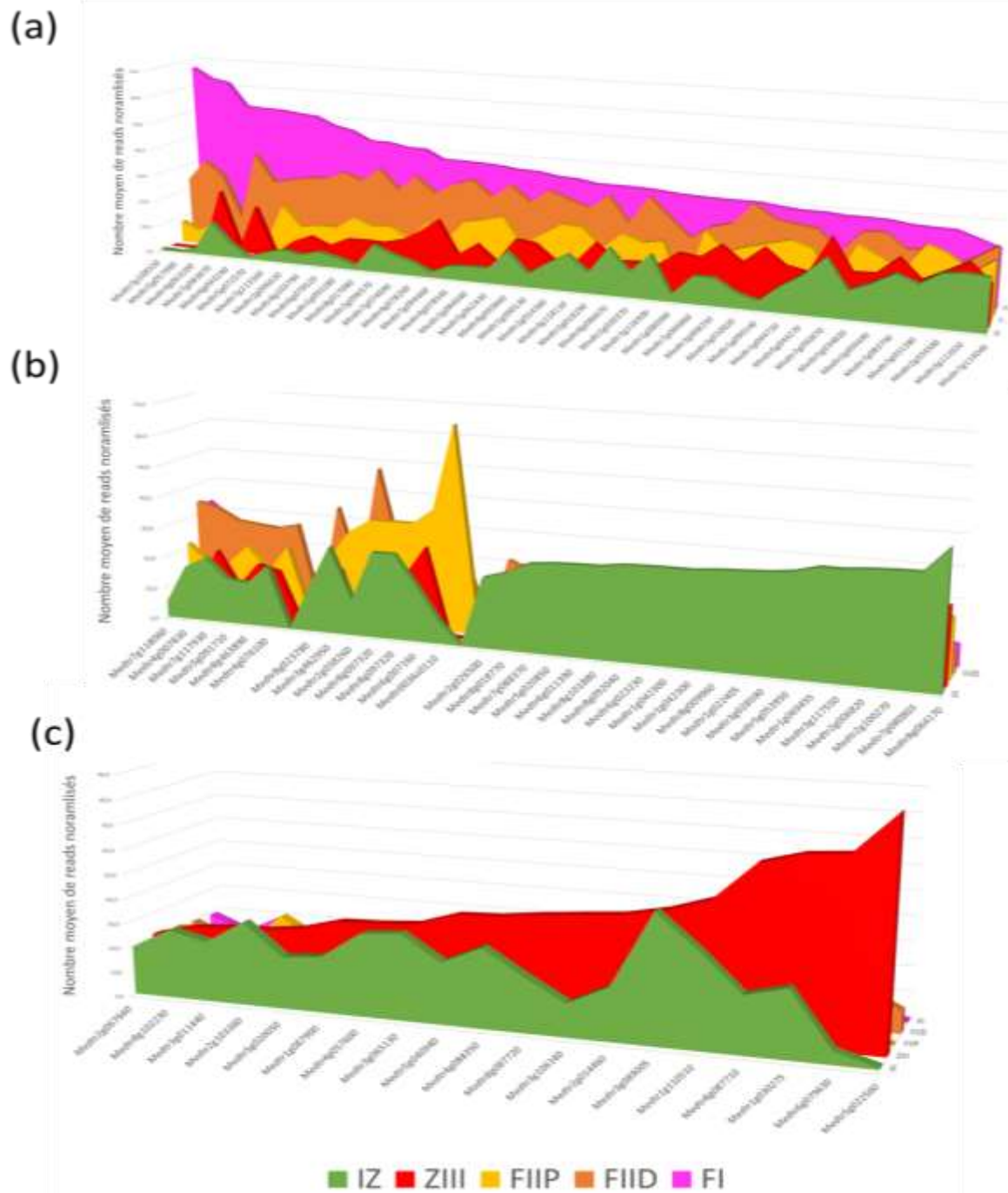


Figure 8. Expression des gènes correspondant aux protéines accumulées dans le symbiosome de *symCRK*. (a) Gènes préférentiellement exprimés en FI, (b) Gènes préférentiellement exprimés dans les zones d'infection (IZ, FIID et FIIP) et (c) Gènes préférentiellement exprimés en IZ et ZIII. Le graphe présente l'expression moyenne des gènes chez le WT sous forme de nombre de reads (séquences de lecture RNAseq) normalisés. FI : méristème, FII (D-P) : zone d'infection, ZIII : zone de fixation d'azote, IZ : zone séparant la zone d'infection et la zone de fixation. Données issues de Roux et al⁵¹.

Partie III. Résultats & discussion

10. Identification des protéines d'adressage modifié entre WT et *symCRK*

La dernière approche utilisée lors de nos recherches consisté à identifier les protéines qui présentent un inversement ou une modification de localisation au sein des fractions entre la plante WT et *symCRK* (voir méthode d, matériel & méthode). Le tableau 3 présente les types de comparaisons réalisés ainsi que le nombre de protéines identifiées. Trois types de comparaisons ont été effectuées : **i)** la première consiste à comparer une fraction d'un génotype contre une fraction du second génotype, **ii)** la seconde compare deux fractions d'un génotype contre une fraction du second génotype, **iii)** enfin dans le troisième type nous comparons trois fractions d'un génotype contre une fraction du second génotype. Lors de l'analyse 98 protéines sont identifiées comme présentant une modification de répartition au sein des différentes fractions entre le WT et *symCRK*, dont 24 qui présentes un inversement de fraction. Ces résultats indiquent que la modification de répartition des protéines s'ajoute aux phénomènes décrits précédemment ; ainsi le phénotype de *symCRK* résulte de plusieurs types de modifications dont la modification de répartition des protéines entre les différentes fractions cellulaires.

11. Nature des protéines inversées

Les protéines présentant des modifications de répartition de fraction entre WT et *symCRK* sont présentées en tableau S3 de l'annexe. On observe que 19 protéines présentes un changement de localisation entre le cytosol, le micrososome du WT et de *symCRK*, deux sont retrouvées dans le micrososome du WT et sont présent uniquement dans le cytosol de *symCRK* (Medtr6g065670.1, Medtr1g102650.1), alors que les 17 autres présentes l'inverse (voir tableau S3), ces protéines correspondes à des facteurs impliqués dans la régulation traductionnelle et post traductionnelle, dans l'adressage des protéines et la fusion membranaire. A cela s'ajoute 5 protéines retrouvées dans le cytosol du WT et le symbiosome de *symCRK* (tableau S3). Ces protéines correspondent essentiellement à des protéines de modification d'histone et de transport. La modification de la localisation des protéines identifiées peut changer leurs activités, donc il est fort possible qu'une partie des dysfonctionnements observés chez le mutant *symCRK* résulte de l'inversement de la répartition de certain protéines clés dans la traduction, le transport et la signalisation des nodosités sauvage.

Partie III. Résultats & discussion

Tableau 3. Nombre de protéine dont la répartition est modifiée entre le WT et *symCRK*.

Trois type de comparaisons sont réalisées : i) une fraction du génotype a (WT, *symCRK*) contre une fraction du génotype b (*symCRK*, WT), ii) deux fractions du génotype a contre une fraction du génotype b, iii) trois fractions du génotype a contre une fraction du génotype b. Nbe Prot : nombre de protéines.

Fraction WT	Fraction <i>symCRK</i>	Nbe Prot. identifiées
Symbiosome	Microsome	0
Symbiosome	Cytosole	0
Microsome	Cytosole	2
Microsome	Symbiosome	0
Cytosol	Symbiosome	5
Cytosol	Microsome	17
Symbiosome/microsome	Cytosol	0
Microsome/cytosole	Symbiosome	1
Symbiosome/cytosole	Microsome	0
Cytosole	Symbiosome/microsome	5
Symbiosome	Microsome/cytosol	0
Microsome	Symbiosome/cytosol	0
Symbiosome/cytosole/microsome	Symbiosome	1
Symbiosome/cytosole/microsome	Microsome	1
Symbiosome/cytosole/microsome	Cytosol	6
Symbiosome	Symbiosome/cytosol/microsome	2
Microsome	Symbiosome/cytosol/microsome	28
Cytosole	Symbiosome/cytosol/microsome	30

V. Conclusion

Nos résultats ont permis d'apporter des éléments supplémentaires quant aux échanges qui ont lieu entre *M. truncatula* et *S. medicae*, ainsi la plante semble contrôler le métabolisme, l'état redox, la survie des bactéries via l'envoi de protéines telles que les subtilisines et des nodulines. La bactérie quant à elle envoie des protéines impliquées dans le métabolisme, l'oxydoréduction, la signalisation, le contrôle des phospholipides et l'immunité. Plusieurs modifications mènent aux phénomènes observés chez le mutant *symCRK* : la production de protéines spécifique (figure 8, (i)) telle que des protéines de défense, l'accumulation de certaines protéines par rapport au WT (figure 8, (ii)), l'absence d'expression de gènes importants pour le processus (figure 8, (iii)), la modification d'expression de gènes (figure 8, (iv)) qui sont normalement produits en zone III chez le WT, alors que le mutant est incapable de former cette zone. Enfin, un changement de répartition des protéines au sein des cellules chez *symCRK* est observé par rapport au WT (figure 8, (v)).

Plusieurs aspects restent encore à explorer, une confirmation des observations réalisées lors de l'analyse doit être réalisée par l'utilisation d'approche fonctionnelle, tel que la fusion traductionnelle afin de confirmer l'adressage des protéines et l'analyse d'expression de gènes par RT-qPCR (Reverse transcription quantitative Polymerase Chain Reaction). L'identification de mutants de gènes transcrits spécifiquement chez le WT ou *symCRK* doit être réalisée afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans le processus de symbiose. Enfin une analyse bibliographique plus poussée permettra d'apporter des précisions supplémentaires quant aux protéines isolées.

V. Conclusion

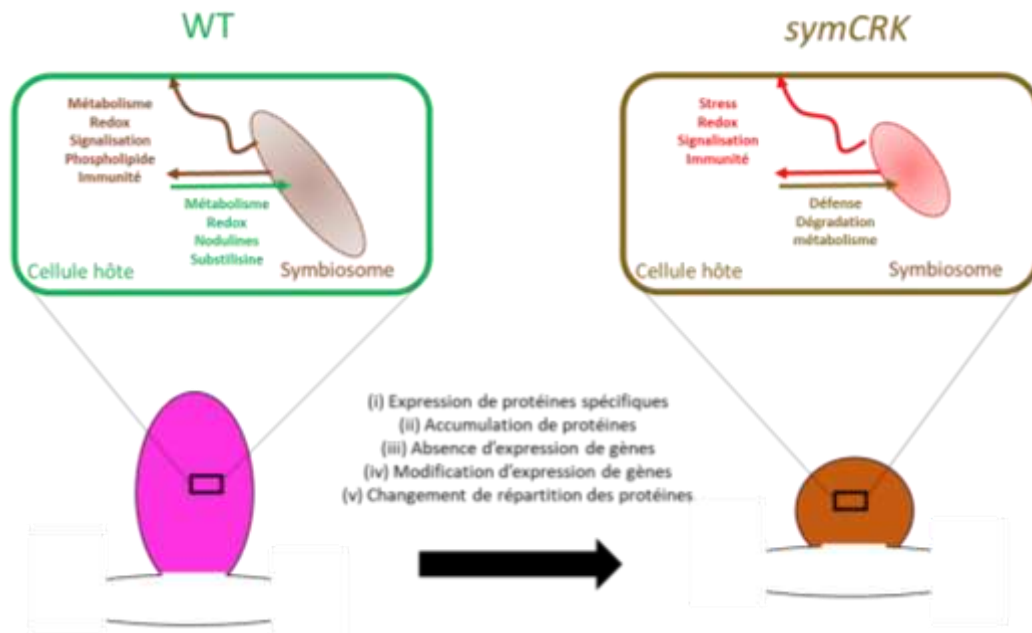


Figure 9. Fonctions influencées par les partenaires symbiotiques et modifications expliquant le phénotype du mutant *symCRK*. Le WT forme des nodosités roses fixatrices d'azote, le mutant forme des nodosités nécrotiques non-fixatrices d'azote. Plusieurs protéines sont produites par la plante, adressées vers le symbiosome et inversement, elles sont impliquées dans différents processus. Le phénotype de *symCRK* peut être expliqué par (i) l'expression de protéines spécifiques, (ii) l'accumulation de protéines, (iii) l'absence d'expression de gènes, (iv) la modification d'expression de gènes et (v) le changement de répartition des protéines au sein de la cellule.

VI. Bibliographie

1. Berrabah F. Contrôle symbiotique de l'immunité au cours des étapes tardives de la symbiose *Medicago-Sinorhizobium*. Thèse doctorat, Paris Saclay, 2016.
2. Boivin S, Fonouni-farde C, Frugier F. How Auxin and Cytokinin Phytohormones Modulate Root Microbe Interactions. 2016;7(August):1-12. doi:10.3389/fpls.2016.01240.
3. Genin S. Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytol.* 2010;(August):920-928.
4. Sevellec M. les différents microbiotes de l'holobionte grand coregone (*Coregonus Clupeaformis*) dans un contexte de spéciation. 2018.
5. Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA. The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *Annu Rev Genet.* 2011;45(1):119-144. doi:10.1146/annurev-genet-110410-132549.
6. Smith DL, Praslickova D, Ilangumaran G. Inter-organismal signaling and management of the phytomicrobiome. 2015;6(September):1-6. doi:10.3389/fpls.2015.00722.
7. Cook DE, Mesarich CH, Thomma BPHJ. Understanding Plant Immunity as a Surveillance System to Detect Invasion. 2015. doi:10.1146/annurev-phyto-080614-120114.
8. Kang Y, Li M, Sinharoy S, Verdier J. A Snapshot of Functional Genetic Studies in *Medicago truncatula*. 2016;7(August). doi:10.3389/fpls.2016.01175.
9. Gourion B, Berrabah F, Ratet P, Stacey G. Rhizobium – legume symbioses : the crucial role of plant immunity. *Trends Plant Sci.* 2015;20(3):186-194. doi:10.1016/j.tplants.2014.11.008.
10. Moling S, Pietraszewska-bogiel A, Postma M, et al. Nod Factor Receptors Form Heteromeric Complexes and Are Essential for Intracellular Infection in *Medicago* Nodules. 2014;26(October):4188-4199. doi:10.1105/tpc.114.129502.
11. Monaghan J, Zipfel C. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr Biol.* 2012;15:349-357.

VI. Bibliographie

12. Bessis A. Microbial priming of plant and animal immunity: symbionts as developmental signals. 2014;22(11):607-613. doi:10.1016/j.tim.2014.07.003.
13. Schwessinger B, Ronald PC. Plant Innate Immunity: Perception of Conserved Microbial Signatures. 2012. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105518.
14. Lakshmanan V, Kitto SL, Caplan JL, et al. Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMPs)-triggered root responses mediate beneficial rhizobacterial recruitment in. 2012. doi:10.1104/pp.112.200386.
15. Choi HW, Klessig DF. DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biol.* 2016;1-10. doi:10.1186/s12870-016-0921-2.
16. Kietzman C, Tuomanen E. PGRPs kill with an ancient weapon. 2011;17(6):665-666.
17. Tirichine L, Imaizumi-Anraku H, Yoshida S, et al. Deregulation of a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature.* 2006;441(7097):1153-1156. doi:10.1038/nature04862.
18. Tsuda K, Glazebrook J, Katagiri F. The interplay between MAMP and SA signaling. 2008;(June):359-361.
19. Qi J, Wang J, Gong Z, Zhou J. Apoplastic ROS signaling in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol.* 2017;38:92-100. doi:10.1016/j.pbi.2017.04.022.
20. Ryu H, Laffont C, Frugier F, Hwang I. Molecules and Cells Minireview MAP Kinase-Mediated Negative Regulation of Symbiotic Nodule Formation in *Medicago truncatula*. 2017;40(1):17-23.
21. Belkhadir Y, Yang L, Hetzel J, Dangl JL, Chory J. The growth – defense pivot: crisis management in plants mediated by LRR-RK surface receptors. *Trends Biochem Sci.* 2014;39(10):447-456. doi:10.1016/j.tibs.2014.06.006.
22. Palmer AG, Mukherjee A, Stacy DM, Lazar S, Anø M, Blackwell HE. Interkingdom Responses to Bacterial Quorum Sensing Signals Regulate Frequency and Rate of Nodulation in Legume – Rhizobia Symbiosis. 2016;53706:1-8. doi:10.1002/cbic.201600373.

VI. Bibliographie

23. Vera G, Silke R. Breaking the Barriers : Microbial Effector Molecules Subvert Plant Immunity. 2008.doi:10.1146/annurev.phyto.46.120407.110050.
24. Yasuda M, Miwa H, Masuda S, Takebayashi Y, Sakakibara H, Okazaki S. Effector-Triggered Immunity Determines Host Genotype-Specific Incompatibility in Legume – Rhizobium Symbiosis. 2016;57(June):1791-1800. doi:10.1093/pcp/pcw104.
25. Kale SD, Tyler BM. Microreview Entry of oomycete and fungal effectors into plant and animal host cells. 2011;13(August):1839-1848. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01659.x.
26. Sekhwal MK, Li P, Lam I, Wang X, Cloutier S. Disease Resistance Gene Analogs (RGAs) in Plants. 2015:19248-19290. doi:10.3390/ijms160819248.
27. JDG J, JL D. The plant immune system. *Nature*. 2006;444:323-329.
28. Giroux M, Audesse P. Comparaison de deux méthodes de détermination des teneurs en carbone organique , en azote total et du rapport C / N de divers amendements organiques et engrais de ferme. *Agrosol*. 2004;15(418):107-110. http://www.irda.qc.ca/assets/documents/Publications/documents/giroux-audesse-2004_article_methodes_dosage_c_n_amend_org.pdf.
29. Heaton T. Isotopic studies of nitrogen pollution in the hydrosphere and atmosphere. *Chim Geol Isot Geosceience Sect*. 1986;59:87-102.
30. Garcia M, Be G, Ii M, Tropicales S. Partner choice in *Medicago Truncatula* – *Sinorhizobium* symbiosis. 2010;(March):1947-1951. doi:10.1098/rspb.2009.2072.
31. Berrabah F, Ratet P, Gourion B. Multiple steps control immunity during the intracellular accommodation of rhizobia. *J Exp Bot*. 2015;66(7):1977-1985. doi:10.1093/jxb/eru545.
32. Suzaki T, Yoro E. *Leguminous Plants : Inventors of Root Nodules to Accommodate Symbiotic Bacteria*. Vol 316. Elsevier Ltd; 2015. doi:10.1016/bs.ircmb.2015.01.004.
33. Limpens E, Franken C, Smit P, Willemse J, Bisseling T, Geurts R. LysM

VI. Bibliographie

- Domain Receptor Kinases Regulating Rhizobial Nod Factor-Induced Infection. *Science (80-)*. 2003;302(5645):630-633. doi:10.1126/science.1090074.
34. Gamas P, Brault M, Jardinaud M, Frugier F. Cytokinins in Symbiotic Nodulation: When , Where , What For? *Trends Plant Sci.* 2017;xx:1-11. doi:10.1016/j.tplants.2017.06.012.
 35. Nishida H, Tanaka S, Handa Y, et al. control of root nodule symbiosis in *Lotus japonicus*. *Nat Commun.* (2018). doi:10.1038/s41467-018-02831-x.
 36. Liu J, Yang S, Zheng Q, Zhu H. Identification of a dominant gene in *Medicago truncatula* that restricts nodulation by *Sinorhizobium meliloti* strain Rm41. 2014;14(1):1-9. doi:10.1186/1471-2229-14-167.
 37. Berrabah F, Hosseyn E, Salem A, Garmier M, Ratet P. Chapter 16. 2018;1822. doi:10.1007/978-1-4939-8633-0.
 38. Montiel J, Downie JA, Farkas A, et al. Morphotype of bacteroids in different legumes correlates with the number and type of symbiotic NCR peptides. 2017;1-6. doi:10.1073/pnas.1704217114.
 39. Haag AF, Baloban M, Sani M, et al. Protection of *Sinorhizobium* against Host Cysteine-Rich Antimicrobial Peptides Is Critical for Symbiosis. 2011;9(10). doi:10.1371/journal.pbio.1001169.
 40. Maro G. Plant cysteine-rich peptides that inhibit pathogen growth and control rhizobial differentiation in legume nodules. 2015. doi:10.1016/j.pbi.2015.05.031.
 41. Fischer HM. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol Rev.* 1994;58(3):352-386.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=372973&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
 42. Berrabah F, Ratet P, Benjamin Gourion. Legume Nodules: massive infection in the absence of defense induction. *MPMI*.:1-29.
 43. Signaling MPK, Zhang L, Chen X, Lu H, Xie Z, Staehelin C. Functional Analysis of the Type 3 Effector Nodulation Outer Protein L (NopL) from

VI. Bibliographie

- Rhizobium sp.* NGR234 symbiotic effects , phosphorylation , and interference with. 2011;286(37):32178-32187. doi:10.1074/jbc.M111.265942.
44. Pislariu CI, Murray JD, Wen J, et al. A *Medicago truncatula* Tobacco Retrotransposon Insertion Mutant Collection with Defects in Nodule Development and Symbiotic Nitrogen Fixation 1 [W][OA]. 2012;159(August):1686-1699. doi:10.1104/pp.112.197061.
 45. Berrabah F, Bourcy M, Cayrel A, et al. Growth conditions determine the DNF2 requirement for symbiosis. Bendahmane M, ed. *PLoS One*. 2014;9(3):e91866. doi:10.1371/journal.pone.0091866.
 46. Berrabah F, Balliau T, A EH, et al. Control of the ethylene signaling pathway prevents plant defenses during intracellular accommodation of the rhizobia. 2018. doi:10.1111/nph.15142.
 47. Sinharoy S, Torres-Jerez I, Bandyopadhyay K, et al. The C2H2 transcription factor regulator of symbiosome differentiation represses transcription of the secretory pathway gene VAMP721a and promotes symbiosome development in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*. 2013;25(9):3584-3601. doi:10.1105/tpc.113.114017.
 48. Domonkos A. NAD1 Controls Defense-Like Responses in *Medicago truncatula* symbiotic Nitrogen Fixing Nodules Following Rhizobial Colonization in a BacA-independent Manner.2017
 49. Berrabah F, Bourcy M, Eschstruth A, et al. A nonRD receptor-like kinase prevents nodule early senescence and defense-like reactions during symbiosis. *New Phytol*. 2014;203(4):1305-1314. doi:10.1111/nph.12881.
 50. Keet J, Ellis AG, Hui C, Roux JJ Le. Legume – rhizobium symbiotic promiscuity and effectiveness do not affect plant invasiveness. 2017. doi:10.1093/aob/mcx028.
 51. Roux B, Rodde N. An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. 2014:817-837. doi:10.1111/tpj.12442.

VI. Bibliographie

52. Ge Y, Xiang Q, Wagner C, Zhang D, Xie Z, Staehelin C. The type 3 effector NopL of *Sinorhizobium sp.* strain NGR234 is a mitogen-activated protein kinase substrate. 2016;67(8):2483-2494. doi:10.1093/jxb/erw065.
53. Goldfine H, Wadsworth SJ. Macrophage intracellular signaling induced by *Listeria monocytogenes*. 2002;4:1335-1343.
54. Weber SS, Ragaz C, Hilbi H. Micro Review Pathogen trafficking pathways and host phosphoinositide metabolism. 2009;71(February):1341-1352. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06608.x.
55. Montiel J, Arthikala M, Cárdenas L, Quinto C. Legume NADPH Oxidases Have Crucial Roles at Different Stages of Nodulation. 2016:1-12. doi:10.3390/ijms17050680.
56. Arthikala M, Rosana S, Nava N, Santana O, Luis C, Quinto C. RbohB , a *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene , enhances symbiosome number , bacteroid size , and nitrogen fixation in nodules and impairs mycorrhizal colonization. 2014.
57. Peleg-grossman S, Melamed-book N, Levine A. ROS production during symbiotic infection suppresses pathogenesis-related gene expression. 2012;(March):409-415.
58. Udvardi M, Poole PS. Transport and Metabolism in Legume-Rhizobia Symbioses.2013. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120235.
59. Ku I, Qutob D, Kemmerling B, et al. Phytotoxicity and Innate Immune Responses Induced by Nep1-Like Proteins. 2006;18(December):3721-3744. doi:10.1105/tpc.106.044180.
60. Weinman S, Méhul P, Weinman S. Toute la biochimie.2013.
61. Wyk SG Van, Plessis M Du, Cullis CA, Kunert KJ, Vorster BJ. Cysteine protease and cystatin expression and activity during soybean nodule development and senescence. 2014:1-13. doi:10.1186/s12870-014-0294-3.
62. Barelli L, Moonjely S, Behie SW, Bidochka MJ. Fungi with multifunctional lifestyles : endophytic insect pathogenic fungi. *Plant Mol Biol*. 2016;90(6):657-

VI. Bibliographie

664. doi:10.1007/s11103-015-0413-z.
63. Hichri I, Boscari A, Castella C, Rovere M, Puppo A, Brouquisse R. Nitric oxide: a multifaceted regulator of the nitrogen-fixing symbiosis. 2015;66(10):2877-2887. doi:10.1093/jxb/erv051.
64. Damiani I, Pauly N, Puppo A, Brouquisse R, Boscari A. Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide Control Early Steps of the Legume – Rhizobium Symbiotic Interaction. 2016;7(April):1-8. doi:10.3389/fpls.2016.00454.
65. Hirsch S, Kim J, Muñoz A, Heckmann AB, Downie JA, Oldroyd GED. GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*. 2009;21(2):545-557. doi:10.1105/tpc.108.064501.
66. Zhang L, Cai J, Li R, et al. A single amino acid substitution in a chitinase of the legume *Medicago truncatula* is sufficient to gain Nod-factor hydrolase activity. 2016.
67. Bonifait L, Vaillancourt K, Gottschalk M, Frenette M, Grenier D. Purification and characterization of the subtilisin-like protease of *Streptococcus suis* that contributes to its virulence. *Vet Microbiol*. 2011;148:333-340.
68. Loreto N, Sujay P, Oswaldo VL, Mendoza-Soto AB, Nova-Franco B, Sosa-Valencia G, Reyes JL, Hernandez G. Regulation of Copper Homeostasis and Biotic Interactions by MicroRNA 398b in Common Bean. *PLOS ONE*.2014

VII. Annexe

Annexe 1. Protéines spécifiquement accumulés chez le WT

ID	Fonction	S	M	C
Medtr2g103330.1	Embryo-specificprotein	1,82	3,35	0,00
Medtr3g467600.1	Peroxidasefamilyprotein	1,73	0,83	2,20
Medtr7g016060.1	NADH-ubiquinonereductasecomplex 1 MLRQ subunit	0,60	0,42	0,00
Medtr3g055480.1	EF-hand pair protein	0,54	0,14	0,48
Medtr3g097010.1	CBS/octicosapeptide/phox/Bemp1 (PB1) domainprotein	0,44	0,60	0,06
Medtr4g056320.1	Legumelectin beta domain	0,37	0,78	0,00
Medtr4g069200.1	Lipidtransferprotein	0,29	0,00	0,00
Medtr5g022390.1	Rhodanese-relatedsulfurtransferase	0,28	0,10	0,29
Medtr6g086170.1	Sulfate/bicarbonate/oxalate exchanger and transporter sat-1	0,23	0,35	0,00
Medtr7g090950.1	Eukaryotic-type carbonic anhydrase	0,18	0,13	0,09
Medtr4g087730.1	Pmr5/Cas1p GDSL/SGNH-like acyl-esterase	0,12	0,00	0,17
Medtr4g103495.1	Subtilisin-like serine protease	0,11	0,00	0,00
Medtr7g079300.1	Subtilisin-like serine protease	0,10	0,04	0,00
Medtr4g018750.1	Uncouplingprotein	0,08	0,05	0,00
Medtr0003s0560.1	Serine carboxypeptidase-like	0,06	0,11	0,36
Medtr3g072620.1	YbaK/proline-tRNA ligase associateddomain	0,05	0,00	0,11
Medtr3g049410.1	Tryptophan synthase beta type 2	0,05	0,00	0,07
Medtr5g048060.1	B-cell receptor-associated-like	0,00	0,98	0,00
Medtr6g091630.1	60S ribosomal protein L31B	0,00	0,88	0,00
Medtr2g048900.1	Endoplasmicoxidoreductinprotein	0,00	0,56	0,00
Medtr3g086000.1	Zincin-likemetalloprotease	0,00	0,56	0,00
Medtr3g055440.1	Nodulin-25 protein	0,00	0,47	0,00

VII. Annexe

Medtr5g085420.1	UPF0451 C17orf61-like	0,00	0,43	0,00
Medtr5g090010.1	Fission 1 protein	0,00	0,43	0,00
Medtr8g067020.2	Reversed, hypothetical	0,00	0,42	0,00
Medtr3g055585.1	EF-hand pair protein	0,00	0,35	0,23
Medtr5g094210.1	Lipidtransferprotein	0,00	0,33	1,21
Medtr3g072190.1	Peroxidasefamilyprotein	0,00	0,33	0,17
Medtr4g113090.1	Bile acid:sodiumsymporter	0,00	0,33	0,00
Medtr1g049330.1	Leghemoglobin Lb120-1	0,00	0,33	0,33
Medtr2176s0010.1	Ribulosebisphosphate carboxylase large chain	0,00	0,28	0,00
Medtr3g075390.1	KDEL-tailed cysteine endopeptidase CEP1	0,00	0,27	0,10
Medtr2g100710.1	6-phosphofructokinase	0,00	0,27	0,37
Medtr6g006060.1	50S ribosomal protein L7/L12	0,00	0,26	0,00
Medtr6g077870.1	OPT family oligopeptide transporter	0,00	0,26	0,00
Medtr2g079830.1	Fiberprotein Fb34	0,00	0,26	0,00
Medtr3g018920.1	Annexin D8	0,00	0,24	0,00
Medtr7g101070.1	DnaJ heat shock amine-terminal domain	0,00	0,22	0,00
Medtr1g032160.1	Caleosin	0,00	0,22	0,00
Medtr4g052380.1	Nitrilase/nitrile hydratase NIT4A-like	0,00	0,20	0,11
Medtr1g071110.1	2-methyl-6-phytylbenzoquinone methyltransferase	0,00	0,19	0,00
Medtr5g073020.1	Cytochrome P450 family 71	0,00	0,18	0,00
Medtr2g010540.1	Transmembraneprotein, putative	0,00	0,18	0,00
Medtr1g017220.1	Transmembraneprotein, putative	0,00	0,17	0,00
Medtr7g076150.1	Methyltransferase PMT16, putative	0,00	0,17	0,00
Medtr4g005520.1	YGGT familyprotein	0,00	0,16	0,00
Medtr5g074690.1	Translocon at the inner envelope membrane ofs 110 protein	0,00	0,16	0,00

VII. Annexe

Medtr7g064130.1	Plant/K8E10-2	0,00	0,15	0,00
Medtr3g079510.1	NADH-cytochrome b5 reductase	0,00	0,15	0,00
Medtr1g088150.1	Transmembraneprotein, putative	0,00	0,14	0,00
Medtr6g009440.1	Prolyl 4-hydroxylase alpha-like	0,00	0,14	0,00
Medtr7g078060.1	O-acyltransferase WSD1-like	0,00	0,13	0,00
Medtr7g068340.1	ADP/ATP carrier protein	0,00	0,13	0,00
Medtr2g025140.1	Ubiquinoloxidase	0,00	0,13	0,00
Medtr8g090210.1	Substrate carrier familyprotein	0,00	0,13	0,00
Medtr3g063200.1	Hydroxyproline-richglycoprotein	0,00	0,13	0,00
Medtr1g064350.1	GRF zinc fingerprotein	0,00	0,13	0,00
Medtr1g085730.1	Protoporphyrinogen IX oxidase	0,00	0,12	0,18
Medtr8g033290.1	Dishevelled/Egl-10/leckstrindomain	0,00	0,11	0,03
Medtr8g469310.1	Peptide/nitrate transporter plant	0,00	0,11	0,00
Medtr8g083170.1	Long-chain-fatty-acid CoA ligase (AMP-forming)	0,00	0,10	0,00
Medtr2g020800.1	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-like	0,00	0,09	0,00
Medtr3g107510.1	Substrate carrier	0,00	0,08	0,00
Medtr4g132320.1	Multi-copperoxidase-likeprotein	0,00	0,07	0,00
Medtr2g098110.1	Outer membrane OMP85	0,00	0,05	0,00
Medtr8g107370.1	Phosphoethanolamine N-methyltransferase	0,00	0,04	0,35
Medtr8g080230.1	PLAT/LH2 domainlipoxygenase	0,00	0,02	0,03
Medtr8g069760.1	Alpha-glucan water dikinase	0,00	0,00	0,04
Medtr1g027020.1	NADH glutamate synthase	0,00	0,00	0,04
Medtr7g451340.1	Eukaryotic translation initiation factor 4G-like	0,00	0,00	0,04
Medtr8g083210.1	Aspartokinase-homoserinedehydrogenase	0,00	0,00	0,05
Medtr3g106410.1	Neurochondrinprotein	0,00	0,00	0,06
Medtr5g095430.1	Hypotheticalprotein	0,00	0,00	0,06

VII. Annexe

Medtr1g057860.1	Histidyl-tRNAsynthetase	0,00	0,00	0,06
Medtr3g058540.1	Leucyl-tRNAsynthetase	0,00	0,00	0,06
Medtr7g013300.1	Alpha amylase domainprotein	0,00	0,00	0,07
Medtr3g102810.1	Subtilisin-like serine protease	0,00	0,00	0,08
Medtr4g021570.1	Armadillo/beta-catenin-like repeat	0,00	0,00	0,08
Medtr1g029150.1	Stearoyl-acyl-carrier desaturase	0,00	0,00	0,08
Medtr1g112310.1	Protein transporter Sec24-like CEF , putative	0,00	0,00	0,09
Medtr4g035170.1	Adenylate kinase	0,00	0,00	0,09
Medtr4g069960.1	Adenylylcyclase-associated	0,00	0,00	0,10
Medtr1g008200.1	Nuclearmovementfamily	0,00	0,00	0,10
Medtr7g079310.1	Subtilisin-like serine protease	0,00	0,00	0,10
Medtr3g100890.1	Pyridoxine/pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	0,00	0,00	0,10
Medtr3g115340.1	Starchbranching enzyme I	0,00	0,00	0,10
Medtr2g054370.1	Choline/ethanolamine kinase	0,00	0,00	0,11
Medtr2g100340.1	2,3-diketo-5-methylthio-1-phosphopentane phosphatase	0,00	0,00	0,11
Medtr4g086020.1	Ferredoxin-nitrite reductase	0,00	0,00	0,11
Medtr5g092740.1	Perchloric acid soluble translation inhibitor-like protein	0,00	0,00	0,12
Medtr2g008120.1	Serine decarboxylase	0,00	0,00	0,12
Medtr6g092620.1	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	0,00	0,00	0,15
Medtr8g093460.1	Pectinesterase/pectinesteraseinhibitor	0,00	0,00	0,15
Medtr4g112900.1	Serine/Threonine kinase family protein	0,00	0,00	0,15
Medtr2g009270.1	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase	0,00	0,00	0,16
Medtr3g077590.1	Anthranilatephosphoribosyltransferase	0,00	0,00	0,16
Medtr2g025050.1	Plastidlipid-associatedprotein	0,00	0,00	0,16
Medtr4g070430.1	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	0,00	0,00	0,16

VII. Annexe

Medtr4g077700.1	Methionine-tRNA ligase, putative	0,00	0,00	0,16
Medtr4g112680.1	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain	0,00	0,00	0,17
Medtr6g011530.1	2-aminoethanethiol dioxygenase-like	0,00	0,00	0,18
Medtr1g090810.1	Leghemoglobin Lb120-1	0,00	0,00	0,18
Medtr7g080935.1	UDP-glucosyltransferase	0,00	0,00	0,20
Medtr4g087440.1	Stearoyl-acyl-carrier desaturase	0,00	0,00	0,20
Medtr1g090867.1	Tyrosine phosphatase	0,00	0,00	0,22
Medtr4g076600.1	Porphobilinogendeaminase	0,00	0,00	0,24
Medtr3g031830.1	DUF640 family protein	0,00	0,00	0,26
Medtr3g116860.1	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	0,00	0,00	0,26
Medtr3g109420.1	2-on-2 hemoglobin	0,00	0,00	0,35
Medtr4g014910.1	Aspartate aminotransferase	0,00	0,00	0,47
Medtr3g108790.1	COP9 signalosome complex subunit 5	0,00	0,00	0,48
Medtr3g070890.1	N-(5-phosphoribosyl)anthranilate isomerase	0,00	0,00	0,73
Medtr7g118340.1	Soluble inorganic pyrophosphatase	0,00	0,00	0,93

VII. Annexe

Annexe 2. Protéine spécifiquement accumulé chez symCRK

ID	Fonction	S	M	C
Medtr3g081130.1	Seedlinoleate 9S-lipoxygenase	0,04	0,07	0,05
Medtr7g108875.1	Pectinesterase/pectinesteraseinhibitor, putative	0,07	0,00	0,12
Medtr7g065720.1	Glutathione S-transferase	0,00	0,00	0,33
Medtr7g065270.1	Glutathione S-transferase	0,00	0,00	0,11
Medtr7g065600.1	Glutathione S-transferase	0,00	0,00	0,17
Medtr7g065230.1	Glutathione S-transferase	0,00	0,00	0,22
Medtr0002s1060.1	Glycoside hydrolase	0,28	0,24	1,13
Medtr2g075140.1	Receptor-like kinase	0,00	0,00	0,25
Medtr5g007713.1	Chalcone and stilbene synthase	0,00	0,00	1,54
Medtr2g019250.1	Germinfamilyprotein	0,89	1,28	0,93
Medtr7g011990.1	Caffeicacid O-methyltransferase	0,00	0,09	0,52
Medtr2g031590.1	FAD-binding berberine	0,12	0,33	0,32
Medtr2g031600.1	FAD-binding berberine	0,18	0,37	0,34
Medtr2g099470.1	Chitinase (Class IV) / Hevein	0,41	0,69	1,07
Medtr5g016320.1	Indole-3-acetic acid-amidosynthetase	0,06	0,08	0,41
Medtr1g040195.1	Benzylalcohol O-benzoyltransferase	0,00	0,00	0,25
Medtr1g040215.1	Benzylalcohol O-benzoyltransferase	0,00	0,00	0,27
Medtr2g030480.1	Stress up-regulated Nod 19 protein	0,09	0,10	0,05
Medtr1g080810.1	Chitinase / Hevein / PR-4 / Wheatwin2	0,26	0,54	0,99
Medtr8g028720.1	MAP kinase	0,00	0,05	0,20
Medtr1g081620.1	O-acetylserine (thiol) lyase	0,00	0,11	0,67
Medtr7g077150.1	LRR receptor-like kinase	0,00	0,17	0,00
Medtr8g031400.1	GDSL-like lipase/acylhydrolase	0,24	0,36	0,76

VII. Annexe

Medtr2g022370.1	Extracellulardermalglycoprotein	0,00	0,00	0,35
Medtr4g019225.1	Laccase/diphenoloxidase	0,00	0,13	0,57
Medtr7g406860.1	NADP-dependent alkenal double bond reductase	0,00	0,00	0,15
Medtr2g072400.1	Cytochrome P450	0,00	0,16	0,00
Medtr3g062590.1	LRR receptor-like kinase	0,00	0,23	0,00
Medtr5g075650.1	LRR receptor-like kinase	0,00	0,17	0,00
Medtr4g029180.1	Peroxidase	0,16	0,40	0,07
Medtr4g029170.1	Peroxidase	0,09	0,25	0,06
Medtr4g123870.1	Pti1-like kinase	0,00	0,22	0,08
Medtr8g091390.1	L-ascorbateoxidase	0,00	0,08	0,28
Medtr5g039900.1	UDP-glucosyltransferase	0,00	0,00	0,10
Medtr7g009780.1	Polyvinylalcoholdehydrogenase-like	0,07	0,09	0,45
Medtr5g007550.1	Cytochrome P450	0,04	0,31	0,00
Medtr2g010590.1	CAP, cysteine-rich secretory protein, antigen 5	0,37	0,35	1,11
Medtr4g069940.1	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase-like	0,00	0,07	0,39
Medtr2g028580.1	LRR receptor-like kinase	0,00	0,38	0,06
Medtr1g032010.1	Translocation proteinTolB	0,00	0,00	0,30
Medtr5g090250.1	Inhibitor of trypsin and hageman factor-like	0,49	1,98	1,61
Medtr8g087425.1	Glutathione S-transferase	0,00	0,00	0,58
Medtr5g083860.1	Class III peroxidase	0,00	0,00	0,21
Medtr6g078290.1	Lipidtransferprotein	0,10	0,32	0,23
Medtr2g075770.1	Gamma-glutamylhydrolase	0,00	0,00	0,10
Medtr1g107215.1	Plant basic secretory protein (BSP)	0,11	0,00	0,54
Medtr6g091680.1	Caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase	0,00	0,00	0,60
Medtr6g090615.1	LRR receptor-like kinase plant	0,00	0,09	0,02

VII. Annexe

Medtr6g090605.1	Carbohydrate-binding protein of the ER protein	0,00	0,06	0,07
Medtr5g019010.1	Cytochrome P450 family 71	0,00	0,21	0,00
Medtr1g019940.1	Patatin-like phospholipase	0,00	0,53	0,59
Medtr7g034395.1	Zinc-binding dehydrogenase family oxidoreductase	0,00	0,00	0,30
Medtr0056s0160.1	Flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase	0,00	0,00	0,32
Medtr1g100395.1	NAD(P)-binding rossmann-fold	0,00	0,09	0,14
Medtr4g094772.1	Cytochrome P450 family 81	0,00	0,17	0,00
Medtr5g036080.1	Matrix metalloproteinase	0,00	0,29	0,19
Medtr4g091200.1	FAD-binding berberine	0,00	0,05	0,14
Medtr3g049970.1	Limonoid UDP-glucosyltransferase-like	0,00	0,00	0,20
Medtr1g107350.1	Limonoid UDP-glucosyltransferase-like	0,00	0,00	0,13
Medtr5g048470.1	Flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase	0,00	0,10	0,16
Medtr4g120970.1	Pathogenesis-related protein bet V I	0,00	0,00	0,71
Medtr1g105020.1	2-hydroxyisoflavanone dehydratase	0,00	0,00	0,26
Medtr8g039090.1	NADPH:quinoneoxidoreductase-like	0,00	0,00	0,46
Medtr7g014570.1	Isoflavone-7-O-methyltransferase	0,00	0,00	0,20
Medtr6g079520.1	Linker histone H1 and h5	0,22	0,14	0,00
Medtr7g065660.1	Glutathione S-transferase	0,00	0,00	0,18
Medtr8g096910.1	Pathogenesis-relatedthaumatin	0,00	0,13	0,44
Medtr4g120760.1	Pathogenesis-related protein bet V I	0,00	0,00	0,39
Medtr4g066240.1	Cyanogenicbeta-glucosidase, putative	0,00	0,12	0,00
Medtr8g076680.1	Epoxide hydrolase	0,00	0,00	0,26
Medtr4g009920.1	Glycerol kinase-like	0,00	0,00	0,41
Medtr1g036490.1	Caffeicacid O-methyltransferase	0,00	0,00	0,16
Medtr1g016760.1	RNA-binding KH domain	0,06	0,20	0,00

VII. Annexe

Medtr2g034720.1	Alpha-L-arabinofuranosidase/beta-D-xylosidase	0,00	0,08	0,00
Medtr1g015970.1	Fructanexohydrolase	0,00	0,00	0,12
Medtr4g132270.1	Lactoylglutathione lyase-likeprotein	0,00	0,00	0,44
Medtr3g021430.1	Caffeicacid O-methyltransferase	0,00	0,00	0,17
Medtr8g087410.1	Glutathione S-transferase	0,00	0,00	0,22
Medtr5g040430.1	Glutathione S-transferase	0,00	0,00	0,29
Medtr4g129070.1	Diacylglycerol kinase	0,00	0,12	0,00
Medtr4g098860.1	Tetraspanin	0,00	0,24	0,00
Medtr3g110320.1	Glycoside hydrolase	0,00	0,00	0,18
Medtr2g022760.1	Glycoside hydrolase	0,00	0,00	0,32
Medtr1g115230.1	Prolylloleptidase	0,00	0,00	0,07
Medtr3g115670.1	Senescence-associated E3 ubiquitin ligase	0,00	0,06	0,00
Medtr7g081050.1	Triacylglycerol lipase-likeprotein	0,07	0,00	0,20
Medtr6g007980.1	Senescence-associated	0,00	0,00	0,15
Medtr8g010180.1	LRR receptor-like kinase	0,00	0,17	0,00
Medtr7g080810.1	LRR receptor-like kinase	0,00	0,05	0,00
Medtr0078s0190.1	UDP-glucosyltransferase	0,00	0,00	0,23
Medtr7g114750.1	DNA-damage-repair/tolerationprotein DRT102, putative	0,00	0,00	0,09
Medtr8g098320.1	DNA-damage-repair/tolerationprotein DRT102	0,00	0,00	0,14
Medtr4g076255.1	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	0,12	0,10	0,17
Medtr1g109400.1	Lipid phosphate phosphatase-like	0,14	0,21	0,00
Medtr4g036260.1	Quinone-oxidoreductase-like	0,00	0,06	0,13
Medtr1g056550.1	Syntaxin of plants 122	0,00	0,26	0,00
Medtr8g028435.1	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase-like	0,00	0,00	0,12
Medtr5g013440.1	Expansin-B1-like	0,00	0,00	0,19

VII. Annexe

Medtr3g467420.1	Glutathione S-transferase	0,00	0,00	0,18
Medtr7g018610.1	Nuclear matrix constituent-like	0,00	0,09	0,00
Medtr2g104960.1	Cinnamoyl-CoA reductase-like	0,00	0,00	0,20
Medtr5g006070.1	Sugar porter (SP) family MFS transporter	0,00	0,44	0,00
Medtr7g016650.1	DSBA oxidoreductase	0,00	0,00	0,30
Medtr7g076900.1	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain)	0,00	0,07	0,00
Medtr4g129180.1	Alpha-rhamnosidase-like	0,00	0,00	0,67
Medtr3g101420.1	Gibberellin receptor GID1	0,00	0,00	0,14
Medtr6g009370.1	LRR receptor-like kinase	0,00	0,10	0,00
Medtr2g012560.1	Secretory carrier-associated membrane	0,00	0,58	0,00
Medtr3g011440.1	Histone-lysine N-methyltransferase	0,12	0,00	0,00
Medtr1g050458.1	Alpha/beta fold hydrolase	0,00	0,13	0,00
Medtr4g084560.1	Phytanoyl-CoA dioxygenase	0,00	0,00	0,60
Medtr3g065490.1	RNA recognition motif, a.k.a. RRM, RBD	0,00	0,12	0,00
Medtr2g029860.1	Peroxidase	0,00	0,16	0,26
Medtr4g086240.1	Vacuolar import/degradation, VID27-like	0,00	0,09	0,00
Medtr7g009820.1	Polyvinylalcohol dehydrogenase-like	0,00	0,00	0,09
Medtr5g025020.1	Lectin receptor kinase	0,00	0,07	0,00
Medtr7g046490.1	UDP-glucosyltransferase	0,00	0,00	0,13
Medtr2g040530.1	UDP-glucosyltransferase	0,00	0,00	0,14
Medtr2g086600.1	N-carbamoylputrescine amidohydrolase, putative	0,00	0,00	0,15
Medtr3g086520.1	E3 ubiquitin-protein ligase RGLG2-like	0,00	0,19	0,00
Medtr3g437870.1	ABC transporter A	0,00	0,08	0,00
Medtr8g020970.1	Linoleate 13S-lipoxygenase 2-1	0,00	0,10	0,00
Medtr8g079120.1	Methyl esterase	0,00	0,00	0,13

VII. Annexe

Medtr3g063030.1	Bis(5-adenosyl)-triphosphatase-like	0,00	0,00	0,28
Medtr8g046240.1	Cytochrome P450	0,00	0,06	0,00
Medtr8g046210.1	Cytochrome P450	0,00	0,05	0,00
Medtr1g056560.1	Syntaxin of plants 122	0,00	0,15	0,00
Medtr8g024160.1	Caffeicacid O-methyltransferase	0,00	0,00	0,09
Medtr7g118300.1	Caffeicacid O-methyltransferase	0,00	0,00	0,08
Medtr5g078330.1	Linker histone H1 and h5	0,00	0,20	0,00
Medtr5g056600.1	Cinnamoyl-CoA reductase	0,00	0,00	0,12
Medtr5g010640.1	Pathogenesis-related thaumatin	0,00	0,00	0,15
Medtr6g043510.1	G-type lectin S-receptor-like Serine/Threonine-kinase plant	0,00	0,05	0,00
Medtr1g077030.1	4,5-DOPA dioxygenase extradiol-like	0,00	0,00	0,26
Medtr1319s0010.1	Quinone oxidoreductase-like	0,00	0,00	0,35
Medtr4g077100.1	Cinnamoyl-CoA reductase-like	0,00	0,00	0,18
Medtr7g115690.1	L-allo-threonine aldolase-like	0,00	0,00	0,15
Medtr4g080140.1	Aspartate aminotransferase	0,00	0,00	0,10
Medtr5g033230.1	Glutamate-glyoxylate aminotransferase	0,00	0,00	0,15
Medtr6g015805.1	Ferrioreceptor-like kinase	0,00	0,06	0,00
Medtr8g096190.1	Calcium-dependent phospholipid-binding copine	0,00	0,06	0,00
Medtr6g464280.1	Gibberellin receptor GID1, putative	0,00	0,00	0,10
Medtr3g069050.1	Wall-associated receptor kinase-like	0,00	0,07	0,00
Medtr3g080050.1	LysM receptor kinase K1B	0,00	0,10	0,00
Medtr7g117170.1	UDP-glucosyltransferase	0,00	0,00	0,09
Medtr5g020680.1	Phosphopantetheine adenylyltransferase	0,00	0,00	0,20
Medtr8g031430.1	GDSL-like lipase/acylhydrolase	0,00	0,00	0,19
Medtr7g089970.1	Ferredoxin-dependent glutamate synthase	0,00	0,00	0,08

VII. Annexe

Medtr5g055680.1	Flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase	0,00	0,00	0,12
Medtr4g005750.1	4-coumarate:CoA ligase-like	0,00	0,00	0,10
Medtr4g083610.1	Eukaryotic translation initiation factor 2c	0,00	0,04	0,00
Medtr8g099275.1	COP1-interactive protein, putative	0,00	0,05	0,00
Medtr4g104640.1	Cytochrome P450	0,00	0,08	0,00
Medtr3g437990.1	ABC transporter A	0,00	0,05	0,00
Medtr3g030550.1	Actin-relatedprotein ARP4	0,00	0,00	0,18
Medtr6g016795.1	Glycoside hydrolase	0,00	0,00	0,05
Medtr5g026610.1	Neutral alpha-glucosidase	0,00	0,00	0,37
Medtr8g031370.1	Carboxy-terminal regionremorin	0,00	0,14	0,00
Medtr6g053290.1	Suppressor of G2 allele of SKP1	0,10	0,00	0,19
Medtr3g113250.1	Chromosome condensation regulator RCC1 repeat protein	0,00	0,06	0,00
Medtr7g082530.1	Wall associated kinase-like	0,00	0,15	0,00
Medtr4g010050.1	Signal recognition particle 54 kDa	0,00	0,04	0,00
Medtr2g056120.1	Acyl-activating enzyme 17, peroxisomalprotein, putative	0,00	0,00	0,05
Medtr8g072250.1	AP-4 complexsubunit epsilon	0,00	0,04	0,00
Medtr6g059755.1	Kunitz type trypsin inhibitor / Alpha-fucosidase	0,00	0,00	0,23
Medtr2g008360.1	Somatic embryogenesis receptor-like kinase	0,00	0,07	0,00
Medtr8g467000.1	Indole-3-acetic acid-amidosynthetase	0,00	0,00	0,10
Medtr5g098970.1	LRR receptor-like kinase	0,00	0,06	0,00
Medtr5g022880.1	Eukaryoticaspartylprotease	0,00	0,00	0,08
Medtr4g131690.1	NEDD8-activating enzyme E1 catalytic subunit	0,00	0,00	0,05
Medtr2g067660.1	Succinate-semialdehydedehydrogenase	0,08	0,00	0,04
Medtr8g102470.1	6-phosphogluconate dehydrogenase NAD-binding domain	0,00	0,00	0,19

VII. Annexe

Medtr3g090170.1	Vacuolar protein sorting-associated protein	0,00	0,09	0,00
Medtr8g032020.1	NAD(P)-binding rossmann-fold	0,00	0,00	0,10
Medtr4g115420.1	Clathrin assembly plant-like protein, putative	0,00	0,10	0,00
Medtr4g123850.1	Drug resistance transporter-like ABC	0,00	0,03	0,00
Medtr2g098030.1	Xanthine dehydrogenase/oxidase	0,00	0,00	0,18
Medtr5g009780.1	Cation/H ⁺ exchanger 3	0,00	0,04	0,00
Medtr7g094190.1	Indole-3-acetic acid-amidosynthetase	0,00	0,00	0,12
Medtr4g097590.1	Serine carboxypeptidase S28	0,00	0,00	0,10
Medtr2g100520.1	IAA-amino acid hydrolase ILR1-like	0,00	0,11	0,00
Medtr7g056147.1	RPM1 interactingprotein 4	0,00	0,27	0,00
Medtr1g032250.1	l-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase-like	0,00	0,00	0,11
Medtr2g082990.1	NDR1	0,00	0,19	0,00
Medtr8g102860.1	Sugar porter (SP) family MFS transporter	0,00	0,32	0,00
Medtr3g023720.1	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor adaptor	0,00	0,26	0,00
Medtr3g075440.1	LRR receptor-like kinase	0,00	0,04	0,00
Medtr3g035130.1	Long-chain acyl-CoA synthetase	0,00	0,00	0,13
Medtr1g100647.1	Carboxy-terminal regionremorin	0,00	0,32	0,00
Medtr2g017825.1	Integrin-linked kinase	0,00	0,34	0,00
Medtr3g110460.1	Transmembraneprotein, putative	0,00	0,17	0,00
Medtr2g067760.1	LEM3 (ligand-effectmodulator 3)	0,00	0,12	0,00
Medtr5g055650.1	Prefoldin	0,00	0,00	0,25
Medtr5g007640.1	4-coumarate:CoA ligase-like	0,00	0,00	0,09
Medtr2g036900.1	Pumilio-family RNA-binding repeatprotein	0,00	0,08	0,00
Medtr2g072830.1	PfkBfamily carbohydrate kinase	0,00	0,00	0,15
Medtr3g089100.1	P-loop nucleoside triphosphate hydrolase,	0,00	0,08	0,00

VII. Annexe

	putative			
Medtr5g077130.1	Adeninenucleotide alpha hydrolase	0,00	0,22	0,00
Medtr8g094590.1	Eukaryoticaspartylprotease	0,00	0,53	0,00
Medtr3g098990.1	DEK domainchromatinassociatedprotein	0,00	0,10	0,00

VII. Annexe

Annexe 3. Liste des protéines dont la répartition est modifiée entre le WT et le mutant

		S		M		C	
		WT	CRK	WT	CRK	WT	CRK
Protéines spécifiquement identifiées dans le microsome WT ou le cytosol <i>symCRK</i>							
Medtr6g065670.1	Eukaryotic translation initiation factor 6-like	0,00	0,00	0,24	0,00	0,00	0,48
Medtr1g102650.1	Trafficking protein particle complex subunit-like	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	0,35
Protéines spécifiquement identifiées dans le cytosol WT ou le symbiosome <i>symCRK</i>							
Medtr7g113160.1	Histone H2A 6	0,00	0,60	0,00	0,00	0,32	0,00
Medtr1g044720.1	Pre-mRNA-processing factor	0,00	0,10	0,00	0,00	0,07	0,00
Medtr3g011440.1	Histone-lysine N-methyltransferase	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00
Medtr3g031380.1	MalonylCoA-acyl carrier transacylase	0,00	0,06	0,00	0,00	0,12	0,00
Medtr2g014360.1	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein	0,00	0,12	0,00	0,00	0,17	0,00
Protéines spécifiquement identifiées dans le cytosol WT ou le microsome <i>symCRK</i>							
Medtr1g085150.1	Glutamyl-tRNA synthetase	0,00	0,00	0,00	0,05	0,06	0,00
Medtr5g093860.1	Microtubule associated protein, MAP65/ASE1	0,00	0,00	0,00	0,10	0,11	0,00
Medtr8g079990.1	Signal recognition particle 72 kDa	0,00	0,00	0,00	0,06	0,04	0,00
Medtr3g092510.1	CTC-interacting domain	0,00	0,00	0,00	0,08	0,14	0,00
Medtr3g083690.1	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase-like	0,00	0,00	0,00	0,09	0,08	0,00
Medtr1g090773.2	Binding to TOMV RNA 1L	0,00	0,00	0,00	0,06	0,08	0,00
Medtr3g088805.1	ENTH/VHS/GAT	0,00	0,00	0,00	0,19	0,07	0,00
Medtr2g102435.1	Amine-terminal acetyltransferase, putative	0,00	0,00	0,00	0,02	0,04	0,00
Medtr7g115340.1	Poly(rC)-binding-like protein	0,00	0,00	0,00	0,18	0,12	0,00
Medtr1g099000.1	Translation initiation factor	0,00	0,00	0,00	0,03	0,04	0,00

VII. Annexe

Medtr4g102120.1	SNARE-interacting KEULE-like	0,00	0,00	0,00	0,07	0,03	0,00
Medtr4g088010.1	Heterogeneous nuclearrribonucleoprotein	0,00	0,00	0,00	0,07	0,17	0,00
Medtr8g073345.1	High mobility group (HMG)-box	0,00	0,00	0,00	0,23	0,39	0,00
Medtr2g028790.1	Synaptobrevin-like	0,00	0,00	0,00	0,13	0,09	0,00
Medtr8g105250.1	Ubiquitin fusion degradation 1	0,00	0,00	0,00	0,07	0,10	0,00
Medtr4g083150.1	Ras-GTPase-activatingprotein-binding protein, putative	0,00	0,00	0,00	0,10	0,06	0,00
Medtr3g091250.1	Splicing factor 3a subunit 3, putative	0,00	0,00	0,00	0,09	0,07	0,00
Protéines identifiées dans les Microsome/cytosol WT ou Symbiosome <i>symCRK</i>							
Medtr7g080803.1	Cytochrome protein C	0,00	0,14	0,18	0,00	0,21	0,00
Protéines identifiées dans le cytosol WT ou les symbiosome/microsome <i>symCRK</i>							
Medtr8g463890.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motif)	0,00	0,28	0,00	0,18	0,13	0,00
Medtr7g088370.1	Histone-lysine N-methyltransferase	0,00	0,10	0,00	0,03	0,05	0,00
Medtr1g073690.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motif)	0,00	0,11	0,00	0,29	0,11	0,00
Medtr4g076850.1	Isoleucine-tRNA ligase	0,00	0,02	0,00	0,03	0,03	0,00
Medtr3g115580.1	High mobility group (HMG)-box	0,00	0,48	0,00	1,16	0,46	0,00
Protéines identifiées dans l'ensemble des fractions WT ou le symbiosome <i>symCRK</i>							
Medtr4g057600.1	Serine carboxypeptidase-like	0,06	0,05	0,04	0,00	0,09	0,00
Protéines identifiées dans l'ensemble des fractions WT et ou le microsome <i>symCRK</i>							
Medtr0045s0110.1	DUF642	0,10	0,00	0,25	0,08	0,32	0,00
Protéines identifiées dans l'ensemble des fractions WT ou le cytosol <i>symCRK</i>							
Medtr5g080400.2	Leghemoglobin Lb120-1	0,23	0,00	0,53	0,00	2,17	0,23
Medtr1g013050.1	Aspartate aminotransferase	0,04	0,00	0,09	0,00	0,71	0,15

VII. Annexe

Medtr1g099350.1	Chitinase	0,09	0,00	0,11	0,00	0,10	0,06
Medtr4g056360.1	Legumelectin beta domainprotein	0,46	0,00	0,79	0,00	0,43	0,16
Medtr1g078000.1	Granule bound starch synthase I, putative	0,04	0,00	0,03	0,00	0,27	0,06
Medtr1g090820.3	Leghemoglobin Lb120-1	0,22	0,00	0,50	0,00	1,13	0,24
Protéines identifiées dans le symbiosome WT ou l'ensemble des fractions <i>symCRK</i>							
Medtr4g130800.1	Plastocyanin-like	0,24	0,51	0,00	0,35	0,00	0,12
Medtr1g080820.1	Chitinase / Hevein / PR-4 / Wheatwin2	0,60	0,90	0,00	0,87	0,00	0,92
Protéines identifiées dans le micrososome WT ou l'ensemble des fractions <i>symCRK</i>							
Medtr8g099550.1	Dynamamin-likeprotein 1E	0,00	0,09	0,39	0,51	0,00	0,03
Medtr8g105580.1	Dynamamin-likeprotein 1E	0,00	0,06	0,53	0,43	0,00	0,05
Medtr7g081420.1	Subtilisin-like serine protease	0,00	0,08	0,08	0,51	0,00	0,18
Medtr7g081500.1	Subtilisin-like serine protease	0,00	0,08	0,08	0,33	0,00	0,19
Medtr4g094775.1	Cytochrome P450 family 81	0,00	0,21	0,20	1,13	0,00	0,07
Medtr5g075450.1	Cytochrome P450 family cinnamate 4-hydroxylase	0,00	0,04	0,21	0,65	0,00	0,04
Medtr1g038920.1	N-acyl-L-amino-acid amidohydrolase	0,00	0,05	0,60	0,26	0,00	0,09
Medtr7g083560.1	Translocon-associatedprotein beta	0,00	1,13	2,92	2,15	0,00	0,40
Medtr7g087090.1	NADH-cytochrome b5 reductase	0,00	0,06	0,51	0,61	0,00	0,06
Medtr3g096675.1	Farnesylcysteine lyase	0,00	0,09	0,30	0,42	0,00	0,15
Medtr3g085490.1	60S ribosomal protein L17A	0,00	0,16	0,43	0,33	0,00	0,15
Medtr4g069250.1	NAD(P)H:quinone oxidoreductase, type IV	0,00	0,13	0,56	0,83	0,00	0,31
Medtr8g058330.1	Protein transporter Sec61 subunit alpha-like	0,00	0,24	0,64	0,45	0,00	0,18
Medtr2g435800.1	Acyl-CoAdehydrogenase	0,00	0,07	0,12	0,17	0,00	0,21
Medtr5g098250.1	Emp24/gp25L/p24	0,00	0,16	0,78	0,39	0,00	0,11

VII. Annexe

Medtr5g017670.1	Patatin-like phospholipase	0,00	0,10	0,07	0,78	0,00	0,14
Medtr8g027080.1	Cytochrome b5-like heme/steroid-binding	0,00	0,50	2,05	1,99	0,00	0,62
Medtr4g128840.1	Xylose isomerase	0,00	0,12	0,19	0,18	0,00	0,06
Medtr2g436030.1	Acyl-CoA dehydrogenase	0,00	0,15	0,29	0,35	0,00	0,28
Medtr8g073770.1	Disease resistance-responsive	0,00	0,75	0,71	1,26	0,00	0,54
Medtr5g015370.1	ADP-ribosylation factor-like protein A1D	0,00	0,11	0,46	0,36	0,00	0,21
Medtr1g102720.1	Emp24/gp25L/p24 family protein	0,00	0,23	0,80	0,52	0,00	0,20
Medtr5g074970.1	Class III peroxidase	0,00	0,09	0,12	0,49	0,00	0,09
Medtr8g090315.1	PLAT-plant-stress	0,00	0,29	0,31	0,39	0,00	0,41
Medtr3g087490.1	PLAT-plant-stress	0,00	0,25	0,20	0,27	0,00	0,31
Medtr5g012810.1	Major intrinsic protein (MIP) family transporter	0,00	1,16	1,00	1,42	0,00	1,08
Medtr3g077640.1	Plastid phosphate translocator	0,00	0,10	0,13	0,21	0,00	0,10
Medtr1g080990.1	MtN26	0,00	0,91	0,42	0,70	0,00	0,87
Protéines identifiées dans le cytosol WT ou l'ensemble des fractions <i>symCRK</i>							
Medtr2g035190.1	ABA-responsive protein	0,00	0,45	0,00	0,48	0,61	1,49
Medtr2g035320.2	ABA-responsive protein	0,00	0,40	0,00	1,06	0,84	2,02
Medtr2g035220.1	ABA-responsive protein	0,00	0,18	0,00	0,11	0,28	0,31
Medtr2g438110.1	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase	0,00	0,06	0,00	0,13	0,05	0,05
Medtr4g100640.1	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase-like	0,00	0,03	0,00	0,02	0,06	0,38
Medtr5g012920.1	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase-like protein	0,00	0,03	0,00	0,02	0,05	0,30
Medtr2g076490.1	Epidermis-specific secreted EP1-like glycoprotein	0,00	0,21	0,00	0,18	0,23	0,37
Medtr5g048550.1	2OG-Fe(II) oxygenase family oxidoreductase	0,00	0,13	0,00	0,34	0,15	0,83
Medtr4g094492.1	Reticuline oxidase-like	0,00	0,12	0,00	0,11	0,07	0,43

VII. Annexe

Medtr4g094495.1	Reticulineoxidase-like	0,00	0,04	0,00	0,04	0,10	0,17
Medtr1g066530.1	Albumin-2 protein	0,00	0,46	0,00	0,75	0,10	0,93
Medtr3g079340.1	Enhanceddiseasesusceptibility	0,00	0,08	0,00	0,17	0,13	0,56
Medtr2g073010.1	Kunitz type trypsininhibitor	0,00	0,09	0,00	0,16	0,59	0,90
Medtr2g436300.1	Glyoxysomal fatty acid beta-oxidation MFP-A	0,00	0,06	0,00	0,02	0,12	0,23
Medtr4g120130.1	Glyoxysomal fatty acid beta-oxidation MFP-A	0,00	0,03	0,00	0,02	0,07	0,11
Medtr1g099310.1	Chitinase	0,00	0,36	0,00	0,46	0,33	1,83
Medtr1g116500.1	2-isopropylmalate synthase	0,00	0,25	0,00	0,03	0,24	0,15
Medtr2g034480.1	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	0,00	0,11	0,00	0,19	0,46	0,76
Medtr4g005880.1	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	0,00	0,07	0,00	0,03	0,16	0,22
Medtr1g014140.1	Aspartate-tRNA ligase	0,00	0,03	0,00	0,05	0,24	0,07
Medtr3g054090.1	Transducin/WD-like repeat-protein	0,00	0,06	0,00	0,08	0,34	0,21
Medtr3g092970.1	Nascentproteinassociatedcomplex alpha chain	0,00	0,12	0,00	0,27	0,64	0,37
Medtr2g022350.1	Extracellulardermalglycoprotein	0,00	0,07	0,00	0,09	0,10	0,26
Medtr1g072420.1	Xyloglucanase-specificendoglucanaseinhibitor	0,00	0,06	0,00	0,08	0,08	0,30
Medtr7g023630.1	Polygalacturonaseinhibitor	0,00	0,12	0,00	0,20	0,48	0,22
Medtr3g093870.1	tRNA-binding region	0,00	0,10	0,00	0,13	0,15	0,09
Medtr2g039250.1	Nucleosome/chromatinassembly factor	0,00	0,06	0,00	0,19	0,21	0,05
Medtr5g062430.1	Glycoside hydrolase family 3	0,00	0,07	0,00	0,02	0,02	0,02
Medtr7g085150.1	Nod factor-binding lectin-nucleotide phosphohydrolase	0,00	0,07	0,00	0,16	0,07	0,07
Medtr8g017080.1	TCP-1/cpn60 chaperonin	0,00	0,05	0,00	0,03	0,03	0,03

VII. Annexe

1. Méthode utilisée pour la réalisation du protéome

Les nodosités de la plante WT et son mutant *symCRK* à 21 jours post inoculation avec *S. medicae* ont été récoltées puis broyées. Un fractionnement des échantillons est réalisé par centrifugation différentielle dans le tampon adéquat, trois fraction sont isolées, correspondant au cytosol, microsome de la cellule hôte ainsi qu'au symbiosome. Les protéines sont extraites à l'aide d'un tampon TCA acétone et séparées par SDS-PAGE. Les protéines digérées par trypsine et les peptides sont analysés par spectroscopie de masse MS-MS couplée à un chromatographe liquide. L'identification des spectres est réalisée par comparaison des profils obtenus avec ceux théorique obtenues par traduction *in silico* du génome de *M. truncatula*. Les résultats représentent le nombre de spectres détectés pour chaque protéine et normalisés par un contrôle interne⁴⁶.

Résumé:

La légumineuse *Medicago truncatula* à la capacité en condition de carence azotée d'interagir avec la bactérie du sol fixatrice d'azote, *Sinorhizobium medicae*. Au cours de l'interaction un nouvel organe racinaire est formé, la nodosité fixatrice d'azote au sein de laquelle les bactéries infectent de manière intracellulaire et chronique les cellules de l'hôte. Actuellement peu d'informations sont disponibles quant aux mécanismes contrôlant la survie des bactéries au sein de la cellule hôte. Au cours de notre étude, une analyse de protéome de la plante sauvage et du mutant *symCRK* présentant une dérégulation de l'immunité au cours de la symbiose a été réalisée. Nos résultats montrent que l'hôte et le symbionte ont la capacité de s'influencer mutuellement par l'envoi de protéines de fonctions diverses, contrôlant l'immunité et le métabolisme. La modification de la répartition des protéines dans la cellule, l'absence d'expression de gènes symbiotique, l'induction de gènes immunitaires et la modification du pattern d'expression de certains gènes conduisent au dysfonctionnement observé chez *symCRK*.

Mots clés : Symbiose, *symCRK* , *Medicago truncatula*, *Sinrhizobium medicae*, immunité.

Abstract:

The leguminous *medicago truncatula* have the capacity in condition of deficiency of nitrogen to interact with the nitrogen-fixing soil bacterium *sinorhizobium medicae* .during the interaction a new root organ is formed .the nodosity fixing nitrogen in which the bacteria infect intracellularly and chronic the host cells. Currently, few informations are available on the mechanisms controlling bacterial survival in the host celln During our study ,a proteome analysis of the wild type plant and mutant sym CRK presenting a deregulation of immunity during the symbiosis has been realized .Our results show that the host and the symbiont have the capacity to influence each other by sending proteins of various functions .controlling immunity and metabolism .The modification of the repartition of proteins in the cells ,the absence of symbiotic gene expression ,immune gene induction and the modification of the pattern of expression of certain genes leads to the dysfunction observed in *symCRK*

Keywords: Symbiosis, *symCRK* , , *Medicago truncatula*, immunity.

المخلص:

البقوليات *Medicago truncatula* تملك قدرة التفاعل في حالة نقص النيتروجين مع بيكتيريا التربة المثبتة للنيتروجين *Sinrhizobium medicae* من خلال هذا التفاعل يتكون في الجذور عضو جديد وهو العقدة المثبتة للنيتروجين والتي من خلالها تقوم البكتيريا باصابة داخل الخلايا .وتنتقل من خلالها بشكل مزمن .حاليا , هناك معلومات قليلة فيما يخص الاليات التي تتحكم في بقاء البكتيريا داخل الخلية المضيفة. خلال دراستنا , تم اجراء تحليل بروتينوم للنباتات البرية و المتحول *symCRK* التي اظهرت تحرير المناعة اثناء التكافل . تظهر نتائجنا ان المضيف و البكتيريا التي تعيش داخله لديها القدرة على التأثير في بعضهم البعض عن طريق ارسال البروتينات ذات وظائف مختلفة للسيطرة على الحصانة و التمثيل الغذائي. ان تعديل توزيع البروتينات في الخلية , وغياب تعبير الجين التكافلي , وتحريض الجينات المناعية وتعديل نمط التعبير عن جينات معين قيؤدي الى الخلل الوظيفي الملحوظ في . *symCRK*

كلمات مفتاحية : التعايش , *Sinrhizobium medicae* , *Medicago truncatula* , *symCRK* , المناعة.