



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

قسم العلوم البيولوجية

Département de Biologie

Projet de fin d'étude

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie

Spécialité : Microbiologie appliquée

Thème :

**Etude *in silico* des protéines associé à la pathogène chez *Medicago truncatula* et *Glycine max***

Présenté par :

Bentaher Randa

Benlabiod Saida

Soutenu devant le jury :

Président : M. Boutaiba Saad

Maitre de conférences A

Examineur 1 : M. Khoudja Khaled yacine

Maitre-assistant A

Examineur2 : M. Belaouni Hadj Ahmed

Maitre-assistante A

Promoteur : M.Berrabeh Fathi

Maitre de conférences B

Année Universitaire : 2018/2019

# REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier en premier lieu DIEU "Allah" Le Miséricordieux qui nous a donné la force et la volonté d'achever ce modeste travail.

Nous nous tenons tout particulièrement à remercier notre encadreur Dr. Berrabeh Fathi pour la qualité de ses conseils.

Merci également aux membres de jury, qui ont bien voulu faire partie du jury et d'apporter leur vive contribution à l'enrichissement de ce travail.

Mes remerciements vont enfin à chaque personne qui a contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

# Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

A mes chers parents ma mère et mon père pour leur patience, leur amour, leur soutien et leurs encouragements.

A mon frère et mes sœurs je dédie ce travail dont le gratitude leurs revient en premier lieu pour leurs conseils, aides, et encouragements.

A mes proches amies (Fella, Saida, Djihane, Ibtihal et Warda) pour leur encouragement et pour tous les bons moments qu'on a vécus ensemble.

Et aussi pour mon meilleur prof Berrabeh fathi merci infiniment pourvotre soutien et support.

Bentaher Randa

# Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.

A mes chers frères Mokhtar et Ahmed pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.

A toute ma famille, et mes amis Randa, Djihane et Ibtihal pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire.

Mes remercier pour mon meilleur professeur Berrabeh Fathi pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité

durant notre préparation de ce mémoire.

Merci d'être toujours là pour moi.

Benlabiod Saida

## Introduction

*Medicago truncatula* est une légumineuse de la famille des fabacées, en condition de carence en azote, elle établit une interaction symbiotique avec la bactérie du sol fixatrice d'azote *Sinorhizobium* sp. Au cours de ce phénomène un nouvel organe est formé, la nodosité fixatrice d'azote au sein de laquelle des milliers de bactéries infectent de manière intracellulaire les cellules de l'hôte (Oldroyd et al. 2011). Lorsque la plante est stressée, lorsqu'une source d'azote organique est ajoutée au milieu ou que la nodosité devient trop âgée, un phénomène de sénescence est activé au cours duquel les bactéries, mais aussi l'ensemble des composants de la cellule hôte sont dégradés et recyclés au sein d'une zone nommée zone de sénescence (Van de Velde et al. 2006).

Des travaux pionniers initiés par le Dr. Berrabah au sein du département de biologie de l'université Ziane Achour ont montrés le rôle de l'immunité au cours du phénomène de sénescence, deux processus qui ont été historiquement séparés par la communauté scientifique. Il a été démontrés que plusieurs catégories de gènes immunitaires notamment celle correspondant au – (Pathogenesis-related Protein (PR)) sont stimulés lors de la sénescence, mais aussi au sein de nodosités fonctionnelles (Berrabah et al., en cours de rédaction).

L'objectif de notre travail été de caractériser plusieurs classes de PRs notamment les PR1, PR2, PR5, PR6 et PR10 chez *M. truncatula*, ainsi que d'évaluer leur implication lors de l'immunité et de la sénescence. Pour cela une série d'analyses génomiques, transcriptomiques et évolutives ont été réalisées. Elles ont permis de mettre en évidence un nombre important de différences fondamentales notamment en termes de nombre de gènes, d'évolution et d'implication au cours de la sénescence et de l'immunité.

## Liste des abréviations

<b>AJ</b>	Acide jasmonique
<b>AS</b>	Acidesalicylique
<b>BAK1</b>	Brassinosteroid associated kinas
<b>CP</b>	cystéine protéase
<b>EPS</b>	Exoplysaccharide
<b>ETI</b>	Effector Triggered Immunity
<b>ETS</b>	Effector Triggered Susceptibility
<b>Flg22</b>	Peptide de la flagelline
<b>FLS 2</b>	flagelline sensing 2
<b>Gène R</b>	Gène de Résistance
<b>HR</b>	Hypersensitiveresponse
<b>ISR</b>	Induced systemic resistance
<b>LAR</b>	Local acquired resistance
<b>LRR</b>	Séquence répétée riche en leucine «leucine richrepeat»
<b>LRR-RLK</b>	Leucine-Rich Repeat-Receptor-like Kinases
<b>MAPK</b>	Protein MAP kinase «Mitogen Activated Protein Kinase»
<b>M/PAMP</b>	Microbe/pathogen associated molecular pattern»
<b>NBS</b>	Nucleotide Binding Site
<b>NFP</b>	Nod Factors Perception
<b>NOD</b>	Facteurs de nodulation
<b>NOP</b>	Nodule Outer Protein
<b>PTI</b>	PAMP Triggered Immunity
<b>PRR</b>	Pattern recognition receptor
<b>PCD</b>	Mort cellulaire programmée « programme celldead »
<b>PR</b>	Pathogenesis-Relatedprotein
<b>SAR</b>	Systemic acquired resistance

### Unités

<b>Aa</b>	Acide aminée	
<b>Hpi</b>	Hour post inoculation	
<b>Dpi</b>	Day post inoculation	
<b>Kda</b>	kilo	dalton

## Sommaire

### Section I. Synthèse bibliographique

#### Chapitre I. Introduction à l'immunité des plantes

I. La MAMP/PAMP Immunité de déclenchement(M/PTI)	1
I.1. Les récepteurs immunitaire:Récepteur de reconnaissance d'agent pathogène	1
I.2. La signalisation cellulaire associée à la M/PTI	2
II. L'Effector Triggered Immunity ou ETI	2
III. Résistance acquis (Systemic et Local acquiredresistance)	3
IV. Résistance systémique induite (ou ISR)	4
V. Hormones & immunité	4
V. 1. Acide salicylique et Jasmonate	4
V.2. Ethylène	5
<b>Chapitre II. Les Pathogenesis-relatedProteins</b>	7
I. Définition	7
II. Classification des PRs	7
II. Les PR dans la réponse aux stress	10
III. Régulation des PRs	11
<b>Chapitre III. La symbiose fixatrice d'azote</b>	12
I. Définition de la symbiose	12
II. La symbiose rhizobia-légumineuses	12
III. La nodosité fixatrice d'azote	15
IV. Répression de l'immunité au cours de la symbiose	15
IV.1. Répression au cours des étapes précoces	15
IV.2. Répression au cours des étapes tardives	16

## Sommaire

V. La sénescence	17
V.1. Physiologie de la sénescence	17
V.2. Les Cystéine protéase	17
<b>Chapitre IV. Contexte de l'étude et problématique</b>	<b>18</b>
I. Sénescence Vs. Immunité	18
II. Données Préliminaires	18
III. Problématique de l'étude	19
<b>Section II. Matériel et Méthodes</b>	<b>20</b>
Estimation du nombre de gènes associés à la pathogénie chez les plantes	20
Identification des gènes chez <i>M. truncatula</i>	20
Ré-annotation des classes de PRs	20
Analyse des taux de conservations de la séquence protéique pour un PR de même classe	20
Analyse de la phylogénie moléculaire	20
Comparaison des séquences protéiques	21
Analyse de l'expression des gènes chez <i>M. truncatula</i>	21
Identification des gènes chez <i>G. max</i>	21
Analyse de l'expression des gènes chez <i>G. max</i>	22
<b>Section II. Résultats</b>	<b>23</b>
I. Les « PathogenesisGenes » présentent une distribution hétérogène chez les plantes	23
II. L'analyse de l'expression des PRs indiquent une interconnexion entre la sénescence des nodosités et la réponse immunitaire	26
III. Evaluation du nombre de PR chez <i>M. truncatula</i>	26

## Sommaire

IV. Les PR1 sont stimulées lors de la sénescence et de l'immunité	27
V. Similarités et divergences entre les PR1 chez <i>M. truncatula</i>	31
VI. Les PR2 impliquée préférentiellement dans la sénescence que l'immunité	32
VII. La famille des PR10s préférentiellement stimulé lors de l'immunité que la sénescence	35
VII. Conservation et divergence au sein de la famille des PR10s chez <i>M. truncatula</i>	39
VIII. PR5, classe majeure chez <i>M. truncatula</i>	39
IX. Les PR5s présentent des profils d'expression similaire entre la sénescence et la défense	42
X. Certaines PR5 et PR10 sont stimulées lors de la sénescence et l'immunité	42
XI. Analyse des PR chez <i>G. max</i>	45
XII. Les PRs impliqués lors de la symbiose et de la sénescence chez <i>G. max</i>	45
<b>Section IV. Discussion</b>	<b>48</b>
I. Confirmation de la stimulation de l'immunité au cours de la sénescence	48
II. Un comportement différentiel des PRs au cours de l'immunité et de la sénescence	49
III. Le domaine Bet_V1 présente une conservation réduite entre les PR10	49
IV. Les PRs sont stimulées lors de la symbiose et de l'immunité chez <i>G. max</i>	49
<b>Conclusion</b>	<b>51</b>
<b>Bibliographie</b>	
<b>Annexe</b>	

## Liste des tableaux et des figures

Figure 1. P/MTI, ETI et ETS	3
Figure 2. La signalisation liée à l'acide salicylique et le jasmonate	5
Figure 3. Mécanismes moléculaires de perception de l'éthylène	6
Figure 4. L'endosymbiose <i>Medicago-Sinorhizobium</i>	6
Figure 5. Représentation des « <i>pathogenèses gènes</i> » dans le royaume végétale	24
Figure 6. L'expression des PRs met en évidence une interconnexion entre l'immunité et la sénescence chez <i>M. truncatula</i>	26
Figure 7. Analyse de la classe des PR1 chez <i>M. truncatula</i>	30
Figure 8. Analyse fine de la séquence CAP des PR1s	32
Figure 9. Les PRs de classe 2 préférentiellement impliqués lors de la sénescence	34
Figure 10. Les PR10s préférentiellement stimulées au cours de la réponse immunitaire	36
Figure 11. Analyse fine de la séquence correspondant au domaine Bet_V1 des PR10s	38
Figure 12. Analyse phylogénétique de la famille des PRs	40
Figure 13. Analyse de l'expression des PR5 au cours de la sénescence et de l'immunité	42
Figure 14. Certaines PR5 et PR10 sont induites au cours de la sénescence et de l'immunité	44
Figure 15. Les PRs sont stimulées lors de la symbiose et de la sénescence chez <i>G. max</i>	47

## Liste des tableaux et des figures

### Liste des tableaux

Tableau 1. Activité biologique et sites d'actions de 17 classes de protéines PR	8
Tableau 2. Nombre de gènes codants des PRs pour les classes étudiées	27
Tableau 3 Nombre de gènes codants des PRs chez <i>G. max</i>	45

## **Section I. Synthèse bibliographique**

### **Chapitre I. Introduction à l'immunité des plantes**

Les plantes interagissent continuellement avec leurs environnements, de ce fait, elles sont en contact avec différents types de microorganismes. Certains sont neutres (n'ont pas d'effet sur les plantes), d'autre bénéfiques telle que les rhizobias ou pathogènes, ces derniers peuvent causer des pertes agricoles considérables (Berrabah 2016).

Au cours de leur évolution, les plantes ont acquis une palette de mécanismes leur permettant de discriminer entre les différents types de microorganismes et d'apporter une réponse adéquate en fonction qu'ils soient bénéfique ou pathogènes (Choi and Klessig 2016; Oldroyd et al., 2011).

#### **I. La MAMP/PAMP Immunité de déclenchement (M/PTI)**

##### **I.1. Les récepteurs immunitaire : Récepteur de reconnaissance d'agent pathogène PRR**

Les plantes ont mis en place au cours de leur évolution la possibilité de percevoir les microorganismes pathogènes. Elles peuvent ainsi détecter certains pathogènes en utilisant des récepteurs de reconnaissance des agents pathogènes (PRRs) qui sont des Récepteur-Like Kinase (RLK) présent au sein des membranes plasmiques des cellules de l'hôte (Macho & Zipfel 2014); (Dardick et al., 2012). Les PRRs reconnaissent des motifs moléculaires conservés entre les microorganismes nommés MAMP ou PAMP (Microbial/Pathogens Associated Molecular Pattern), telle que la flageline, qui est une protéine composant le flagelle bactérien (Figure 1 ; (Bigeard et al., 2015)).

Les PRRs présente plusieurs domaines protéiques :

- (i) Un domaine extracellulaire de liaison aux M/PAMPs, responsable de la perception.
- (ii) Un domaine transmembranaire impliqué dans l'ancrage du récepteur à la membrane plasmique.
- (iii) Un domaine intracellulaire kinase dont la fonction est de transmettre le signal au sein de la cellule (Dardick et al., 2012).

Le domaine extracellulaire peut être de différents types, les plus courants sont ;

- (i) Le domaine LysMou riche en lysine qui reconnaît les molécules comportant des saccharides, composant certaines structure telles que le peptidoglycane bactérien ou la chitine des parois fongiques (Gust et al., 2012).

## Section I. Synthèse bibliographique

### Chapitre I. Introduction à l'immunité des plantes

- (ii) Les domaines LRR qui reconnaissent les peptides (Dardick et *al.*, 2012). (FlagelineSensing 2 (FLS2)) est l'un des PRRs les mieux précisée à ce jour, c'est un LRR-RLK qui reconnaît le flg22, peptide composant la Flagelinebactérienne.

#### **I.2. La signalisation cellulaire associée à la M/PTI**

Suite à la reconnaissance de leurs ligands, les PRRs enclenchent une signalisation immunitaire conduisant à une M/PTI (M/PAMP Trigger Immunité). Elle est caractérisée par une dépolarisation membranaire, l'augmentation de calcium intracellulaire, la production de ROS, l'activation de protéine kinase telles que la cascade MAPK ou les calmodulines kinase.

Ces modifications physiologiques conduisent à l'induction de l'expression de gènes de défense, la production de composés antimicrobiens tels que les phénols et le renforcement locale des parois cellulaire (Bigéard et *al.*, 2015), L'objectif de cette réponse est de bloquer la propagation du pathogène aux autres tissus de l'hôte.

#### **II. L'EffectorTriggeredImmunity ETI**

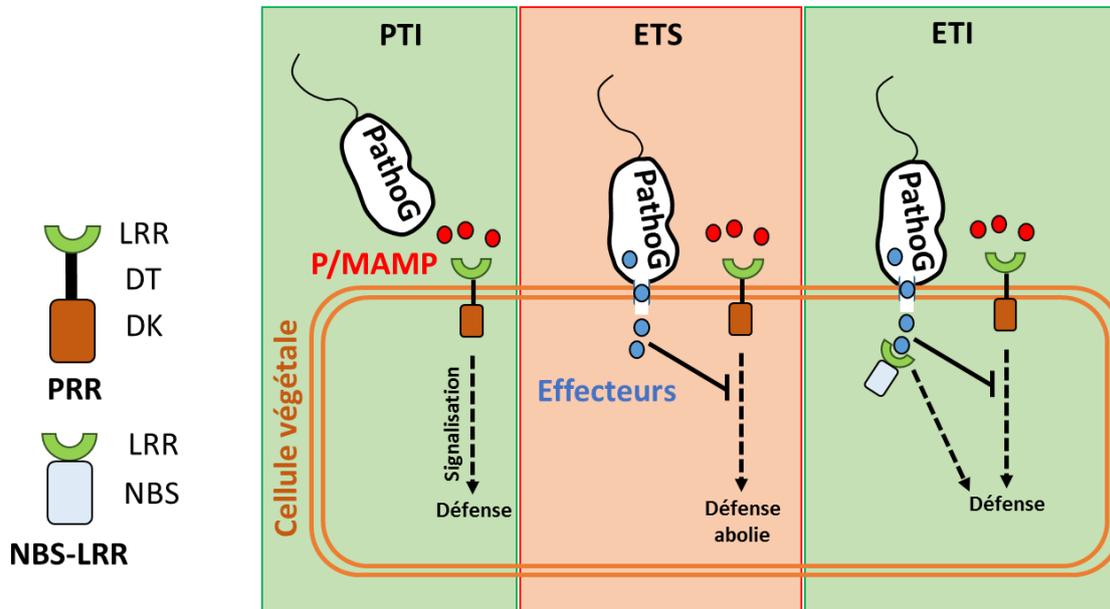
Les pathogènes dans certain cas peuvent bloquer la réponse M/PTI ; les bactéries pathogènes peuvent injecter via des systèmes de sécrétions des petites peptides, appelés effecteurs, au sein des cellules de la plante (Abramovitch et *al.*, 2006). Les systèmes de sécrétions agissent comme des « seringues moléculaires » en transperçant la membrane de l'hôte afin de transférer les effecteurs du cytoplasme de la bactérie à celui de la cellule hôte (Abramovitch et *al.*, 2006)

Une fois dans le cytosol les effecteurs reconnaissent certaines protéines associées à la signalisation P/MTI et bloquent leurs activités biochimiques(Abramovitch et *al.*, 2006), ce qui conduit dans certain cas, à un arrêt de la réponse immunitaire de l'hôte (Van Der Biezen & Jones 1998), dans ce cas on parlera d'une « Effector Trigger Sensitivity ou ETS » (Figure 1).

Dans le but d'éviter l'ETS, les plantes ont utilisé des récepteurs intracellulaires(Van Der Biezen & Jones 1998), Ces récepteur sont « des Nucléotide Binding Site (NBS)-LRR », qui reconnaissent les effecteurs et conduisent à une réactivation de la réponse immunitaire (Jiménez-dalmaroni et *al.*, 2015). Un NBS-LRR reconnaît qu'un seul effecteur (Jones & Dangl 2006) et aboutit de manière générale à une réponse plus intense de l'hôte, conduisant à l'activation de la mort cellulaire programmée (PCD) des cellules infectées (Figure 1 ; (Bigéard et *al.*, 2015)).

**Section I. Synthèse bibliographique**  
**Chapitre I. Introduction à l'immunité des plantes**

L'ETI vise à supprimer localement le pathogène, si ce dernier est bloqué on parlera d'Effector Trigger Immunity (ETI) (Jones & Dangl 2006). Le gène codant l'effecteur sera appelé gène d'*avirulence* ou *Avr* et celui codant le NBS-LRR, gène de *résistance* ou *R*.



**Figure 1. P/MTI, ETI et ETS.** Les pathogènes sont d'abord perçus par leurs P/MAMPs au niveau de récepteurs membranaires, les PRRs qui enclenchent la réponse immunitaire P/MTI. Certains pathogènes bloquent cette réponse par des effecteurs envoyés dans le cytoplasme de la cellule hôte et qui vont court-circuiter la signalisation immunitaire, pouvant conduire à une ETS qui abolie la défense. Afin de prévenir l'effet des effecteurs, les plantes utilisent des récepteurs intracellulaires, les NBS-LRR qui perçoivent les effecteurs et activent l'ETI conduisant à une réactivation et à une amplification de la réponse immunitaire (Berrabah 2016).

### III. Résistance acquies (Systemic et Local acquired resistance)

Suite à l'activation de l'ETI, une réaction hypersensible (ou HR) a lieu au niveau du site d'infection, elle est caractérisée par une accumulation de produit toxique et d'espèce réactive de l'oxygène ainsi que d'une mort cellulaire programmée (Ryals et al., 1996). Au tour de l'HR, les cellules renforcent leur parois par l'accumulation de callose, elle accumule des composés toxiques et expriment des gènes de défense. Ceci a pour objectif de confiner le pathogène en zone HR, cette réponse est appelée résistance acquies local ou LAR (Local Acquired Resistance ; (Ross 1961)).

## **Section I. Synthèse bibliographique**

### **Chapitre I. Introduction à l'immunité des plantes**

Au niveau de la plante entière, une augmentation du statut immunitaire est observée, elle est caractérisée par une activation des voies hormonales immunitaire telle que l'acide salicylique et celle du jasmonate (Yalpani et *al.*, 2007; Yan & Xie 2015). Ceci aboutit à l'expression de gènes immunitaires ainsi que de la production de métabolites secondaires (Kumar 2014; Wasternack 2007). Cette réponse globale est dénommée résistance systémique acquise ou SAR (Systemic Acquired Resistance), elle vise à prévenir toute nouvelle infection par le pathogène (Yalpani et *al.*, 2007).

#### **IV. Résistance systémique induite (ou ISR)**

La résistance systémique induite ou ISR (Induced Systemic Resistance) est définie comme étant une stimulation immunitaire des plantes induites par microorganismes non-pathogène. Dans la plus part des cas rapportés, il s'agit de PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Emmanuel et *al.* 2008). L'ISR est caractérisée par une augmentation du statut immunitaire des plantes suite à une stimulation liée à la voie des MAMPs et de l'activation de la voie du jasmonate, ainsi que celle de l'éthylène, une hormone immunitaire (Pieterse et *al.*, 1998). Une induction de l'expression de gènes immunitaire telle que *PDF 1.2* est observé lors de ce phénomène (Heil & Bostock 2002).

#### **V. Hormones & immunité**

##### **V. 1. Acide salicylique et Jasmonate**

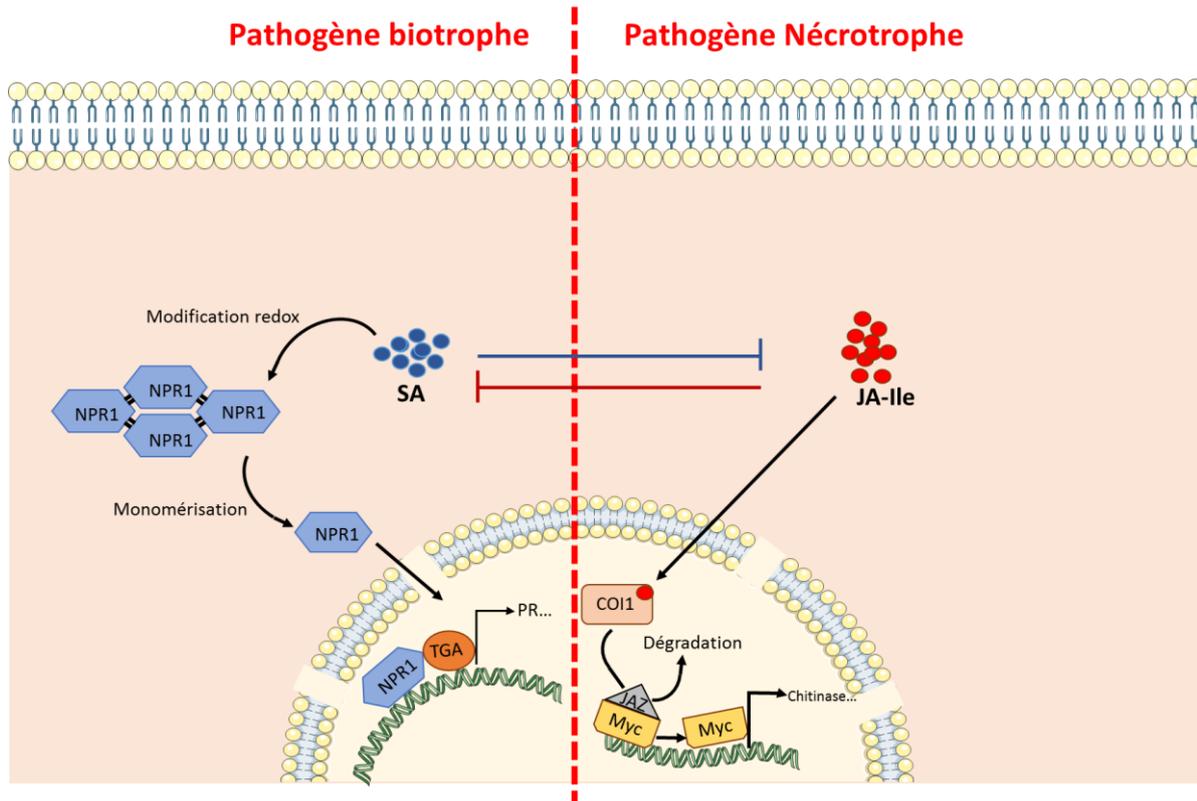
Tous au long de la réponse immunitaire, des voies hormonales sont activées et participent à la réponse immunitaire. Selon le mode trophique du pathogène on peut distinguer deux grands types de voie hormonales ; celles activées par les pathogènes biotrophes qui se nourrissent de tissus vivant, les biotrophes activent la voie de l'acide salicylique (SA) (Kumar 2014). La voie activée par les pathogènes nécrotrophes qui se nourrissent de tissus mort, ces pathogènes activent la voie de l'acide jasmonique (JA) et de l'éthylène (Loon et *al.* 2006).

L'acide salicylique induit des variations d'oxydo-réductions au sein des cellules cibles, ce qui aboutit la monomérisation de NPR1 qui est sous-forme de complexes au sein de la cellule. NPR1 est transloqué dans le noyau dans lequel il interagit avec le facteur de transcription TGA et active l'expression de gènes de réponse au SA, tel que le gène de défense PR1 (Figure 3) (Kumar 2014).

## Section I. Synthèse bibliographique

### Chapitre I. Introduction à l'immunité des plantes

Le JA quant à lui active l'expression des gènes en se fixant sur la E3 ligase COI1, qui suite à la fixation du JA, induit la dégradation de JAZ, un répresseur transcriptionnel du FTsMyc, ce dernier est activé après la dégradation de JAZ et stimule l'expression des gènes de réponse au JA (Song et al. 2014; C. M. J. Pieterse et al. 2012) (Figure 3). Les voies du SA et du JA sont antagonistes, ce qui permet à la plante de déterminer une spécificité de réponse entre pathogène biotrophes et nécrotrophes (Pena-Cortés et al. 1993; M. J. Pieterse et al. 2012).



**Figure 2. La signalisation liée à l'acide salicylique et le jasmonate.** L'accumulation du SA au niveau intracellulaire provoque une modification du statut redox conduisant à une réduction des ponts disulfures entre les facteurs NPR1 se trouvant à l'état polymérique. Une fois sous forme de monomère, NPR1 est transloqué dans le noyau où il active en collaboration avec le facteur de transcription TGA l'expression de gènes cibles. Le JA active une ubiquitine ligase COI1 qui dégrade un répresseur transcriptionnel JAZ, conduisant à l'activation du facteur de transcription Myc et à l'induction de l'expression des gènes de réponse au JA. Les deux voies hormonales sont antagonistes (Berrabah et al. 2018).

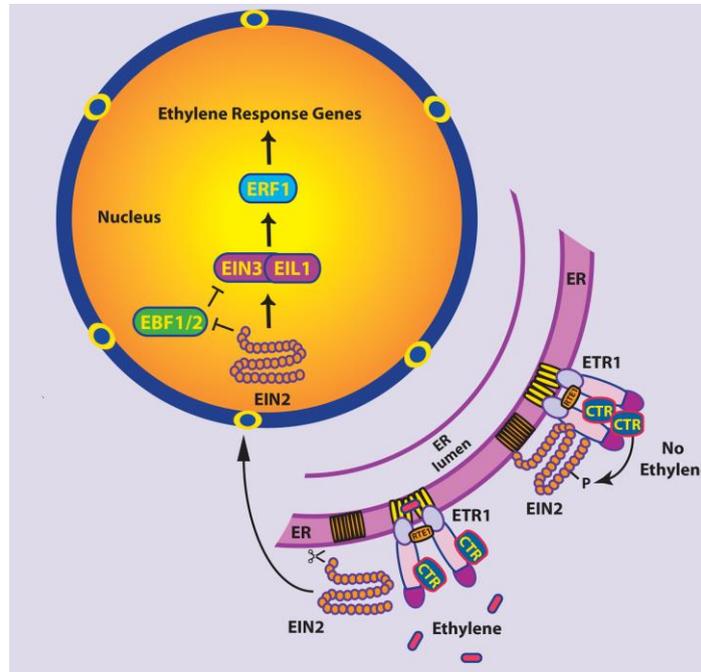
#### V.2. Ethylène

L'éthylène est une hormone volatile dont les récepteurs sont localisés sur le réticulum endoplasmique (RE). Cette hormone se fixe sur ETR1 ce qui induit une répression de CTR1,

## Section I. Synthèse bibliographique

### Chapitre I. Introduction à l'immunité des plantes

une kinase qui phosphoryle EIN2 un régulateur transcriptionnel. Quand EIN2 est déphosphorylé, il s'auto-clive et se libère du RE pour aller vers le noyau, dans lequel il interagit avec EIN3 pour induire l'expression des facteurs de transcription ERFs. Ces derniers activent l'expression des gènes de réponse à l'éthylène (Daniel . Gallie 2015).



**Figure 3. Mécanismes moléculaires de perception de l'éthylène.** Suite à la fixation sur ETR1, l'éthylène conduit à la pression de CTR1 et à la déphosphorylation d'EIN2. Cette dernière s'auto-clive et est transloquée dans le noyau. Au sein duquel il active les gènes de réponse à l'éthylène par l'activation d'EIN2/EIL1 et l'inactivation d'EBF1/2 (Daniel R Gallie 2015).

L'éthylène a souvent été associé à la réponse des plantes aux nécrotrophes, mais participe aussi dans la régulation du phénomène infectieux au cours d'interaction bénéfique telle que la symbiose fixatrice d'azote (Berrocal-Lobo et al. 2002) ; (C. M. J. Pieterse et al. 2012) ; (Zhu et al. 2011).

## Section I. Synthèse bibliographique

### Chapitre II. Les Pathogenesis-related Proteins

#### I. Définition

Les protéines liées au pathogènes (PRs) composent une famille hétérogène dont les membres présentent des activités biologiques différentes (tableau 1). mais qui sont tous induit en réponse aux pathogènes ou des molécules mimant l'infection des pathogènes ou un stress similaire (Agarwal & Agarwal 2014); (Sels, Mathys, De Coninck, et *al.*, 2008).

Les PRs peuvent influencer l'immunité en agissant directement sur les pathogènes, par exemple en formant des pores dans les enveloppes, elles peuvent aussi agir sur la signalisation cellulaire afin de stimuler l'immunité (Rahnamaeian et *al.* 2015; Robinson et *al.*, 2012; Tintor et *al.*, 2013; Valente et *al.*, 2013). Par exemple la PR10 est une endonucléase largement utilisée comme marqueur de la réponse des plantes aux pathogènes, elle active la mort cellulaire programmée et induit les voies de défense (Fernandes et *al.*, 2013; Somssich et *al.* 1986).

#### II. Classification des PRs

Une première classification des PRs a été réalisé en 1994, basé sur des critères tel que des aspects moléculaires, biochimiques, et activités biologiques/enzymatiques. Initialement 11 familles ont été isolées chez le tabac et la tomate (Van Baarlen et *al.* 2007). Par la suite ce nombre a été révisé pour passer à 17 familles réparti entre les monocotylédones et les dicotylédones. Pour cela de nouveaux critères ont été inclus notamment les profils d'expression, les PRs présentes doivent présenter une expression absente ou basale dans les tissus et augmenté lors de la réponse immunitaire, par ailleurs l'induction d'expression doit être conforter par plusieurs laboratoires indépendants (Sels, Mathys, De Coninck, et *al.*, 2008). Le tableau 1 présente les différentes classes de PR ainsi que leur activité biologique (Tableau 1).

**Section I. Synthèse bibliographique**  
**Chapitre II. Les Pathogenesis-related Proteins**

**Tableau 1. Activité biologique et sites d'actions de 17 classes de protéines PR**(Loon et al. 2006).

Classe des PRs		Site d'action	Activité biologique défensive
PR1	Antifongique (oomycètes)	?	?
PR2	$\beta$ -1,3-glucanase	Paroi fongique	Attaquent les polysaccharides de la paroi de l'agent pathogène
PR3	Chitinases, types I, II, IV, V, VI et VI	Paroi fongique	Attaquent la chitine (champignons, insectes, nématodes)
PR4	Chitinases, type I, II	Paroi fongique	Activité lectine (inactivation de glycoprotéines)
PR5	Thaumatin-like, osmotics	Membrane plasmique	Perméabilisation de la membrane fongique Résistance au choc osmotique et au froid
PR6	Inhibiteur de protéase	Protéases	Inhibiteurs de protéases
PR7	Endoprotéinase	Protéines et bactérienne	Endoprotéase Dissolution de la paroi de l'agent pathogène
PR8	Chitinases, types III et lysosyme	Paroi fongique	Activité chitinase et/ou lysozyme
PR9	Peroxydase	HR, lignine,	Détoxification du peroxyde d'hydrogène Synthèse de lignine
PR10	Bet v 1-like	ARN	Activité ribonucléase Transport de stérols, de cytokines
PR11	Chitinases classe I	Paroi fongique	Endochitinases
PR12	Défensines	Membrane plasmique	Antimicrobiens
PR13	Thionines	Membrane plasmique	Membranotoxines (perméabilisation) Antimicrobiens
PR14	Protéines de transfert de lipides (LTP)	Phospholipides membranaire	Transport de lipides Protection de la membrane (cutine, subérine) Antimicrobiens
PR15	Oxalate-oxydase	Membrane plasmique	Superoxydedismutase
PR16	Oxalate-oxydase-like	Membrane plasmique	Superoxydedismutase
PR17	Inconnu	?	?

## Section I. Synthèse bibliographique

### Chapitre II. Les Pathogenesis-related Proteins

Les PR1 présentent une activité biochimique non-identifiée. Les PRs de classe 2 font partie des  $\beta$ -1,3-glucanases (glucan endo-1,3- $\beta$ -glucosidases) qui catalysent l'hydrolyse des  $\beta$ -1,3-glucans, dégradent les parois fongiques et génèrent des éliciteurs. Les PR3, 4, 8 et 11 sont des chitinases. Les PR3 hydrolysent les bandes  $\beta$ -1,4 glycosidiques qui lient les résidus N-acetylglucosamines de la chitine et présente des activités antimicrobiennes (Loon 1997). Les PR4 sont des endochitinases (JM et al. 1996) et possèdent un domaine Brawin en position c-terminale, elles sont inductibles par différents pathogènes. Les PR5 incluent les permatines, les osmotines, les zeamatines et les thumaline-like protéine (TLP). Ces dernières causent des chocs osmotiques par la formation de pores dans les membranes plasmiques. Les PR6 sont des inhibiteurs de protéases, elles réduisent la capacité des pathogènes à utiliser leurs enzymes lytiques et d'ainsi de compléter leur cycle infectieux (Sels, Mathys, De Coninck, et al., 2008; Sels, Mathys, Coninck, et al., 2008).

Les PR7 sont des endopeptidases caractérisées chez la tomate (Vera P 1998). La famille des PR9 fait partie des peroxydases, enzymes clés dans la construction des parois cellulaires. Elles catalysent la déposition de la lignine et le renforcement des parois lors d'attaques pathogènes (Taheri & Tarighi 2011). Les PR-10 sont des protéines végétales ubiquitaires, largement conservées au cours de l'évolution (Elbez et al. 2002), elles possèdent des activités ribonucléase et antimicrobienne, elles interviennent notamment dans la mort cellulaire programmée au cours de la réponse immunitaire (Besbes et al. 2018).

Les PR-12 sont des défensines, cette famille de protéine est impliquée dans la formation de pores au sein des membranes plasmiques des bactéries et des champignons pathogènes. Les PR13 sont décrites comme des thionines, elles possèdent des effets antimicrobiens en perméabilisant les membranes cellulaires. Les thionines sont une source de soufre retrouvée en tant que protéines de stockage dans les graines. Les PR14 sont des protéines de transfert de lipides (LTP), elles interviennent dans la synthèse de la cutine, la  $\beta$ -oxydation, la défense des plantes ainsi que dans la signalisation immunitaire. Les PR15 et PR16 sont induites par différents pathogènes tels que *Erysiphegraminis* et possèdent une activité oxalate oxydase (Sels, Mathys, De Coninck, et al., 2008).

## Section I. Synthèse bibliographique

### Chapitre II. Les Pathogenesis-related Proteins

#### II. Les PR dans la réponse aux stress

Les gènes codant les PRs procurent une résistance à la fois aux stress abiotique et biotique (Agarwal & Agarwal 2014); (Ali et al. 2018). Ils font partie des candidats les plus prometteurs pour développer de multiples variétés de cultures tolérantes au stress, par exemple les PR2 et PR3 protègent les cellules endommagées par le froid (Ali et al. 2018).

Les PRs agissent de différentes manières lors de la réponse des plantes aux stress, elles peuvent notamment agir directement sur les pathogènes, la PR1 existe sous forme acide et basique, elle exhibe un pouvoir antimicrobien. De plus cette protéine est considérée comme un marqueur de la SAR chez de nombreuses plantes (Mitsuhashi et al.). La PR5 montre un effet antifongique contre *Candida albicans*, *Neurospora crassa*. Les auteurs suggèrent que la PR5 peut potentiellement créer des pores dans les membranes induisant un choc osmotique. La PR5 seule ne peut produire cet effet, il y a potentiellement des interactions électrostatiques entre la PR5 et d'autres composés cellulaires, Cette hypothèse est supportée par le fait que l'ajout de NaCl supprime l'effet des PR5 sur la germination des spores de *Trichoderma* (Kitajima & Sato 1999).

La PR10 présente une induction en réponse au pathogène *Magnaporthe oryzae*, cette induction est observée lors avec des souches d'interactions compatibles (conduisant à l'expression des symptômes) et incompatibles (sans effets sur la plante). Lors du second type, la plante produit une réponse immunitaire pouvant parvenir à bloquer la souche, elle est caractérisée par une induction précoce de la PR10 (24 heures) par rapport à l'interaction compatible (72 heures). L'induction précoce de PR10 conduit à une réaction hypersensible au bout de 36 heures (NS et al. 2001). La PR10 est aussi stimulée chez le tabac en réponse au virus de la mosaïque du tabac (TMV) (Park et al. 2004) et chez *M. truncatula* en réponse aux pathogènes *Aphanomyces euteiches* (Colditz et al. 2014). Il est postulé que la PR10 intervient dans l'induction de la mort cellulaire programmée ainsi que dans l'activation de la signalisation immunitaire (Park et al. 2004); (Sels, Mathys, De Coninck, et al. 2008).

Les PRs sont aussi identifiées en tant qu'agent antibactérien, plusieurs études ont montrées l'effet antibactérien in vitro des : PR10, PR12, PR13 et PR14 (Park et al. 2004; Patkar & Chattoo 2006; Jiang et al. 2015). La classe 10 des PRs présente un effet contre *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *A. radiobacter*, *P. aureofaciens* et *Serratia marcescens* (Xie et al. 2010); (Jiang et al. 2015). La surexpression de

**Section I. Synthèse bibliographique**  
**Chapitre II. Les Pathogenesis-related Proteins**

PR14 chez le riz conduit à une augmentation de la résistance aux pathogènes bactériens, mais aussi fongiques (Patkar & Chattoo 2006).

**III. Régulation des PRs**

Un nombre important d'études ont montrées que les PRs sont significativement induite en réponse aux stress abiotique et biotique (Ali et al. 2018; NS et al. 2001; Jiang et al. 2015). Les PR1 sont des marqueurs de l'activation de la voie hormonale du SA. En plus de la classe 5, les PR1 sont induites en réponse à l'éthylène dans les feuilles de tabac en réponse au stress salin. L'induction de l'expression des PR1 et PR5 par l'éthylène est dépendante du récepteur ETR ainsi que des ERF (facteur de transcription de réponse à l'éthylène) (Agarwal & Agarwal 2014).

En plus de l'éthylène et de l'acide salicylique, et le jasmonate activent l'expression d'une grande partie des PRs (Agarwal & Agarwal 2014). La PR6 qui présente un pouvoir anti protéase est induite par le stress mécanique et la voie du jasmonate et de l'éthylène, elle intervient dans notamment lors de l'ISR (Heil & Bostock 2002).

## Section I. Synthèse bibliographique

### Chapitre III. La symbiose fixatrice d'azote

#### I. Définition de la symbiose

La symbiose est définie comme un processus au cours duquel deux ou plusieurs organismes s'associent afin de réaliser des échanges à bénéfice mutuel (Berrabah et *al.*, 2018). Les plantes ont la capacité d'établir des interactions symbiotique avec des organismes fongique lors de mycorhize ou des bactéries lors de la symbiose fixatrice d'azote (Salvioli et *al.*, 2015); (Stacey et *al.*, 2006). La symbiose mycorhizienne est très répandue chez les végétaux, alors que la symbiose fixatrice d'azote est limitée quant à elle aux légumineuses (Op den Camp et *al.*, 2011).

Au cours de notre travail nous nous sommes intéressés à la symbiose fixatrice d'azote. Ce processus permet d'obtenir de l'azote organique au sein d'environnement qui en sont dépourvus (Oldroyd et *al.*, 2011). Chez les plantes la nutrition azotée est assurée par l'absorption de l'azote minéral du sol par les racines (Murray et *al.*, 2016). Le processus de fixation d'azote atmosphérique est une seconde voie et permet aux légumineuses d'être cultivées sur des milieux pauvres en azote et sans apport d'engrais azotés (Dénarié 2009).

#### II. La symbiose rhizobia-légumineuses

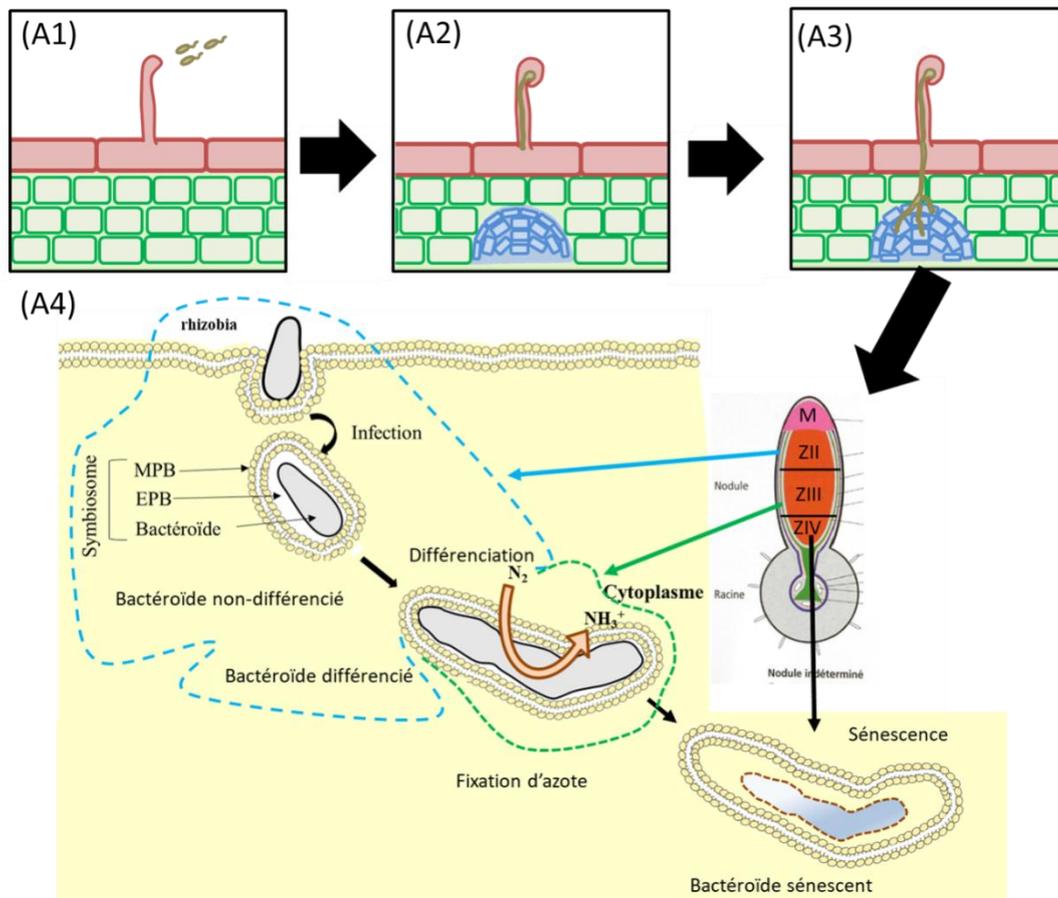
Les légumineuses sont des plantes de la famille des fabacées. Elles ont la capacité de croître dans des environnements pauvres en azote. Cela est permis grâce à l'association symbiotique qu'elles réalisent avec des bactéries du sol fixatrices d'azote, les rhizobia (Berrabah, Hosseyn, et *al.*, 2018). En condition de carence en azote, les légumineuses telles que la plante modèle *Medicago truncatula*, secrètent des flavonoïdes perçus au niveau intracellulaire par le facteur de transcription NodD chez les rhizobia (Oldroyd et *al.*, 2011). Suite à la fixation des flavonoïdes, NodD active l'expression du cluster de gènes Nods qui est responsable de la biosynthèse de chitoooligosaccharides nommés facteurs de nodulation (ou facteur Nod ; (Morière et *al.* 2013)).

La plante perçoit les facteurs Nod par des récepteurs membranaires de la famille des LysM-RLK, chez *M. truncatula* NFP et Lyk3 sont impliqués dans la liaison aux facteurs Nod (Rival et *al.* 2012; Limpens et *al.*, 2003; Mbengue et *al.* 2010; Rival et *al.*, 2012). Suite à la perception des facteurs nod, une signalisation symbiotique est activée, elle conduit un influx de calcium, l'accumulation de ROS, des phénomènes de phosphorylation/déphosphorylation et à l'expression de gènes symbiotiques (Mitra et *al.*, 2004); (Peleg-grossman et *al.*, 2012); (Lévy et *al.* 2004).

**Section I. Synthèse bibliographique**  
**Chapitre III. La symbiose fixatrice d'azote**

Suite à l'activation des voies de signalisation cellulaire, un phénomène d'infection des racines par les rhizobia a lieu, au cours duquel les bactéries pénètrent via les poils absorbants et croît en direction du cortex racinaire. Parallèlement à ce processus, une réactivation de la division des cellules du cortex a lieu au niveau du site d'infection et conduit à la formation du futur primordium nodulaire (Gamas *et al.* 2017). A la fin du processus, un nouvel organe racinaire est formé, la nodosité fixatrice d'azote (Figure 4 ; (Berrabah, Hosseyn, *et al.* 2018)).

Section I. Synthèse bibliographique  
Chapitre III. La symbiose fixatrice d'azote



**Figure 4. L'endosymbiose *Medicago-Sinorhizobium*.** En condition de carence en azote, la symbiose est enclenchée, au cours de ce processus un dialogue moléculaire à lieu (A1), puis *Sinorhizobium* infecte les racines de la plante via leurs poils absorbants, parallèlement à cela une réactivation de la division des cellules du cortex à lieu (A2) formant le primordium nodulaire, qui est infecté par la bactérie (A3). A la suite de ce processus, nouvel organe racinaire est formé, la nodosité fixatrice d'azote, qui est de forme allongée et contient différentes zone : la zone meristematique (M), la zone II au sein de laquelle les bactéries pénètre de manière endocellulaire donnant naissance au symbiosome qui consiste en un bacteroid (forme intracellulaire du rhizobium), entouré d'une membrane peri-bacteroidienne (MPB) séparé du bacteroid par un espace peri-bacteroidien (EPB). Au sein de la zone II chez *M. truncatula*, les bacteroids subissent un processus de différenciation caractérisé par une augmentation de la taille du bacteroid. Au sein de la zone III, la bactérie réduit l'azote atmosphérique  $N_2$  en forme assimilable par la plante ( $NH_3^+$ ). Enfin quand la nodosité est âgée, quand la plante est stressée ou quand une source d'azote est ajoutée dans le milieu, la zone IV apparait au sein de laquelle l'ensemble des composés cellulaire hôte sont dégradés et recyclés (Gourion et al. 2015); (Berrabah, Balliau, et al. 2018); (Oldroyd et al. 2011).

## Section I. Synthèse bibliographique

### Chapitre III. La symbiose fixatrice d'azote

#### III. La nodosité fixatrice d'azote

Une nodosité fixatrice d'azote est un organe au sein duquel les rhizobia transforment l'azote atmosphérique ( $N_2$ ) en azote organique assimilable par l'hôte ( $NH_3^+/NH_4^+$ ; (Udvardi & Poole 2013). *M. truncatula* forme des nodosités de type indéterminé caractérisé par une forme allongée et une zonation des tissus. La première zone (ZI) est un méristème apical responsable de la croissance en longueur de l'organe et de sa forme. Adjacent la zone I, la zone II ou zone d'infection est colonisée par les rhizobia qui infectent de manière intracellulaire les cellules de la plante (Berrabah, Hosseyn, et al. 2018). Chez *M. truncatula* au sein de la zone II, les bacteroids (désigne la forme intracellulaire du rhizobium) subissent une différenciation caractérisée par une augmentation de la taille de la bactérie passant de  $1,5\mu m$  à  $7\mu m$  (Velde et al. 2010) et une élévation du nombre de copie du génome, pouvant atteindre jusqu'à 32 copies (Kereszt et al. 2011). Au sein de la zone III ou zone de fixation, les bacteroids différenciés réduisent l'azote atmosphérique sous l'action de l'enzyme nitrogénase codé par le cluster de gène *nifHDK* (Fischer 1994).

Lorsqu'une nodosité devient trop âgée, lorsque la plante est stressée ou que de l'azote organique est ajouté au milieu, une quatrième zone apparaît, il s'agit de la zone de sénescence ou zone IV. Au sein de laquelle les bacteroids puis les composés de la cellule hôte sont détruits et recyclés (Van de Velde et al. 2006; Berrabah, Hosseyn, et al., 2018). Suite au processus de sénescence, les cellules se vident complètement, seulement des parois vides subsistent à la base de l'organe, néanmoins cette zone peut être recolonisée par des microorganismes à l'état saprophyte (Timmers et al., 2000).

#### IV. Répression de l'immunité au cours de la symbiose

##### IV.1. Répression au cours des étapes précoces

Les rhizobia ont la capacité de stimuler des réponses immunitaires chez des plantes non-hôtes (non-légumineuses); (Baier et al. 1999), mais aussi chez des plantes hôtes (Gourion et al. 2015). Une induction de l'expression des gènes de défense a lieu aux premières étapes de l'interaction symbiotique (Maunoury et al. 2010). Une répression immunitaire est mise en place afin de permettre la symbiose, elle est représentée par une répression massive de l'expression des gènes de défense.

Différentes stratégies sont élaborées par les rhizobia pour éviter, réduire ou bloquer la stimulation de la réponse immunitaire de l'hôte (Gourion et al. 2015); les

## Section I. Synthèse bibliographique

### Chapitre III. La symbiose fixatrice d'azote

exopolysaccharides (EPS) contribuent à masquer les MAMPs et réduisent la signalisation immunitaire en bloquant l'absorption du  $\text{Ca}^{+2}$  extracellulaire (Aslam et al., 2008). Les rhizobies au cours de leur évolution ont modifiés certains MAMPs afin d'éviter une stimulation de la réponse chez l'hôte. Par exemple *Sinorhizobium meliloti* (le symbionte de *M. truncatula*) présente un peptide flg22 avec une structure différente de la structure canonique de ce type de peptide (Lopez-Gomez et al., 2012). Des effecteurs symbiotiques dits (Nodule Outer Protein (NOPs)) peuvent être utilisés pour réprimer la réponse immunitaire de l'hôte par exemple : la souche NGR243 bloque la signalisation immunitaire en produisant des effecteurs symbiotiques qui sont injectés via le système de sécrétion de type III au sein des cellules hôte (Ge et al., 2016). La plante de son côté réprime son immunité via la signalisation symbiotique ou la mise en place de gènes spécifiques (Gourion et al., 2015).

#### IV.2. Répression au cours des étapes tardives

Une fois la nodosité formée, plusieurs gènes impliqués dans la répression des défenses ont été décrits ; *NAD1*, *DNF2*, *SymCRK* et *RSD* code respectivement une protéine de fonction inconnue, une phospholipase C phosphatidyl-inositol dépendante putative, un RLK de la famille des Domain de Fonction Inconnue 26 (ou DUF26) et un facteur de transcription de type  $\text{C}_2\text{H}_2$  respectivement (Berrabah, Bourcy, Eschstruth, et al. 2014; Marie et al. n.d.; Sinharoy et al. 2013). Les mutants correspondants présentent une réactivation de la réponse immunitaire au sein de leurs nodosités caractérisée par une induction de l'expression de gènes de défense, l'accumulation de composés phénoliques et une mort des bacteroids. Le mécanisme par lequel fonctionnent ces gènes est actuellement inconnu, mais certains facteurs influencent le phénotype des mutants ; quand *dnf2* est cultivé dans un milieu sans Ulvan (une molécule potentialisant les réponses immunitaires), il produit des nodosités fixatrices d'azote, ce qui indique que l'environnement influence le phénotype du mutant (Berrabah, Bourcy, Cayrel, et al. 2014a). Les mutants *symCRK* et *rsd* présentent une forte réduction de la réponse immunitaire au sein de nodosité induite par *bacA* (Berrabah et al. 2015), qui est incapable de coloniser de manière effective les nodosités (Haag et al. 2011). Cette observation suggère que l'infection correcte des tissus et/ou la différenciation des bacteroids sont requises pour la stimulation des défenses chez ces mutants (Berrabah et al., 2015).

## Section I. Synthèse bibliographique

### Chapitre III. La symbiose fixatrice d'azote

#### V. La sénescence

##### V.1. Physiologie de la sénescence

La sénescence est un processus par lequel les plantes dégradent de manière progressive les constituants d'une cellule ou d'un tissu et les recycle au cours de la lyse (Van de Velde et al., 2006). Au cours de la sénescence des nodosités la zone IV est mise en place. Au sein de cette zone les bacteroids puis les cellules hôtes sont dégradées, il en résulte la présence de cellules vides à la base de la nodosité (Van de Velde et al., 2006), ce tissu peut être recolonisé par des rhizobias qui vivent de manière saprophyte (Timmers et al., 2000).

On peut distinguer deux types de sénescence ; **i**) la sénescence développementale qui a lieu lorsque l'organe devient trop âgé et **ii**) la sénescence prématurée ou induite, qui a lieu lorsque les plantes subissent un stress ou qu'une source organique d'azote telle que les nitrates, sont ajoutés aux plantes (Pérez Guerra et al., 2010; Van de Velde et al., 2006). L'analyse comparative des transcriptomes de nodosités subissant de la sénescence développementale ou induite par l'obscurité a révélé la présence de gènes exprimés de manière commune et différentielle, suggérant la présence d'une voie partagée et d'une voie divergente entre la sénescence développementale et la sénescence induite (Pérez Guerra et al., 2010).

##### V.2. Les Cystéine protéase

Les cystéines protéase (CPs) sont des protéines qui possèdent une activité protéolytique (Pierre et al. 2014), certaines d'entre elles (CP1 à CP6) sont spécifiquement exprimées au cours de la sénescence et sont proposées comme étant les effecteurs de ce processus (Guerra et al. 2010). Le silencing de *MtCP6* et de *VacuolarProcessing Enzyme. (MtVPE)* retarde la sénescence des nodosités (Pierre et al. 2014), ces deux protéines se localisent au symbiosome, il est postulé qu'elles jouent un rôle dans la dégradation de ces organites au cours de la sénescence (Pierre et al., 2014).

L'oxyde nitrique (NO) est une molécule qui stimule la sénescence des nodosités, la souche de *Sinorhizobium meliloti* sur-exprimant le gène *hmp* qui code flavohaémoglobine (protéine impliquée dans la détoxification du NO) induit la formation de nodosités qui présentent une sénescence retardée (Cam et al., 2012).

## Section I. Synthèse bibliographique

### Chapitre IV. Contexte de l'étude et problématique

#### I. Sénescence Vs. Immunité

La sénescence des nodosités a toujours été considérée comme un phénomène développemental qui n'avait pas de liaison avec l'immunité. Chez des espèces telles qu'*A. thaliana* un nombre croissant d'études démontrent la présence d'une connexion entre les deux processus (Singh et al. 2002; Robatzek & Somssich 2001) ; dans ces études une réactivation de l'immunité est observée au cours de la sénescence. Chez les légumineuses, les mutants *dnf2*, *symCRK*, *nad1* présentent un défaut de répression de l'immunité, mais aussi une ZIV est apparait de manière précocement (Wang et al. 2016; Berrabah et al. 2014) ; ce qui indique que les deux évènements sont potentiellement connectés. Par ailleurs certains mutants formant des nodosités non fonctionnelles et présentant une sénescence précoce (Maunoury et al. 2010; Berrabah et al. 2015; Berrabah et al. 2014b), ne produisent pas de réaction de défense au sein de leurs nodosités, ce qui indique la présence de différentes voies d'induction de la sénescence et que cette dernière n'ai pas systématiquement connectée à l'immunité.

#### II. Données Préliminaires

Lors d'études précédentes réalisées au sein du département et dirigées par le Dr. Fathi Berrabah l'activation de l'immunité a été sous-lignée lors de la sénescence, mais aussi lors de la symbiose, bousculant les idées reçues sur l'interconnexion de ces évènements au cours de ce phénomène.

Lors de la symbiose, une répression massive de l'expression des PRs est observée. Cette expression est réactivée au sein des nodosités après l'ajout de nitrate à des plantes nodules indiquant un rôle de l'immunité au cours du processus de sénescence. L'étude précédente, pionnière, s'est focalisée sur deux classe de PRs : 5 & 10, elle révélée une stimulation de certaines de ces PRs tous au long du processus symbiotique (Berrabah et al, eu cours de rédaction). La réinterprétation du protéome de *M. truncatula*, à révéler la présence d'une PR de classe 4 préférentiellement accumulé au sein du symbiosome. L'ensemble de ces travaux procure de solides arguments pour une investigation plus poussée du rôle des PRs au cours de la symbiose.

**Section I. Synthèse bibliographique**  
**Chapitre IV. Contexte de l'étude et problématique**

**III. Problématique de l'étude**

Lors des études précédentes, une description préliminaire des familles des PRs a été réalisée et une analyse globale de leurs niveaux d'expressions a permis de mettre en évidence leur rôle potentiel au cours de la symbiose et de la sénescence. Par ailleurs, seule la légumineuse *M. truncatula* a été concernée par cette analyse.

Au cours de notre travail, nous avons réalisé une analyse minutieuse des classes de PR5, PR10 chez *M. truncatula* afin de déterminer le nombre réel de gènes dans la famille, ainsi que d'évaluer l'implication spécifique de chaque classe au cours du phénomène de sénescence.

Afin de vérifier si l'induction des PRs au cours de la sénescence a été spécifique à *M. truncatula*, ou pouvait-elle être étendue à d'autres légumineuses, une analyse des PRs chez la légumineuse *Glycine max* a été réalisée.

## Section II. Matériels et Méthode

### I. Estimation du nombre de gènes associés à la pathogénie chez les plantes

Afin d'évaluer le nombre de gènes associée à la pathogénie au sein des végétaux nous avons utilisé la base de données Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>). Au sein de laquelle une recherche en utilisant le mot clé « pathogeniesis » est réalisée dans l'anglet « Tools ; Keyword Search ». Pour chaque espèces répertoriée au sein de la base de donnée, une évaluation est réalisée et le nombre de gènes annotés « pathogeniesis » est évalué.

### II. Identification des gènes chez *M. truncatula*

Une recherche en utilisant les bases de données : Phytozome, *Medicago truncatula* Genome Atlas (<http://www.medicagogenome.org>) et NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) est réalisée. Une double recherche est employée, tous d'abord en utilisant l'annotation (Pathogenesis-related Proteine), puis dans un second temps en réalisant des blasts en utilisant les séquences protéiques sur les sites *Medicago truncatula* Genome Atlas et NCBI.

### III. Ré-annotation des classes de PRs

Pour chaque PRs identifié, une classification est réalisée en se basant sur la présence de motifs protéiques portant l'activité biochimique caractéristique d'une des classes décrites dans la littérature. Pour cela la séquence codante de chaque gènes est traduite en utilisant la base de donnée ExPasy (<https://web.expasy.org/translate/>), puis la séquence traduite est analysée sur la base de donnée NCBI conserved domain (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). La classification de chaque PRs est ainsi confirmée ou corrigée.

### VI. Analyse des taux de conservations des séquences protéiques pour un PR de même classe

Afin de comparer les taux de similarité et d'identité, le logiciel MatGAT est employé (<https://omictools.com/matgat-tool>). Ce logiciel permet d'analyser ces paramètres en utilisant plusieurs matrix de score telle que BOLSUM50, BOLSUM62 et PAM250.

### VII. Analyse de la phylogénie moléculaire

L'analyse de la phylogénie est réalisée à partir des séquences protéiques pour chaque famille de PRs. Le logiciel MEGA7 est employé (<https://www.megasoftware.net/>). A partir des séquences de protéines une analyse comparative est réalisée par le logiciel, tous d'abord en utilisant l'option « Find best DNA/Prot Model » le logiciel détermine la meilleure méthode

## Section II. Matériels et Méthode

phylogénétique à employer en fonction des caractéristiques de chaque famille. Par la suite une analyse est réalisée en utilisant le modèle conseillé par l'application.

### VIII. Comparaison des séquences protéiques

Lors de l'étude, pour certaine famille une comparaison fine de certain domaine protéique est réalisée afin de déterminer les degrés de conservation des résidus d'acide aminée. Le logiciel BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) est employé, après introduction des séquences protéique, un alignement est réalisé en utilisant la méthode du ClusteralW.

### IX. Analyse de l'expression des gènes chez *M. truncatula*

Afin d'analyser les profils d'expression des PRs étudiée, nous avons utilisé la base de donnée (MtGEA : <https://mtgea.noble.org/>). Cette base de donnée regroupe l'expression des gènes de *M. truncatula* réalisée par technologie de puce à ADN pour des centaines de conditions de traitement biologique, chimique ou physique. Afin de déterminer l'expression des PRs, nous avons réalisé deux types de recherche, premièrement en utilisant l'annotation de la puce, pour la majorité des gènes nous avons pu déterminer le probset correspondant en utilisant la carte de correspondance fournie sur le site MtGEA. Pour les gènes qui n'ont pas été identifiés par cette première méthode, une recherche par blast est réalisée sur le site MtGEA, elle permet d'identifier en fonction de l'homologie, les probsets correspondant au gène testé. Nous avons à chaque fois privilégiée les probsets avec la plus grande homologie.

Les transcriptomes employée lors de l'étude sont ; des analyses d'expression au sein de nodosités traitées ou non à un herbicide, la phosphinotricine qui stimule la sénescence (Seabra et al. 2012). De nodosités traitées ou non avec des nitrates (Benedito et al. 2008). De racine inoculées avec les pathogènes *Ralstoniasolanacearum*, *Phymatotricumomnivorum* ou *Aphanomycesutriches*(Uppalapati et al. 2009; Huguet et al. 2013) ainsi que des mutants de *M. truncatula* altéré dans la voie de l'éthylène ou de la réponse aux facteurs nod.

### X. Identification des gènes chez *G. max*

Une recherche en utilisant les bases de données : Phytozome , et legume information systemedatabase (<https://legumeinfo.org>) et NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) est réalisée par utilisation de mot clé « Pathogenesis-relatedProteine » , premièrement en utilisant l'annotation Pathogenesis-relatedProteine, puis dans un second temps en réalisant des blast en utilisant les séquences protéiques sur les sites NCBI.

## Section II. Matériels et Méthode

la séquence codante de chaque séquence de gènes est traduite en utilisant la base de donnée Expasy (<https://web.expasy.org/translate/>), puis la séquence traduite est analysée sur la base de donnée NCBI conserveddomain (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). La classification de chaque PRs est confirmée et évaluée.

### **XI. Analyse de l'expression des gènes chez *G. max***

Dans le but d'analyser l'expression des PRs chez *G. max*, nous avons employé un transcriptome réalisé par technologie de RNAseq. Les auteurs ont étudié l'expression des gènes en condition symbiotique et sénescence (Song L Yuan et *al*). Nous avons d'abord isolé les gènes détectés en tant que PRs puis nous avons réinterprété les données obtenues.

### Section III. Résultats

#### I. Les « PathogenesisGenes » présentent une distribution hétérogène chez les plantes

Nous avons évalué l'importance des gènes codant les PRs chez les végétaux. Une analyse de cette famille chez plusieurs plantes a été réalisée. A partir de la base de données Phytozome, une recherche par mot clé en utilisant le terme « Pathogenesis » est faite pour 64 plantes de familles et de genres différents. La figure 5 représente les résultats obtenus.

Il est important d'indiquer<sup>34785</sup> que cette approche est estimative et ne représente pas le nombre réel de gènes étant donné que des variations peuvent être observées à cause des différences d'annotation des génomes qui peuvent être plus ou moins avancés en fonction des espèces et d'un biais pouvant être introduit par l'approche choisie.

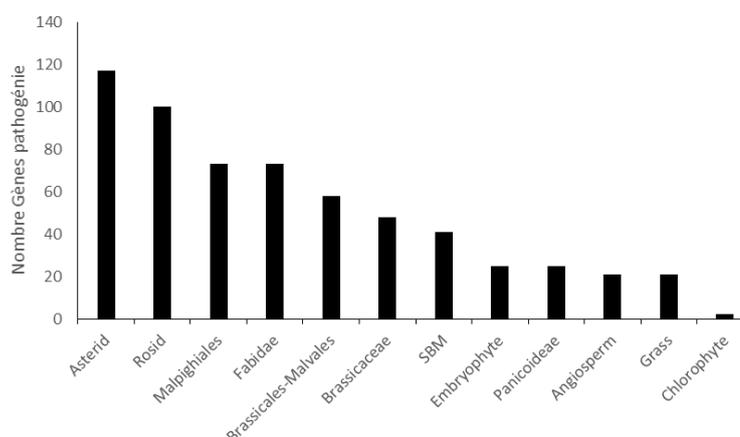
Le nombre de gènes varie de manière importante d'une famille de plante à une autre, les Astrid, Rosid, Malpighiales, Fabidae, Brasicaceae présentent plus de 40 gènes codants des protéines associés à la pathogénie, alors que les Embryophytes, les Panicoideae, Angiosperm, les plantes Grass et les chlorophytes présentent un nombre faible inférieur à 30 (Figure 5a). Ces observations suggèrent une répartition hétérogène de cette famille de gènes dans le royaume végétale.

Une analyse plus fine de la répartition des gènes indique que *SolanumLycopersicum* présente le plus grand nombre de gènes avec 272 gènes codant pour des *PathogenesisProteins*, alors qu'*Osterococcuslucrimarinus* n'en présente qu'un seul (Figure 5b). Ces résultats confortent ceux obtenus, ainsi *S. Lycopersicum* fait partie des Astrids, la famille présentant le plus grand nombre de gènes immunitaire, alors que *O. lucrimarinus* fait partie de la famille des chlorophytes qui présente le plus faible taux de gènes.

Les espèces pouvant établir des interactions symbiotiques avec les rhizobia (Famille des Fabidae) présente un nombre moyen de 73 gènes par espèce (Figure 5a), avec *Medicago truncatula* présentant le nombre le plus élevés avec 97 gènes (Figure 5b). Ce qui indique que les plantes ayant la capacité d'établir une association symbiotique présentent un potentiel immunitaire important.

### Section III. Résultats

(a)



(b)

<i>Solanum lycopersicum</i>	272	<i>Capsella grandiflora</i>	41
<i>Eucalyptus grandis</i>	156	<i>Citrus sinensis</i>	39
<i>Malus domestica</i>	106	<i>Boechera stricta</i>	39
<i>Solanum tuberosum</i>	99	<i>Sorghum bicolor</i>	36
<i>Medicago truncatula</i>	97	<i>Marchantia polymorpha</i>	34
<i>Kalanchoe laxiflora</i>	90	<i>Eutrema salsugineum</i>	34
<i>Linum usitatissimum</i>	86	<i>Oropetium thomaeum</i>	32
<i>Populus trichocarpa</i>	81	<i>Ananas comosus</i>	29
<i>Gossypium raimondii</i>	81	<i>Sphagnum fallax</i>	28
<i>Phaseolus vulgaris</i>	81	<i>Carica papaya</i>	28
<i>Arabidopsis thaliana</i>	80	<i>Musa acuminata</i>	27
<i>Glycine max</i>	77	<i>Arabidopsis halleri</i>	27
<i>Manihot esculenta</i>	69	<i>Oryza sativa</i>	22
<i>Salix purpurea</i>	68	<i>Selaginella moellendorffii</i>	21
<i>Cucumis sativus</i>	65	<i>Panicum hallii</i>	20
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	64	<i>Setaria viridis</i>	20
<i>Theobroma cacao</i>	64	<i>Spirodela polyrhiza</i>	18
<i>Brassica oleracea capitata</i>	62	<i>Setaria italica</i>	18
<i>Ricinus communis</i>	60	<i>Zea mays Ensembl-18</i>	18
<i>Prunus persica</i>	59	<i>Brachypodium distachyon</i>	16
<i>Brassica rapa</i>	56	<i>Amborella trichopoda</i>	15
<i>Aquilegia coerulea</i>	54	<i>Zea mays PH207</i>	15
<i>Arabidopsis lyrata</i>	51	<i>Zostera marina</i>	14
<i>Kalanchoe fedtschenkoi</i>	50	<i>Brachypodium stacei</i>	14
<i>Fragaria vesca</i>	50	<i>Physcomitrella patens</i>	13
<i>Trifolium pratense</i>	50	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	8
<i>Daucus carota</i>	49	<i>Volvox carteri</i>	2
<i>Mimulus guttatus</i>	49	<i>Dunaliella salina</i>	1
<i>Panicum virgatum</i>	46	<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	1
<i>Capsella rubella</i>	46	<i>Micromonas pusilla</i>	1
<i>Vitis vinifera</i>	43	<i>Micromonas sp. RCC299</i>	1
<i>Citrus clementina</i>	43	<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	1

**Figure 5. Représentation des « pathogenesisgenes » dans le royaume végétal.** (a) nombre moyen de gènes impliqués dans les fonctions de pathogénie chez différentes familles de plante. (b) nombre de gènes associés à la pathogénie pour 34 plantes.

**Section III. Résultats**  
**Chapitre II. Les PRs de *M. truncatula***

**II. L'analyse de l'expression des PRs indiquent une interconnexion entre la sénescence des nodosités et la réponse immunitaire**

Dans le but de mettre en évidence de manière claire l'importance de l'activation de la voie immunitaire lors de la sénescence des nodosités telle qu'énoncée par Mme. Souaiaia et Mme. Messaoudi. Nous avons comparé les profils d'expression de la famille des PRs chez *M. truncatula* entre des nodosités traitées à la phosphinotricine, un stimulateur de sénescence et une condition d'immunitaire avec la réponse des racines aux pathogènes bactérien *Ralstoniasolanacearum*.

Pour chaque gène, une recherche des sondes correspondant sur puce à ADN est réalisée. Nous avons pu identifier 66 sondes reconnaissant des transcrits issus de gènes codant des PRs. Pour chaque sonde une analyse de l'intensité de fluorescence est réalisée. La figure 6 présente les résultats obtenus. Une analyse comparative avec l'expression des cystéines protéases (CPs), gènes typiquement associés à la sénescence est réalisée pour les mêmes conditions.

L'analyse révèle que les PRs sont induites après traitement à la phosphinotricine (Figure 6a) et en réponse au pathogène *R. solanacearum* (Figure 6b). L'intensité de l'expression augmente avec le temps d'exposition à l'agent chimique ou biologique. Ces données montrent que les PRs peuvent être co-exprimées entre une condition de sénescence des nodosités et de réponse immunitaire.

Les cystéines protéases présentent une induction en réponse à la phosphinotricine (Figure 6c), ce qui corrèle avec le rôle de cette famille de gènes au cours de la sénescence des nodosités. De manière intéressante, ces gènes ne présentent pas un niveau d'expression différents entre des plantes inoculées avec *R. solanacearum* et le contrôle (Figure 6d). Ces résultats indiquent que cette famille de gènes est préférentiellement impliquée lors de la sénescence.

L'ensemble des observations montrent que les PRs sont co-stimulées lors de la sénescence et de l'immunité, alors que les CPs sont-elles plus spécifiques de la sénescence.



**Section III. Résultats**  
**Chapitre II. Les PRs de *M. truncatula***

Pour les classes de PR1, PR2, PR5, PR6 et PR10 le nombre de gènes a pu être évalué en se basant sur la fonction biochimique de la protéine ainsi que l'annotation. Pour plusieurs familles le nombre exact de gènes n'a pu être déterminée ou ne peut être correctement évaluée et cela à cause de la fonction chimique qui peut être impliqué dans diverse processus en dehors de l'immunité, par exemple les PR3, PR4, PR8 et PR12 code des chitinases, enzymes impliquées dans la dégradation des chitosanes. Les PR14 codent des protéines de transfert de lipide, leurs nombres en se basant sur l'annotation est de 122 gènes (Tableau 2).

Aucun gène correspondant au PR6 n'a été identifié, la classe des PR5 est la plus représentée avec 44 gènes, suivis des PR10, PR1 et PR2 avec 29, 16 et 3 gènes respectivement (Tableau 2).

**Tableau 2. Nombre de gènes codants des PRs pour les classes étudiées.** En noir le nombre de gènes déterminé, en rouge un nombre estimatif. Le point d'interrogation indique l'impossibilité de déterminer le nombre de gènes.

Classe	Nombre de gènes
PR1	16
PR2	3
PR3	<u>1</u>
PR4	<u>1</u>
PR5	44
PR6	0
PR7	<u>?</u>
PR8	<u>?</u>
PR9	<u>?</u>
PR10	29
PR11	<u>?</u>
PR12	<u>?</u>
PR13	<u>?</u>
PR14	<u>122</u>
PR15	<u>?</u>
PR16	<u>?</u>
PR17	0

Dans le but d'aller plus loin, nous avons réalisé une étude détaillée de chaque classe pour lesquels le nombre exact de gènes a été identifié. Les sections suivantes présentent les résultats obtenus.

### Section III. Résultats

#### Chapitre II. Les PRs de *M. truncatula*

#### IV. Les PR1 sont stimulées lors de la sénescence et de l'immunité

*M. truncatula* présente 16 gènes codant des PRs de classe 1. Les gènes se répartissent entre les chromosomes 2, 4, 5 et 8 de *M. truncatula*. L'analyse phylogénétique des protéines en utilisant la méthode du Maximum Likelihood basé sur le modèle de Whelan et Goldman révèle qu'elle se distribue en trois grandes branches évolutives distinctes (Figure 7a). Par ailleurs l'identité et la similarité révèle que les protéines présentent des degrés différents de ressemblance (Figure 7b), néanmoins l'ensemble des protéines présente le domaine CAP caractéristique de cette famille.

Afin d'évaluer l'implication des PR1 au cours des processus de sénescence et d'immunité, ainsi que de déterminer les facteurs hormonaux et biotiques contrôlant l'expression de ces gènes, une série d'analyse de données issus de transcriptomes obtenus par puce à ADN sont téléchargés à partir de la base de données du MtGEA.

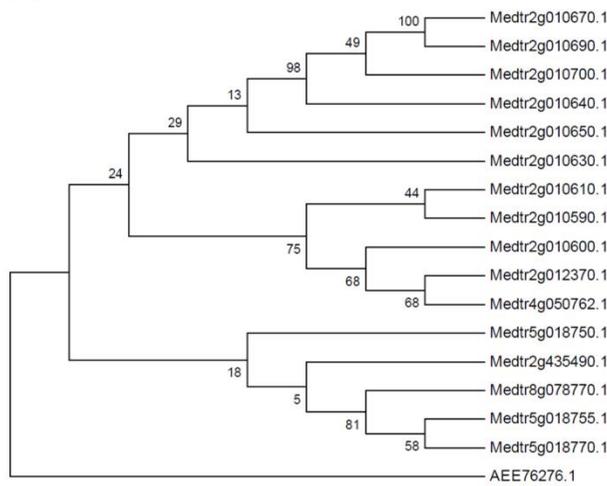
En réponse à un traitement des nodosités à la phosphinotricine les PR1 sont plus fortement exprimées qu'en condition contrôle (Figure 7c) avec un pic de stimulation à 4 et 8 heures post-traitement. Ceci suggère qu'au cours de la sénescence des nodosités les PR1s sont stimulées. Afin de conforter cette hypothèse, une analyse de l'expression de cette famille de gènes est réalisée au sein de nodosité traités au nitrate, un inducteur de sénescence (Figure 7d). De même manière, l'expression globale des PR1 est augmentée par rapport à des nodosités non-traitées.

L'étude de l'expression des PR1s en condition de réponse à quatre pathogènes : *Macrophomina* (Figure 7e), *R. solanacearum* (Figure 7f) et *Phymatotricum omnivorum* (Figure 7g), *Aphanomyces eutriche* (Figure 7h), révèle que cette classe de gènes est stimulée au cours de l'infection par *P. omnivorum* et *A. eutriche*. Ceci confirme que cette classe de PR est impliquée lors de la réponse immunitaire en plus du processus de sénescence.

L'analyse de la réponse du mutant de *M. truncatula* *sickle* insensible à l'éthylène (Figure 7f) et du mutant *nfp* incapable percevoir les facteurs nod (Figure 7h) en réponse aux pathogènes *P. omnivorum* et *A. eutriche* respectivement, montrent que le profil d'expression des PR1 est modifié chez les mutants étudiés. Une augmentation globale du niveau d'expression chez les deux mutants en réponse aux pathogènes est observée. Ces résultats indiquent que l'inactivation de la voie liée à l'éthylène ou celle des facteurs nod stimule l'expression des PR1 au cours de la pathogénie

Section III. Résultats  
Chapitre II. Les PRs de *M. truncatula*

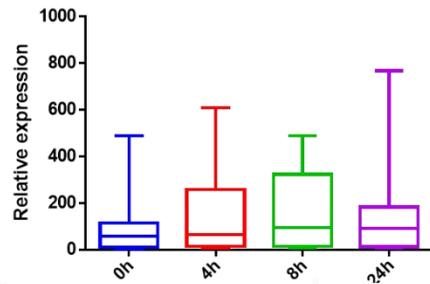
(a)



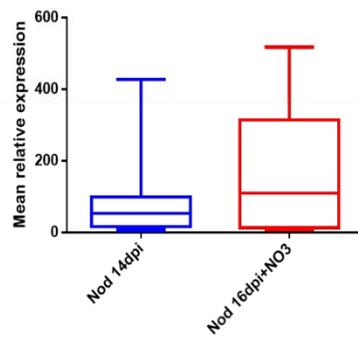
(b)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1. Medtr2g010670.1		40.7	58.3	51.1	68.3	20.2	28.1	26.2	51.1	50.9	68.7	90.9	73.5	69.7	55.7	16.8
2. Medtr2g435490.1	59.6		49.2	52.1	48.1	21.5	30.4	30.9	52.1	43.2	48.7	40.2	41.1	41.5	47.0	20.0
3. Medtr2g010600.1	73.3	66.7		82.9	68.0	25.1	34.5	32.8	82.9	77.2	72.5	55.4	60.6	62.0	79.0	14.2
4. Medtr2g012370.1	66.9	72.1	87.3		59.0	22.6	32.1	30.2	100.0	68.5	62.9	48.9	53.4	54.1	69.1	13.5
5. Medtr2g010650.1	82.4	69.9	84.8	77.3		25.1	32.8	29.6	59.0	59.9	84.4	65.9	67.8	68.1	64.7	12.7
6. Medtr5g018755.1	32.1	32.8	38.3	33.1	37.0		30.7	39.9	22.6	28.9	23.5	21.5	21.5	24.3	22.7	18.2
7. Medtr8g078770.1	48.8	54.6	49.4	47.5	52.3	41.9		62.7	32.1	31.2	33.3	28.7	29.3	30.1	34.1	16.5
8. Medtr5g018770.1	45.4	55.7	49.7	48.1	49.2	44.3	75.7		29.1	30.8	30.0	27.2	28.1	28.6	30.6	13.9
9. Medtr4g050762.1	66.9	72.1	87.3	100.0	77.3	33.1	47.5	48.6		68.5	62.9	48.9	53.4	54.1	69.1	13.5
10. Medtr2g010610.1	62.4	61.2	82.1	74.0	73.3	42.8	45.9	44.3	74.0		63.3	50.3	53.3	54.5	72.5	14.5
11. Medtr2g010630.1	82.4	68.3	88.5	80.1	93.3	34.5	51.7	50.3	80.1	74.5		66.3	72.2	68.5	66.3	11.4
12. Medtr2g010690.1	95.8	60.1	70.9	64.6	80.6	31.5	50.6	45.9	64.6	61.8	81.2		72.4	68.5	53.9	15.3
13. Medtr2g010700.1	85.7	63.4	76.8	70.7	83.3	35.1	49.4	49.2	70.7	65.5	83.9	84.5		76.2	56.2	17.4
14. Medtr2g010640.1	81.2	61.7	76.1	69.1	84.8	37.4	49.4	47.0	69.1	65.0	83.0	82.4	87.5		56.4	15.8
15. Medtr2g010590.1	72.1	64.5	92.0	82.3	83.0	39.0	50.0	47.6	82.3	82.4	84.2	69.7	75.0	74.2		13.7
16. Medtr5g018750.1	36.4	33.9	32.9	31.5	32.1	29.9	34.9	31.4	31.5	29.3	33.3	32.1	37.5	33.5	31.1	

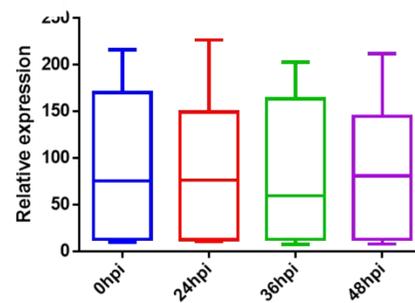
(c)



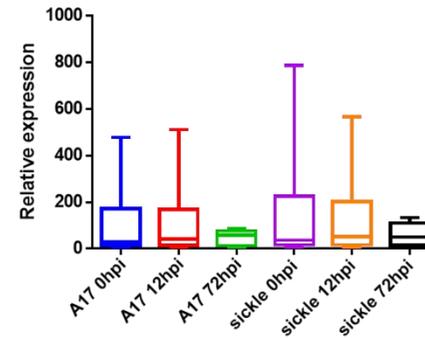
(d)



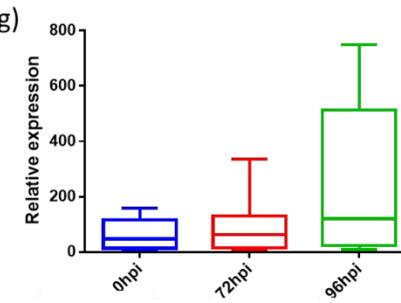
(e)



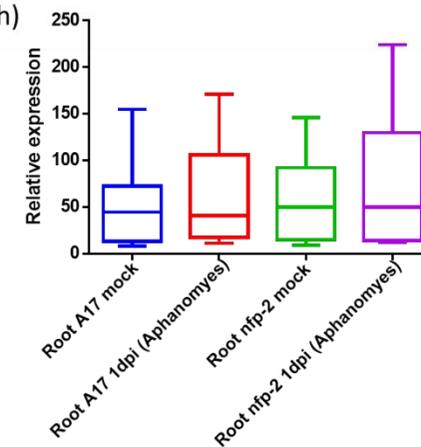
(f)



(g)



(h)



**Section III. Résultats**  
**Chapitre II. Les PRs de *M. truncatula***

**Figure 7. Analyse de la classe des PR1 chez *M. truncatula*.**

- (a) L'analyse phylogénétique moléculaire par la méthode maximum likelihood l'histoire évolutive a été déduite en utilisant la méthode maximum likelihood basée sur le model Whelan and Goldman. L'analyse a impliquée 17 séquences d'acides aminés, toutes les positions contenant des lacunes et des données manquantes ont été éliminées. Il y avait un totale de 75 positions dans le jeu de données final. Des analyses évolutives ont été menées dans MEGA7 [2]. La séquence du gène chez *A. thaliana* est utilisée pour réaliser l'enracinement de l'arbre.
- (b) Pourcentage d'identité **en bleu** et de similarité **en vert** évalués à l'aide de l'outil MatGAT.
- (c) Expression globale des PRs 1 au sein de nodosités issues de plantes traitées à la phosphinotricine à 0, 4, 8 et 24 heures.
- (d) Expression globale des PRs 1 au sein de nodosités âgées de 16 jours post inoculations (Dpi) issues de plantes traitées ou non traitées aux nitrates.
- (e) Expression globale des PRs 1 au sein de racines de *M. truncatula* inoculées avec le pathogène *Macrophomina* sp à 0, 24, 36 et 48 heures post inoculations (hpi).
- (f) Expression globale des PRs 1 au sein de racines de *M. truncatula* ou de son mutant *sickle* inoculées avec le pathogène *R. solanacearum* à 0, 12 et 24 (hpi).
- (g) Expression globale des PRs 1 au sein de racines de *M. truncatula* avec le pathogène *P. omissum* à 0, 72 et 96 hpi.
- (h) Expression globale des PRs 1 au sein de racines de *M. truncatula* ou de son mutant *nfp* inoculées avec le pathogène *A. etryche* à 0 ou 1 jours post inoculation (Dpi).

**Section III. Résultats**  
**Chapitre II. Les PRs de *M. truncatula***

**V. Similarités et divergences entre les PR1 chez *M. truncatula***

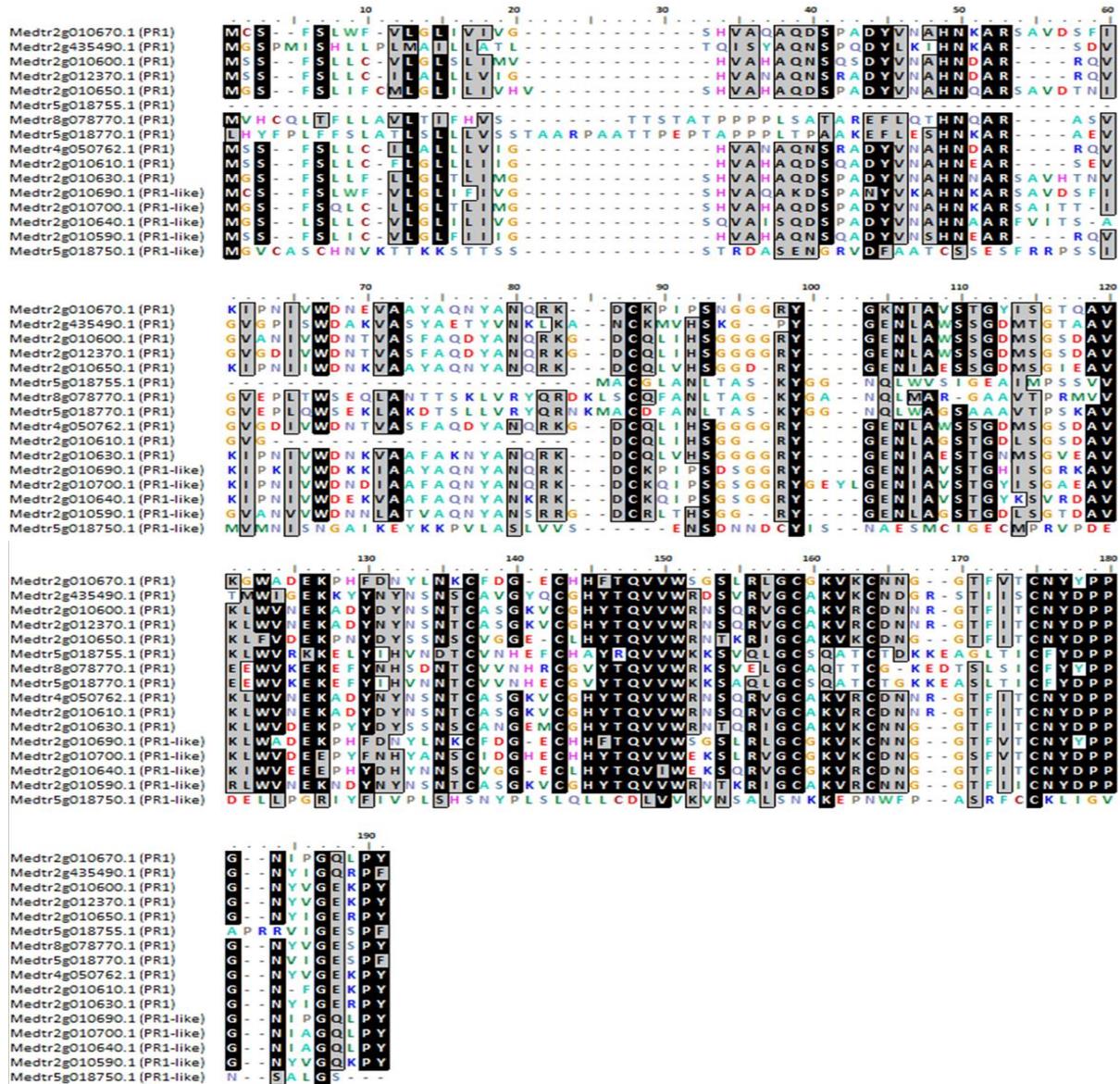
Dans le but d'évaluer la conservation fonctionnelle des PR1s chez *M. truncatula*, une analyse fine des séquences correspondant au domaine CAP est réalisée sur les PR1s. La Figure 8 présente les résultats d'alignement pour les 16 PR-1 identifiés.

Une bonne conservation des résidus est observée sur l'ensemble des séquences pour la majorité des protéines. Les protéines les plus différentes sont Medtr5g018755.1 et Medtr5g018750.1 qui présentent une séquence tronquée et divergente respectivement. On observe la présence d'un peptide supplémentaire entre le 19<sup>ème</sup> et 34<sup>ème</sup> résidus chez Medtr5g018770.1 et Medtr8g078770.1. Il existe plusieurs régions variantes chez les différentes protéines telle que celle situées entre les résidus : 54-59, 67-70, 73-79, 94-97, 167-170.

Les régions les plus fortement conservées sont situées entre les résidus 145-151 et 175-181. En plus de plusieurs résidus fortement conservés tels que : Tyrosine 99, Cystéine 175 et Guanine 186.

L'ensemble de ces résultats pointent vers une conservation fonctionnelle des domaines CAP chez la majorité des PR1 isolées, excepté pour les gènes *Medtr5g018755.1* et *Medtr5g018750.1* et potentiellement *Medtr5g018770.1* qui présente un peptide supplémentaire de 11 acides aminés au sein du domaine CAP.

**Section III. Résultats**  
**Chapitre II. Les PRs de *M. truncatula***



**Figure 8.** Analyse fine de la séquence CAP des PR1s. L'alignement des séquences protéiques est réalisé grâce au logiciel BioEdit en utilisant l'algorithme ClustalW. En noir les résidus identiques, en gris les résidus similaires.

**VI. Les PR2 impliquée préférentiellement dans la sénescence que l'immunité**

L'analyse de la famille des PR2 à révéler la présence de trois membres dont un sous forme de deux allèles (Medtr2g034470). L'ensemble des gènes se situe sur le chromosome 2. L'analyse phylogénétique des protéines révèle la présence de deux branches, l'une regroupant Medtr2g034470 et Medtr2g034440.1 et l'autre présenteseulement Medtr2g034480.1 (Figure

### Section III. Résultats

#### Chapitre II. Les PRs de *M. truncatula*

9a). L'analyse de similarité et d'identité révèle une forte conservation des membres de la famille des PR2 chez *M. truncatula* (Figure sup. 1)

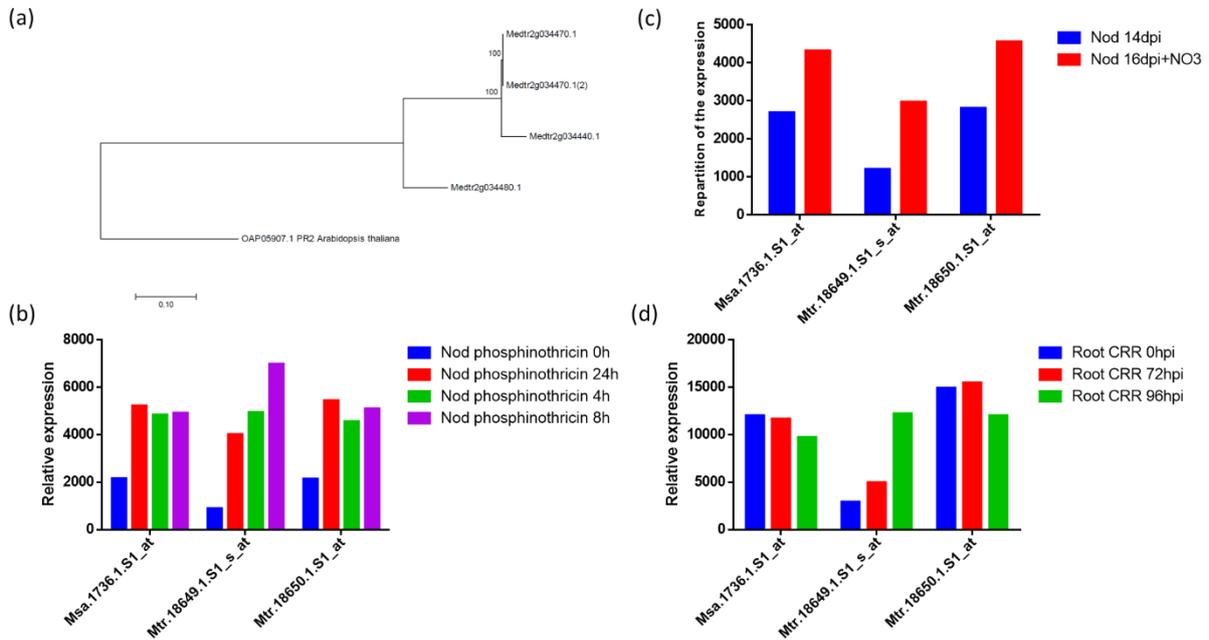
Nous avons pu analyser l'expression de trois membres de la famille, l'analyse révèle que l'ensemble des membres de cette famille est stimulé au sein des nodosités traitées à la phosphinotricine (Figure 9b). La même tendance est observée au sein de nodosités traitées aux nitrates qui présentent une augmentation d'expression par rapport à la condition non-traitée (Figure 9c). Ces résultats indiquent que les PR2 sont stimulées au cours de la sénescence des nodosités.

L'expression des PR2 n'est pas fortement augmentée lors de la réponse immunitaire, ainsi seulement une PR2 est induite au cours de la réponse à *P. omnivorum* et aucune variation importante n'est notée en réponse à *R. solanacearum* (Figure 9).

L'ensemble de ces résultats indiquent que les PR2 sont plus stimulées au cours de la sénescence qu'en réponse aux pathogènes chez *M. truncatula*.

## Section III. Résultats

### Chapitre II. Les PRs de *M. truncatula*



**Figure 9. Les PRs de classe 2 préférentiellement impliqués lors de la sénescence.**

(a) l'analyse phylogénétique moléculaire par la méthode maximum likelihood l'histoire évolutive a été déduite en utilisant la méthode maximum likelihood basée sur le model Whelan and Goldman. L'analyse a porté sur 5 acides aminés. Toutes les positions contenant des lacunes et des données manquantes ont été éliminées. Il y avait un total de 299 positions dans le jeu de données final. Les analyses évolutives ont été menées dans MEGA7 [2].

(b) Expression globale des PRs 2 au sein de nodosité issues de plantes traitées à la phosphinotricine à 0, 4, 8 et 24 heures.

(c) Expression globale des PRs au sein de nodosités âgées de 16 jours post inoculation (Dpi) issues de plantes traitées ou non traitées aux nitrates.

(d) Expression globale des PRs au sein de racines de *M. truncatula* avec le pathogène *P. ovinovrum* à 0, 72 et 96 hpi. (i)

## VII. La famille des PR10s préférentiellement stimulé lors de l'immunité que la sénescence

Le génome de *M. truncatula* contient 29 gènes codants des PRs de classe 10 ou assimilés à cette classe. Les gènes sont répartis entre les chromosomes un, deux, trois, quatre, six et huit. La phylogénie des protéines indique la présence de plusieurs branches, les gènes situés sur le chromosome 8 se regroupent dans les mêmes branches, alors que les gènes situés sur les autres chromosomes forment des branches mixtes (Figure 10a).

### Section III. Résultats

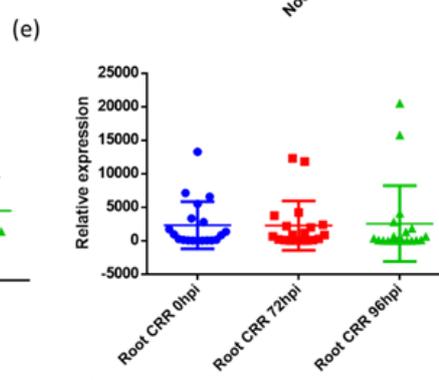
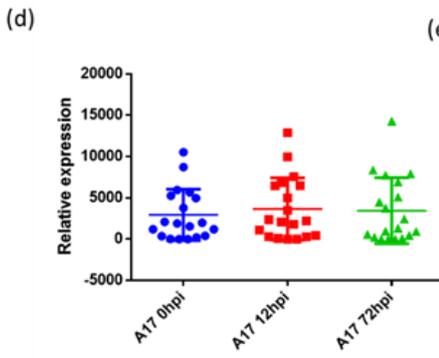
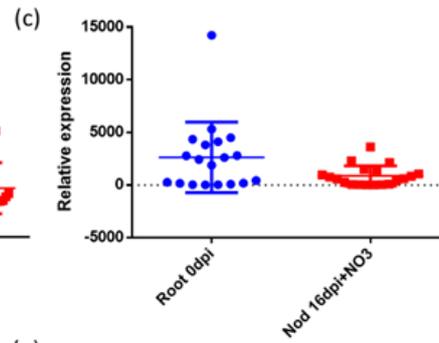
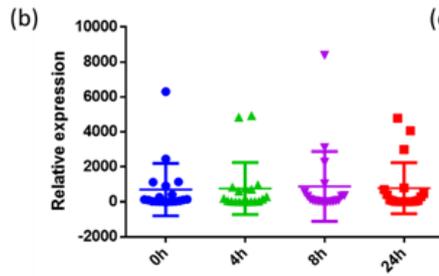
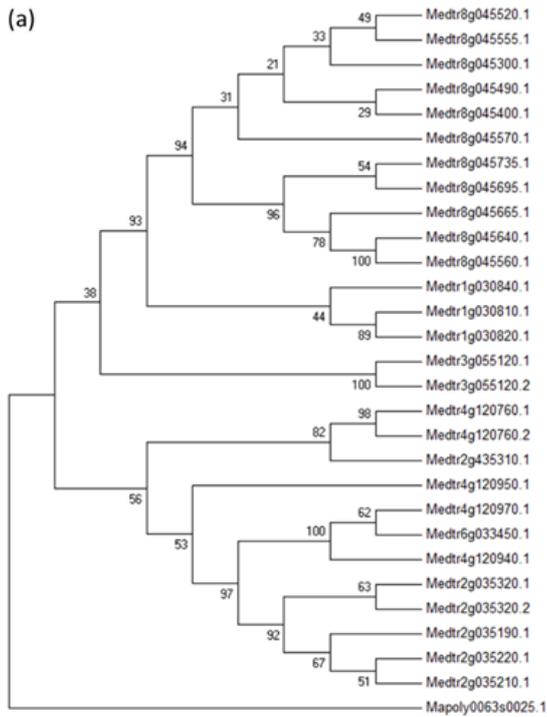
#### Chapitre II. Les PRs de *M. truncatula*

L'analyse de l'expression de ces gènes au sein de nodosités traitées à la phosphinotricine indiquent qu'à part certains gènes, aucune grande variation n'est observée au sein de la famille entre les conditions traitées et contrôle (Figure 10b). Ces résultats sont en corrélation avec l'analyse de l'expression des PR10 au sein de nodosité traitée au nitrate qui est réduite comparée au contrôle (Figure 9c).

L'étude de l'expression de cette famille lors de la réponse de *Medicago truncatula* aux pathogènes, indique que l'expression globale des PR10 est augmentée en réponse à *Ralstoniasolanacearum* (Figure 10c) et *P. omnivorum* (Figure 10d).

L'ensemble de ces observations semble que la famille des PR10s, à l'inverse des classes précédentes, est plutôt associée à la réponse des plantes aux pathogènes qu'à la sénescence.

Section III. Résultats  
 Chapitre II. Les PRs de *M. truncatula*



**Section III. Résultats**  
**Chapitre III. Les PRs de *G. max***

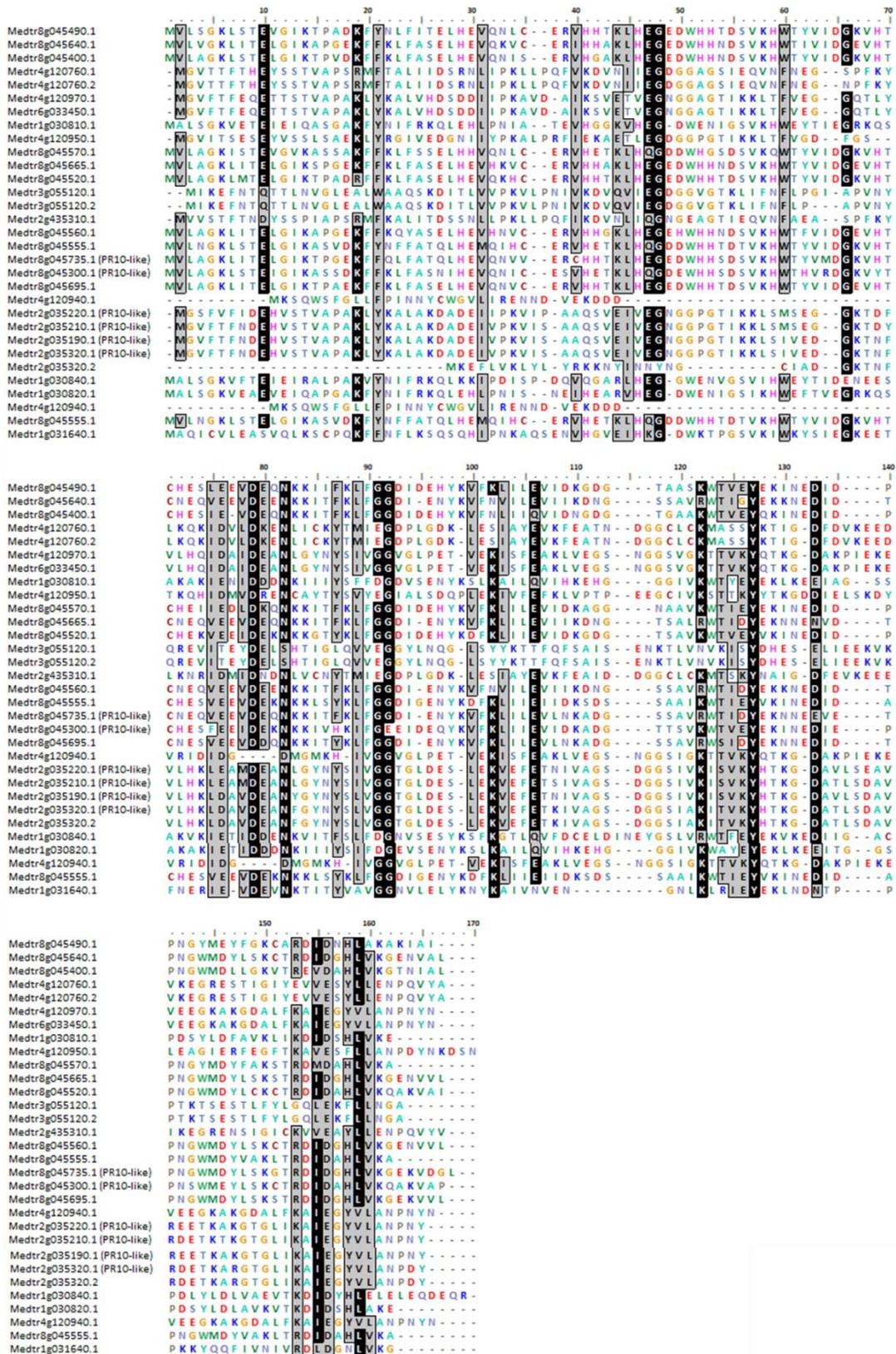
**Figure 10. Les PR10s préférentiellement stimulées au cours de la réponse immunitaire**

- (a) L'analyse phylogénétique moléculaire par la méthode maximum likelihood l'histoire évolutive a été déduite en utilisant la méthode maximum likelihood basée sur le modèle Whelan and Goldman. L'analyse a porté sur 29 acides aminés séquences. Toutes les positions contenant des lacunes et des données manquantes ont été éliminées. Il y avait un total de 85 positions dans le jeu de données final. Des analyses évolutives ont été menées dans MEGA7 [2]
- (b) Expression globale des PRs 10 au sein de nodosités issues de plantes traitées à la phosphinotricine à 0, 4, 8 et 24 heures.
- (c) Expression globale des PRs 10 au sein de nodosités âgées de 16 jours post inoculation (Dpi) issues de plantes traitées ou non traitées aux nitrates.
- (d) Expression globale des PRs 10 au sein de racines de *M. truncatula* ou de son mutant *sickle* inoculées avec le pathogène *R. solanacearum* à 0, 12 et 24 (hpi).
- (e) Expression globale des PRs 10 au sein de racines de *M. truncatula* avec le pathogène *P. omissum* à 0, 72 et 96 hpi.

**VII. Conservation et divergence au sein de la famille des PR10s chez *M. truncatula*.**

Dans le but d'étudier plus en détail la famille des PR10s chez *M. truncatula*, une comparaison des séquences correspondant à domaine Bet\_V1 entre les 24 membres est réalisée. La Figure 11 présente le résultat obtenu, on observe une conservation réduite des séquences avec un seul acide aminé fortement conservé, la tyrosine 127 et plusieurs résidus conservés tels que E10/47/106, glutamate 48/91/92, aspartate 79/133, N82, lysine 102/122, isoleucine 155 et leucine 159.

### Section III. Résultats Chapitre III. Les PRs de *G. max*



**Figure 11.** Analyse fine de la séquence correspondant au domaine Bet\_V1 des PR10s. L'alignement des séquences protéiques est réalisé grâce au logiciel BioEdit en utilisant l'algorithme ClustalW sur les 24 membres de PR10.

**Section III. Résultats**  
**Chapitre III. Les PRs de *G. max***

**VIII. PR5, classe majeure chez *M. truncatula***

La classe 5 de la famille des PRs est la plus importante au sein de cette famille de gènes avec 44 membres. Afin de retracer leur parcours évolutif une analyse phyllogénétique en utilisant les séquences protéiques est réalisée. La Figure 12 présente les résultats obtenus.

Les PR5s sont présentés sur l'ensemble des 8 chromosomes de *M. truncatula* et présentent une forte diversité en termes de séquences protéiques (Figure sup. 2), avec seulement 3 protéines présentant des identités de 78,1 à 84%. Les autres protéines quant à elle présentent un pourcentage d'identité inférieure à 67,8%.

On distingue plusieurs branches des PR5 dispersées au sein de l'arbre, dans ce dernier cas, cela peut être expliqué par l'hétérogénéité des séquences qui regroupe les classes de PRs. L'arbre est composé de gènes répartis de manière hétérogène dans le génome qui ne se regroupe pas dans les mêmes branches, par exemple le gène Medtr8g089020.1 situé sur le chromosome 8 se retrouve dans le cluster comportant le gène Medtr5g059200.1 qui lui est présent sur le chromosome 5. Par ailleurs, dû à l'hétérogénéité de la famille des PR5s, certaines branches ne sont pas fiables avec un bootstrap très faible voir nul.



**Section III. Résultats**  
**Chapitre III. Les PRs de *G. max***

**IX. Les PR5s présente des profils d'expression similaire entre la sénescence et la défense**

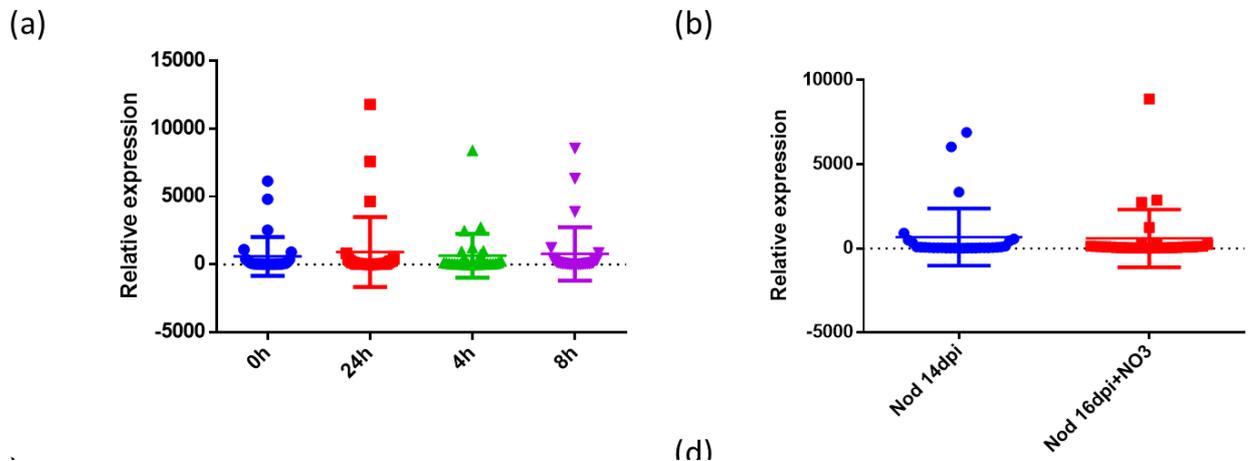
Afin d'évaluer l'expression de la famille des PR5 en condition de réponse immunitaire et de sénescence, une analyse sur des transcriptomes de nodosités sénescence en réponse à la phosphinotricine (Figure 13a) ou au nitrate (Figure 13b), ainsi que de racines traitées aux pathogènes *R. solanacearum* (Figure 13c) et *P. omnivorum* (Figure 13d).

On observe peu de variation d'expression globale de la famille des PR5s dans les différentes conditions testées, ainsi il semble que l'expression de cette famille varie peu au niveau.

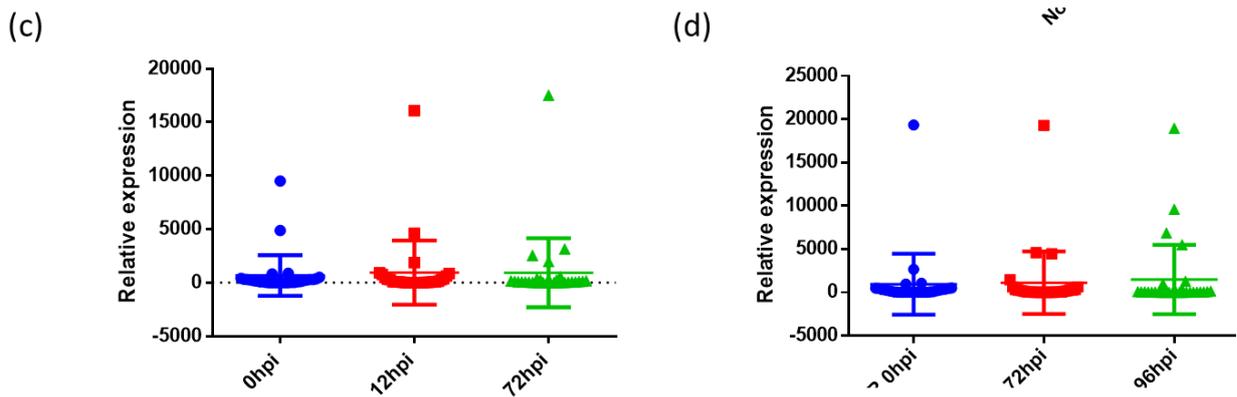
Ces résultats montrent un profil similaire d'expression des PR5 entre les conditions de sénescence et celle de la réponse immunitaire.

Section III. Résultats  
Chapitre III. Les PRs de *G. max*

Herbicide



Pathogène



**Figure 13.** Analyse de l'expression des PR5 au cours de la sénescence et de l'immunité.

(a) Expression globale des PRs 10 au sein de nodosités issues de plantes traitées à la phosphinotricine à 0, 4, 8 et 24 heures.

(b) Expression globale des PRs 10 au sein de nodosités âgées de 16 jours post inoculation (Dpi) issues de plantes traitées ou non traitées aux nitrates.

(c) Expression globale des PRs 10 au sein de racines de *M. truncatula* inoculées avec le pathogène *R. solanacearum* à 0, 12 et 24 (hpi).

(d) Expression globale des PRs 10 au sein de racines de *M. truncatula* avec le pathogène *P. olinovrum* à 0, 72 et 96 hpi.

### Section III. Résultats

#### Chapitre III. Les PRs de *G. max*

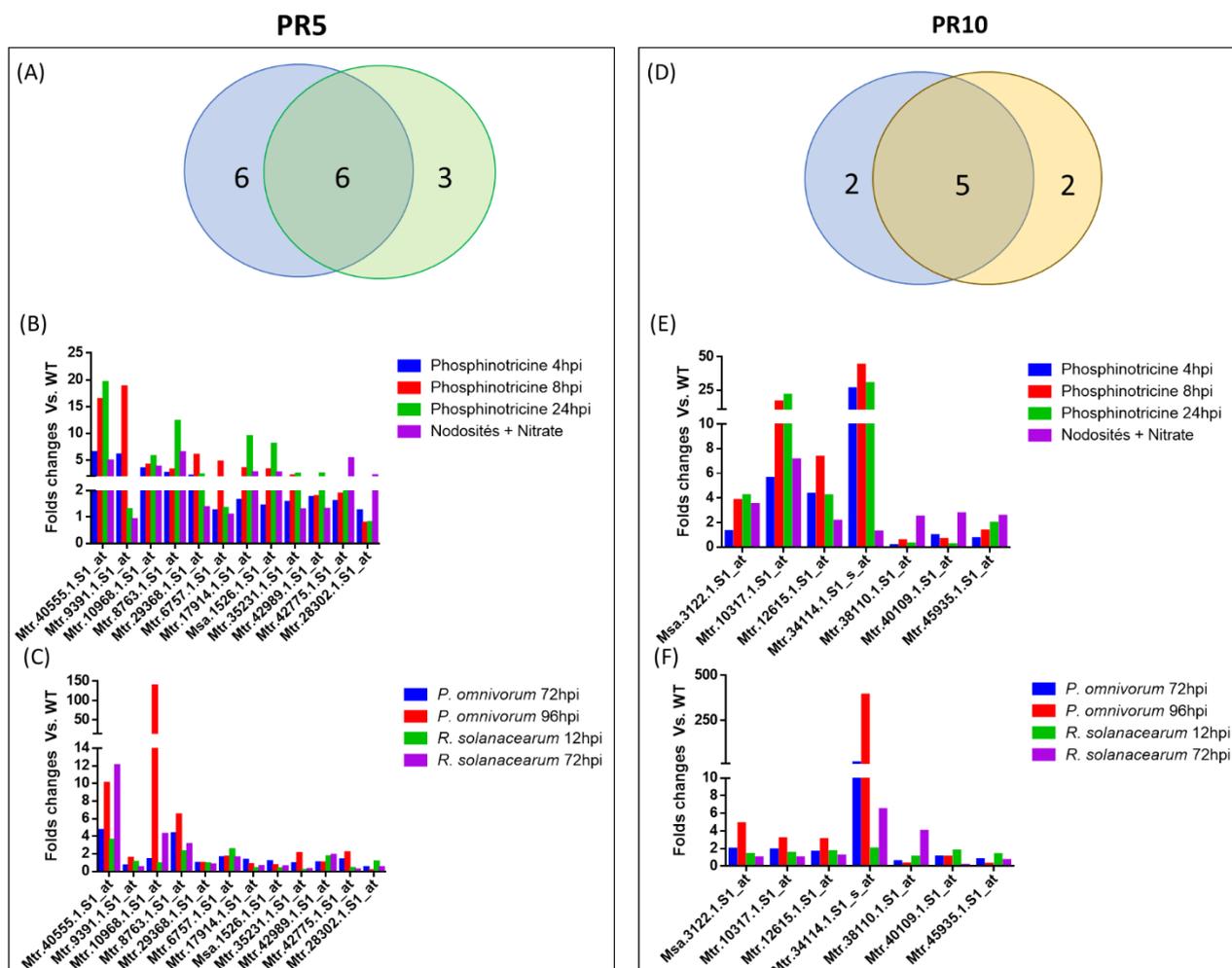
#### X. Certaines PR5 et PR10 sont stimulées lors de la sénescence et l'immunité

Afin de vérifier l'implication des classes de PR5 et PR10 au cours de la sénescence et de l'immunité, nous avons analysé l'expression des gènes correspondants dans les conditions de sénescence et de réponse aux pathogènes *P. omnivorum* et *R. solanacearum* (voir Figure 14).

On observe que malgré une réponse globale faible en condition de sénescence et d'immunité chez les PR5 (Figure 13) et PR10 (Figure 10), au niveau individuel il y'a une induction d'expression au moins deux fois supérieur par rapport au contrôle dans les conditions testées. 6 PR5s sont induites dans l'une des conditions de sénescence, 3 en réponse à au moins l'un des pathogènes et 6 communément induites entre la sénescence et l'immunité (Figure 14A). Pour les PR10, 2 sont induites au cours de la sénescence, 2 en réponse aux pathogènes et 5 Co-induites entre la sénescence et l'immunité (Figure 14D).

Une analyse plus fine de l'expression des PR5 et PR10 en condition de sénescence (Figure 14B et 14E respectivement) et de réponse immunitaire (Figure 14C et 14F respectivement) confirme la Co-induction de certaines PRs au cours de la sénescence et de l'immunité, ce qui appuie l'hypothèse d'une activation des PR5 et PR10 au cours de la sénescence.

### Section III. Résultats Chapitre III. Les PRs de *G. max*



**Figure 14. Certaines PR5 et PR10 sont induites au cours de la sénescence et de l'immunité.**

(A). Diagramme de Ven. Représentant les PR5s induites plus de deux fois au cours de la sénescence (cercle bleu) et/ou de l'immunité (vert).

(B). Profils d'expressions comparés en condition contrôle de PR5s induites au cours de la sénescence au sein de nodosités traitées 4, 8 et 24 heures à la phosphinotricine ou traitées aux nitrates.

(C). Profils d'expressions comparées en condition contrôle de PR5s induites au cours de la sénescence au sein de racines traitées aux pathogènes *P. omnivorum* à 72 et 96hpi ou *R. solanacearum* à 12 et 72hpi.

(D). Diagramme de Ven. Représentant les PR10s induites plus de deux fois au cours de la sénescence (cercle bleu) et/ou de l'immunité (jaune).

(E). Profils d'expressions comparés en condition contrôle de PR10s induites au cours de la sénescence au sein de nodosités traitées 4, 8 et 24 heures à la phosphinotricine ou traitées aux nitrates.

### Section III. Résultats

#### Chapitre III. Les PRs de *G. max*

(C). Profils d'expressions comparées en condition contrôle de PR10s induites au cours de la sénescence au sein de racines traitées aux pathogènes *P. omnivorum* à 72 et 96hpi ou *R. solanacearum* à 12 et 72hpi.

#### XI. Analyse des PR chez *G. max*

Dans le but d'évaluer le rôle potentiel des PRs chez d'autres légumineuses au cours de la symbiose et de la sénescence, une analyse de la famille des PR est réalisée chez *G. max*.

Afin de faciliter l'analyse, nous nous sommes focalisés sur trois classes de PRs facilement identifiables qui sont les PR1, PR5 et PR10. Un nombre de 73 gènes ayant une annotation fonctionnelle correspondant aux PRs a été identifié qui sont répartis en 12 PR de classe 1, 13 PR de classe 5 et 46 PR de classe 10 (Tableau 3).

**Tableau 3** Nombre de gènes codants des PRs chez *G. max*. En noir le nombre de gènes

Classe	Nombre des gènes
PR1	 12
PR2	?
PR3	?
PR4	?
PR5	 13
PR6	?
PR7	?
PR8	?
PR9	?
PR10	 46
PR11	?
PR12	?
PR13	?
PR14	?
PR15	?
PR16	?
PR17	?

déterminé. Le point d'interrogation indique les classes non-concernées par l'étude.

#### XII. Les PRs impliqués lors de la symbiose et de la sénescence chez *G. max*

Dans le but de vérifier l'implication des PRs lors de la symbiose et/ou la sénescence chez *G. max*. L'analyse d'expression concerne plusieurs étapes de la symbiose incluant les étapes précoces de formation des nodosités (Figure 15A Branching), lors de la symbiose (Figure 15A

### Section III. Résultats

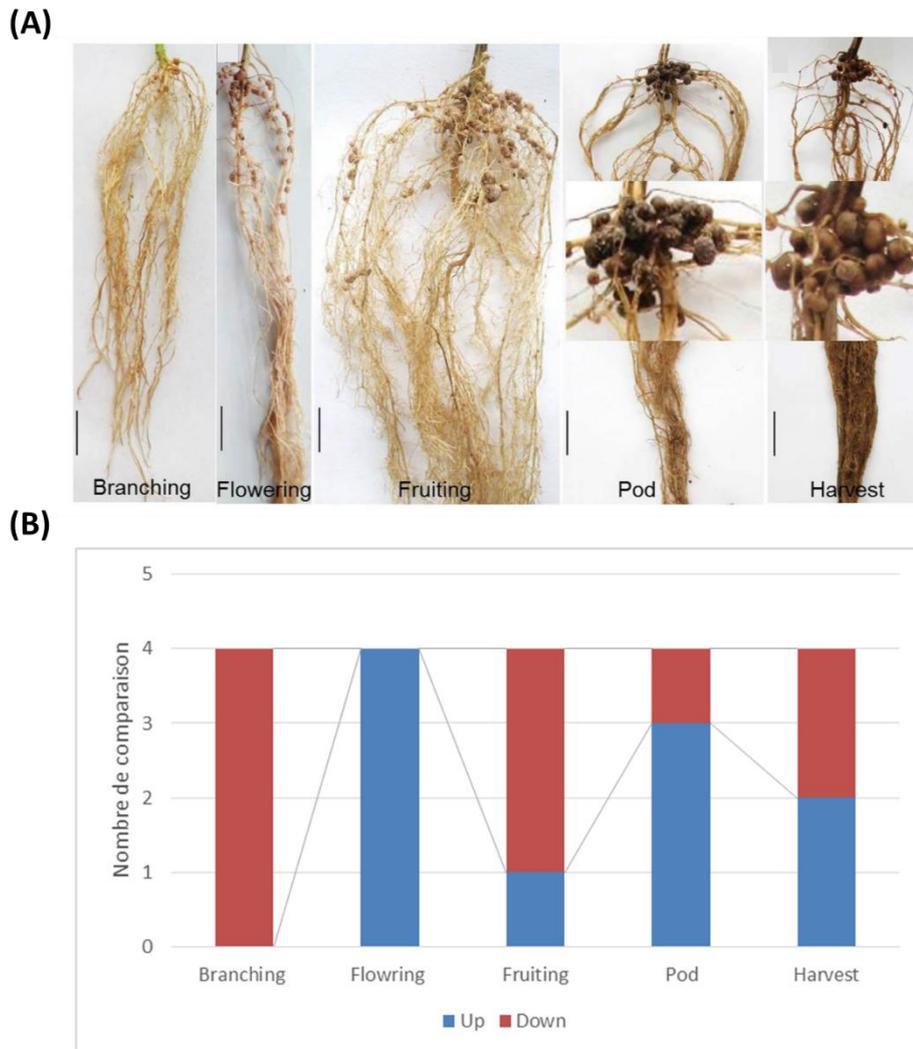
#### Chapitre III. Les PRs de *G. max*

Flowring, Fruiting), ainsi que lors de phase précoces et tardive de sénescence (Figure 15A Pod et Harvest respectivement).

Les auteurs de l'étude scientifique détecte l'expression de PRs dans les différentes conditions par RNA-seq. Une comparaison deux à deux montre que la condition pour laquelle les PRs sont les moins nombreuses à être stimulé en condition(Branching) (Figure 15B) et celle pendant laquelle elles sont le plus nombreuses est la condition (Fruiting) (Figure 15B). De plus un nombre conséquent de PRs sont stimulé lors des conditions restantes avec une forte stimulation en condition (Pod) (Figure 15B)

Ces résultats montrent que les PRs sont recrutés lors de la symbiose et de la sénescence chez la légumineuse *G. max*.

**Section III. Résultats**  
**Chapitre III. Les PRs de *G. max***



**Figure15. Les PRs sont stimulées lors de la symbiose et de la sénescence chez *G. max*.**(A) les différentes étapes symbiotiques étudiés par les auteurs de l'étude. Les nodosités roses sont fonctionnelles, alors que les nodosités noires sont sénescentes. (B) Comparaison deux-à-deux du nombre de PRs détectées entre les conditions étudiées.

### Section III. Discussion

Au cours de notre étude nous nous sommes intéressés à la grande famille des PRs chez les légumineuses modèles *M. truncatula* et *G. max*, en raison de la complexité de la famille étudiée, nous avons pu réaliser une caractérisation finie que pour certaines classes de PRs ; pour celle qui possède des fonctions biochimiques propres à leur classe et ne pouvant être partagée par des gènes impliqués dans des processus hors de l'immunité.

#### I. Confirmation de la stimulation de l'immunité au cours de la sénescence

Lors de nos recherches nous avons remarqué une stimulation importante de la famille des PRs au sein de nodosités sénescents en réponse à deux traitements, nitrates et phosphinotricine. L'analyse d'expression des cystéines protéases montre que ces dernières sont stimulées lors des traitements susmentionnés, ces gènes sont impliqués lors de la sénescence (Van de Velde et al. 2006) et confirme le statut moléculaire associé à la sénescence des nodosités pour lesquelles une stimulation des PRs est observée. Ces observations montrent de manière claire qu'au sein des nodosités sénescents un programme immunitaire ou pouvant être associé à l'immunité est enclenché.

De manière intéressante la réactivation de la réponse immunitaire est observée lors de la sénescence des feuilles chez *A. thaliana* et inversement, une stimulation de la sénescence a lieu lors de la réponse immunitaire (Robatzek & Somssich 2001). Au cours de nos travaux nous n'avons pas observé une stimulation des cystéines protéase lors de la réponse aux pathogènes ce qui indique que cette famille de gènes n'est pas préférentiellement associée à l'immunité chez *M. truncatula*.

#### II. Un comportement différentiel des PRs au cours de l'immunité et de la sénescence

Nous avons identifié chez *M. truncatula* le nombre de gènes pour les classes des PR1, 2, 5 et 10 pour lesquels 16, 3, 44 et 29 gènes sont présents respectivement, la PR6 quant à elle ne présente aucun homologue.

Actuellement aucune étude ne reporte le nombre de gènes chez d'autres espèces, bien qu'elles fassent l'objet d'un intérêt important notamment pour le développement de variétés d'intérêt agronomique résistantes aux maladies (Ali et al. 2018). Néanmoins l'évaluation du nombre de gènes associées à la pathogénicité indique qu'il est disparate entre les différentes plantes étudiées ce qui laisse à penser que le nombre de PRs est différent d'une espèce à une autre.

L'analyse de l'expression des classes de PRs étudiées en condition de sénescence et d'immunité montre que le comportement des PRs est différent d'une classe à une autre, ainsi

### Section III. Discussion

les PR1 et les PR2 présentent une stimulation claire des membres de leur classe lors de la sénescence et de la réponse immunitaire, alors que les PR5 et PR10 ne présente que certains membres induit lors des processus étudiés.

La classe 1 des PRs est connue pour être activée en réponse au SA, mais aussi les PR2 et PR5 (Ali et *al.* 2018). L'acide salicylique joue un rôle important lors de la symbiose, la surexpression du gène *NahG* conduit à une réduction du SA et une augmentation de la symbiose. De manière intéressante la surexpression de NPR1 chez *M. truncatula* conduit elle aussi à une réduction de la symbiose (Pieterse et *al.* 1998; Peleg-grossman et *al.* 2009). Ces observations laissent à penser que lors de la sénescence des nodosités, une activation de la voie du SA à lieu et aboutirait potentiellement à l'expression des PRs. Par ailleurs on observe une induction de plusieurs PR5 et PR10 lors de la sénescence et en réponse aux pathogènes *R. solanacearum* et *P. omnivorum*, deux pathogènes nécrotrophes, cette catégorie est connue pour induire la voie du jasmonate (Yan & Xie 2015). Donc l'hypothèse d'une activation de la réponse au JA n'est pas à exclure lors de la sénescence des nodosités.

L'induction des PRs a par ailleurs déjà été observée lors de la sénescence chez d'autres plantes, par exemple chez le tabac l'induction de la sénescence par inoculation du virus TMV ou la sénescence développementale aboutissent à la stimulation de la PR10 (Liu et *al.* 2006).

#### III. Le domaine Bet\_V1 présente une conservation réduite entre les PR10

L'analyse de la conservation du domaine Bet\_V1 caractéristique de la classe des PR10s, révèle une conservation réduite par rapport au domaine CAP des PR1s chez *M. truncatula*. Ce qui indique une divergence évolutive asymétrique entre les classes de PRs, ceci pourrait être expliquée par des pressions évolutives différentielles entre ces deux classes.

Plusieurs résidus sont critiques pour l'activité des PR10, notamment l'acide glutamique 96 et 148 ainsi que la tyrosine 150 et qu'un motif GxGGxGxxK qui est critique pour la liaison de l'ATP et du GTP, ainsi que pour l'activité RNase (Lebel et *al.* 2010). Lors de l'analyse nous avons pu retrouver les résidus qui sont moyennement, voire peut-être conservés entre les différentes PR10 ce qui pose la question de la fonctionnalité réelle des différents membres de cette classe.

#### IV. Les PRs sont stimulées lors de la symbiose et de l'immunité chez *G. max*

L'analyse de PRs chez *G. max* a révélé des divergences quant au nombre de gènes pour les différentes classes par rapport à *M. truncatula*, ainsi les PR1, PR5 et PR10 présentent 12, 13

### Section III. Discussion

et 46 gènes respectivement. Les PR10s est la classe la plus importantes chez *G. max*, alors que c'est celle des PR5 chez *M. truncatula*. Ces observations sont en corrélation avec l'hypothèse suggérant une variation du nombre de PR au du règne végétal.

L'analyse d'expression de la famille des PRs montre qu'elles sont réduites lors du début de la symbiose, ce qui est en accord avec la théorie d'une répression de l'immunité lors des phases précoces de la symbiose (Berrabah et *al.* 2019). Lors de la symbiose et de la sénescence leur nombre est fortement augmenté, ceci est en corrélation avec les observations réalisées chez *M. truncatula* (Berrabah et *al.*, underredaction).

L'ensemble de ces observations indique que le phénomène de stimulation des PRs peut être élargie à d'autre légumineuses, de plus *G. max* forme des nodosités de structure déterminé caractérisées par une absence de zonation tissulaire et une croissance déterminée, en plus d'une absence de différenciation des bacteroids (Kereszt et *al.* 2011; Berrabah, Balliau, et *al.* 2018). Ces résultats suggèrent que l'activation de cette famille de gènes est indépendante des paramètres évoqués et semble être un processus ubiquitaire affectant l'ensemble des légumineuses.

## Conclusion

Lors de notre étude nous avons pu améliorer la compréhension du rôle des PRs au cours du phénomène de sénescence chez *M. truncatula*. Les observations réalisées pointent le rôle essentielle et ubiquitaire de cette famille connectant immunité, symbiose et sénescence.

Ces travaux fondamentaux pourront servir de référence dans la compréhension du contrôle de l'immunité lors de la symbiose lorsqu'ils seront publiés. Néanmoins avant toute publication, des analyses fonctionnelles doivent être réalisées afin de confirmer le rôle des PRs et d'améliorer notre compréhension de ce phénomène, dans ce sens des travaux conjoints sont en cours de réalisation avec l'équipe du « Contrôle Génétique de la Symbiose dirigée » par le Dr. Pascal Ratet à l'Institut Plant Science Saclay 2 (IPS2) en région parisienne (Berrabahet *al.*, underredaction).

## Bibliographie

- Abramovitch, R.B., Anderson, J.C. & Martin, G.B., 2006. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(8), pp.601–611. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm1984>.
- Agarwal, P. & Agarwal, P.K., 2014. Pathogenesis related-10 proteins are small , structurally similar but with diverse role in stress signaling. , pp.599–611.
- Ali, S. et al., 2018. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research*, 212–213(April), pp.29–37. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.008>.
- Aslam, S.N. et al., 2008. Report Bacterial Polysaccharides Suppress Induced Innate Immunity by Calcium Chelation. , pp.1078–1083.
- Van Baarlen, P. et al., 2007. Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps? *FEMS Microbiology Ecology*, 3, pp.239–277.
- Baier, R. et al., 1999. Alfalfa and tobacco cells react differently to chitin oligosaccharides and *Sinorhizobium meliloti* nodulation factors.
- Benedito, V.A. et al., 2008. A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. , pp.504–513.
- Berrabah, F., Bourcy, M., Eschstruth, A., et al., 2014. A nonRD receptor-like kinase prevents nodule early senescence and defense-like reactions during symbiosis. *New Phytologist*, 203(4), pp.1305–1314.
- Berrabah, F., Hossey, E., et al., 2018. Chapter 16. , 1822.
- Berrabah, F., Balliau, T., et al., 2018. Control of the ethylene signaling pathway prevents plant defenses during intracellular accommodation of the rhizobia.
- Berrabah, F., 2016. *Contrôle symbiotique de l'immunité au cours des étapes tardives de la symbiose Medicago-Sinorhizobium*.
- Berrabah, F., Bourcy, M., Cayrel, A., et al., 2014a. Growth conditions determine the DNF2 requirement for symbiosis. M. Bendahmane, ed. *PLoS one*, 9(3), p.e91866. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0091866>.
- Berrabah, F., Bourcy, M., Cayrel, A., et al., 2014b. Growth Conditions Determine the DNF2 Requirement for Symbiosis. , 9(3).
- Berrabah, F., Ratet, P. & Benjamin Gourion, 2019. Legume Nodules: massive infection in the

## Bibliographie

- absence of defense induction. *MPMI*, pp.1–29.
- Berrabah, F., Ratet, P. & Gourion, B., 2015. Multiple steps control immunity during the intracellular accommodation of rhizobia. *Journal of Experimental Botany*, 66(7), pp.1977–1985. Available at: <http://jxb.oxfordjournals.org/content/66/7/1977.abstract?ct=ct%5Cnhttp://jxb.oxfordjournals.org/content/early/2015/02/14/jxb.eru545.full>.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A. & Solano, R., 2002. Constitutive expression of Ethylene-Response-Factor1 in arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant Journal*, 29(1), pp.23–32.
- Besbes, F., Franz-Oberdorf, K. & Schwab, W., 2018. Phosphorylation-dependent ribonuclease activity of Fra a 1 proteins. *Journal of Plant Physiology*, 233(December 2018), pp.1–11. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0176161718303626>.
- Van Der Biezen, E. a. & Jones, J.D.G., 1998. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(12), pp.454–456.
- Bigeard, J., Colcombet, J. & Hirt, H., 2015. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular plant*, 8(4), pp.521–39. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1674205215000878>.
- Cam, Y. et al., 2012. Nitric oxide (NO): A key player in the senescence of *Medicago truncatula* root nodules. *New Phytologist*, 196(2), pp.548–560.
- Choi, H.W. & Klessig, D.F., 2016. DAMPs , MAMPs , and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biology*, pp.1–10. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s12870-016-0921-2>.
- Colditz, F., Niehaus, K. & F, K., 2014. Silencing of PR-10- like proteins in *Medicago truncatula* results in an antagonistic. *Mol Biol Rep*, 41, pp.599–611.
- Dardick, C., Schwessinger, B. & Ronald, P., 2012. Non-arginine-aspartate (non-RD) kinases are associated with innate immune receptors that recognize conserved microbial signatures. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(4), pp.358–366.
- Dénarié, J., 2009. Les signaux des symbioses racinaires : de la biologie moléculaire à l'agronomie - 16 juin 2009 - Jean Denarié.
- Elbez, M. et al., 2002. Les protéines de pathogénèse PR-10 des végétaux. *Acta Botanica*

## Bibliographie

- Gallica*, 149(4), pp.415–444.
- Emmanuel JOURDAN, Marc ONGENA & Philippe THONART, «Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes», *BASE* [En ligne], numéro 4, volume 12 (2008), 437-449 URL : <https://popups.uliege.be:443/1780-4507/index.php?id=3304>.
- Fernandes, H. et al., 2013. Structural and functional aspects of PR-10 proteins. *FEBS Journal*, 280(5), pp.1169–1199. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/febs.12114>.
- Fischer, H.M., 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiological reviews*, 58(3), pp.352–386. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=372973&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Gallie, D.R., 2015. Ethylene receptors in plants - why so much complexity? , 12(April), pp.1–12.
- Gallie, D.R., 2015. Ethylene receptors in plants - why so much complexity? *F1000Prime Reports*, 7(April), pp.1–12. Available at: <http://www.f1000.com/prime/reports/b/7/39>.
- Gamas, P. et al., 2017. Cytokinins in Symbiotic Nodulation : When , Where , What For ? *Trends in Plant Science*, xx, pp.1–11. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2017.06.012>.
- Ge, Y. et al., 2016. The type 3 effector NopL of *Sinorhizobium* sp . strain NGR234 is a mitogen-activated protein kinase substrate. , 67(8), pp.2483–2494.
- Giles E D, O. et al., 2011. The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. , (August), pp.119–144.
- Gourion, B. et al., 2015. Rhizobium – legume symbioses : the crucial role of plant immunity. *Trends in Plant Science*, 20(3), pp.186–194. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.008>.
- Guerra, J.C.P. et al., 2010. Juan Carlos Pe ´rez Guerra.pdf. *Plant physiology*, 152(March), pp.1574–1584.
- Gust, A.A. et al., 2012. Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity. *Trends in Plant Science*, 17(8), pp.495–502. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138512000817>.
- Haag, A.F. et al., 2011. Protection of *Sinorhizobium* against Host Cysteine-Rich

## Bibliographie

- Antimicrobial Peptides Is Critical for Symbiosis. , 9(10).
- Heil, M. & Bostock, R.M., 2002. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of Botany*, 89(5), pp.503–512.
- Huguet, S. et al., 2013. NFP, a LysM protein controlling Nod factor perception, also intervenes in *Medicago truncatula* resistance to pathogens . *New Phytologist*, pp.875–886.
- Jiang, L. et al., 2015. Isolation and characterization of a novel pathogenesis-Related protein gene (GmPRP) with induced expression in soybean (*Glycine max*) during infection with *Phytophthora sojae*. *PloS one*, 10(e0129932).
- Jiménez-dalmaroni, M.J., Gerswhin, M.E. & Adamopoulos, I.E., 2015. Autoimmunity Reviews The critical role of toll-like receptors — From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review. *Autoimmunity Reviews*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2015.08.009>.
- JM, N. et al., 1996. A revised nomenclature for chitinase genes. *Plant Mol Biol*, 14, pp.102–104.
- Jones, J.D.G. & Dangl, J.L., 2006. The plant immune system. *Nature*, 444(7117), pp.323–329. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17108957>.
- Kereszt, A. et al., 2011. Innate immunity effectors and virulence factors in symbiosis. *Current Opinion in Microbiology*, 14(1), pp.76–81. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S136952741000189X>.
- Kitajima, S. & Sato, F., 1999. Review Pathogenesis-Related and Protein Proteins : Molecular Mechanisms of Gene Expression. *Journal Biochem*, 125(1), pp.1–8.
- Kumar, D., 2014. Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Science*, 228, pp.127–134. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016894521400096X>.
- Lebel, S. et al., 2010. Characterisation of *Vitis vinifera* PR10 mutigene family. *BMC Plant Biology*, 10, p.184.
- Lévy, J. et al., 2004. A Putative Ca<sup>2+</sup> and Calmodulin- Dependent Protein Kinase Required. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5662), pp.1361–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14963335>.
- Limpens, E. et al., 2003. LysM Domain Receptor Kinases Regulating Rhizobial Nod Factor-Induced Infection. *Science*, 302(5645), pp.630–633. Available at:

## Bibliographie

- <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1090074><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12947035>.
- Liu, X. et al., 2006. A novel pathogenesis-related protein (SsPR10) from *Solanum surattense* with ribonucleolytic and anti-microbial activity is stress- and pathogen-inducible. *Journal of plant physiology*, 163:, pp.546–556.
- Loon, L.C. Van, 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. , pp.753–754.
- Loon, L.C. Van, Rep, M. & Pieterse, C.M.J., 2006. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants.
- Lopez-Gomez, M. et al., 2012. Interplay of flg22-induced defence responses and nodulation in *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany*, 63(1), pp.393–401. Available at: <http://jxb.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/jxb/err291>.
- Macho, A.P. & Zipfel, C., 2014. Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling. *Molecular Cell*, 54(2), pp.263–272. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276514002615>.
- Marie, B. et al., *Medicago truncatula* DNF2 is a PI-PLC-XD-containing protein required for bacteroid persistence and prevention of nodule early senescence and defense-like reactions.
- Maunoury, N. et al., 2010. Differentiation of Symbiotic Cells and Endosymbionts in *Medicago truncatula* Nodulation Are Coupled to Two. *PloS one*, 5(3), pp.1–5.
- Mbengue, M. et al., 2010. The *Medicago truncatula* E3 Ubiquitin Ligase PUB1 Interacts with the LYK3 Symbiotic Receptor and Negatively Regulates Infection and Nodulation. , 22(October), pp.3474–3488.
- Mitra, R.M. et al., 2004. A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(13), pp.4701–4705.
- Morieri, G. et al., 2013. Rapid report Host-specific Nod-factors associated with *Medicago truncatula* nodule infection differentially induce calcium influx and calcium spiking in root hairs.
- Murray, J.D. et al., 2016. Nitrogen sensing in legumes.
- NS, J. et al., 2001. Molecular cloning and characterization of a novel jasmonate inducible

## Bibliographie

- pathogenesis-related class 10 protein gene, JIOsPR10, from rice (*Oryza sativa* L.) seedling leaves. *Biochem Biophys Res Commun*, 286, pp.973–983.
- Oldroyd, G. et al., 2011. The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *Annual Review of Genetics*, 45(Septembre), pp.119–144.
- Op den Camp, R.H.M. et al., 2011. A Phylogenetic Strategy Based on a Legume-Specific Whole Genome Duplication Yields Symbiotic Cytokinin Type-A Response Regulators. *Plant Physiology*, 157(December 2011), pp.2013–2022.
- Park, C.J. et al., 2004. Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *Plant Journal*, 37, pp.186–198.
- Patkar, R.N. & Chattoo, B., 2006. Transgenic indica rice expressing ns-LTP-like protein shows enhanced resistance to both fungal and bacterial pathogens. *Mol. Breed*, 17, pp.159–171.
- Peleg-grossman, S. et al., 2009. NPR1 Protein Regulates Pathogenic and Symbiotic Interactions between Rhizobium and Legumes and Non-Legumes. , 4(12), pp.1–10.
- Peleg-grossman, S., Melamed-book, N. & Levine, A., 2012. ROS production during symbiotic infection suppresses pathogenesis-related gene expression. , (March), pp.409–415.
- Pena-Cortés, H. et al., 1993. Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta*, 191(1), pp.123–128. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00240903>.
- Pérez Guerra, J.C. et al., 2010. Comparison of developmental and stress-induced nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant physiology*, 152(3), pp.1574–1584.
- Pierre, O. et al., 2014. Involvement of papain and legumain proteinase in the senescence process of *Medicago truncatula* nodules. *New Phytologist*, 202(3), pp.849–863.
- Pieterse, C.M. et al., 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 10(9), pp.1571–80.
- Pieterse, C.M.J. et al., 2012. Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28(1), pp.489–521. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055> %5Cnpapers2://publication/doi/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055.
- Pieterse, M.J. et al., 2012. Hormonal Modulation of Plant Immunity. , (April), pp.1–33.

## Bibliographie

- Rahnamaeian, M. et al., 2015. Insect antimicrobial peptides show potentiating functional interactions against Gram-negative bacteria. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 282(1806), p.20150293-. Available at: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/282/1806/20150293>.
- Rival, P. et al., 2012. Epidermal and cortical roles of NFP and DMI3 in coordinating early steps of nodulation in *Medicago truncatula*. , 3391, pp.3383–3391.
- Robatzek, S. & Somssich, I.E., 2001. A new member of the Arabidopsis WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. *Plant Journal*, 28(2), pp.123–133.
- Robinson, M.W., Hutchinson, A.T. & Donnelly, S., 2012. Antimicrobial peptides: utility players in innate immunity. *Frontiers in Immunology*, 3(October), pp.2–3. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00325/abstract>.
- Ross, A.F., 1961. Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. *Virology*, 14(3), pp.329–339.
- Ryals, J.A. et al., 1996. Systemic Acquired Resistance. , 8(October), pp.1809–1819.
- Salvioli, A. et al., 2015. Symbiosis with an endobacterium increases the fitness of a mycorrhizal fungus , raising its bioenergetic potential. , 10(1), pp.130–144. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2015.91>.
- Seabra, A.R. et al., 2012. Inhibition of Glutamine Synthetase by Phosphinothricin Leads to Transcriptome Reprograming in Root Nodules of *Medicago truncatula* . *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(7), pp.976–992.
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M.A. a, et al., 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale*, 46(11), pp.941–50. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VRD-4SVC5JP-1/2/4767d6056afb35cabf23730b292ba1ea%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18674922>.
- Sels, J., Mathys, J., Coninck, B.M.A. De, et al., 2008. Plant Physiology and Biochemistry Plant pathogenesis-related ( PR ) proteins : A focus on PR peptides. , 46, pp.941–950.
- Singh, K.B., Foley, R.C. & Oñate-Sánchez, L., 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(5), pp.430–436.

## Bibliographie

- Sinharoy, S. et al., 2013. The C2H<sub>2</sub> transcription factor regulator of symbiosome differentiation represses transcription of the secretory pathway gene VAMP721a and promotes symbiosome development in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, 25(9), pp.3584–3601. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24082011>.
- Somssich, I.E. et al., 1986. Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding “pathogenesis-related” proteins in cultured parsley cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(8), pp.2427–30. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=323310&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Song, S. et al., 2014. Jasmonate signaling and crosstalk with gibberellin and ethylene. *Current opinion in plant biology*, 21, pp.112–119. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25064075>.
- Stacey, G. et al., 2006. Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(2), pp.110–121.
- Taheri, P. & Tarighi, S., 2011. Cytomolecular aspects of rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. *Eur J Plant Pathol*, 129, pp.511–528.
- Timmers, A.C.J. et al., 2000. Saprophytic Intracellular Rhizobia in Alfalfa Nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(11), pp.1204–1213. Available at: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI.2000.13.11.1204>.
- Tintor, N. et al., 2013. Layered pattern receptor signaling via ethylene and endogenous elicitor peptides during Arabidopsis immunity to bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(15), pp.6211–6216. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1216780110>.
- Udvardi, M. & Poole, P.S., 2013. Transport and Metabolism in Legume-Rhizobia Symbioses. *Annual Review of Plant Biology*, 64, pp.781–805.
- Uppalapati, S.R. et al., 2009. Global Gene Expression Profiling During *Medicago truncatula* – *Phymatotrichopsis omnivora* Interaction Reveals a Role for Jasmonic Acid , Ethylene , and the Flavonoid Pathway in Disease Development. , 22(1), pp.7–17.
- Valente, A., de Paula, V. & Almeida, F., 2013. Revealing the Properties of Plant Defensins through Dynamics. *Molecules*, 18(9), pp.11311–11326. Available at: <http://www.mdpi.com/1420-3049/18/9/11311/>.

## Bibliographie

- Van de Velde, W. et al., 2006. Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant physiology*, 141(2), pp.711–720. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=16648219&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/doi/10.1104/pp.106.078691>.
- Velde, W. Van de et al., 2010. Plant Peptides Govern Terminal Differentiation of Bacteria in Symbiosis. , (February), pp.1122–1127.
- Vera P, C. V, 1998. Pathogenesis-related proteins of tomato P-69 as an alkaline endoproteinase. *Plant physiology*, 87, pp.58–63.
- Wang, C. et al., 2016. NODULES WITH ACTIVATED DEFENSE 1 is required for maintenance of rhizobial endosymbiosis in *Medicago truncatula*.
- WASTERNAK, C., 2007. Jasmonates : An Update on Biosynthesis , Signal Transduction and Action in Plant Stress Response , Growth and Development. *Annals of Botany* 100:, 100, pp.681–697.
- Xie, Y.R. et al., 2010. Expression and functional characterization of two pathogenesis-related protein 10 genes from *Zea mays*. *Journal of plant physiology*, 167, pp.121–130.
- Yalpani, N. et al., 2007. Salicylic Acid Is a Systemic Signal and an Inducer of Pathogenesis-Related Proteins in Virus-Infected Tobacco. *The Plant Cell*, 3(8), p.809.
- Yan, C. & Xie, D., 2015. Jasmonate in plant defence : sentinel or double agent ? , pp.1233–1240.
- Zhu, Z. et al., 2011. Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(30), pp.12539–12544. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1103959108>.

## Section V. Annexe

Figure Supplémentaire 1. Identité et similarité des PR2 chez *M. truncatula*

	1	2	3	4	5
1. Medtr2g034480.1		73.8	69.9	69.1	47.7
2. Medtr2g034470.1	85.4		90.3	87.9	44.1
3. Medtr2g034470.2	79.0	90.3		82.5	40.7
4. Medtr2g034440.1	79.0	89.0	88.4		46.0
5. OAP05907.1 PR2 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	66.6	64.6	62.5	68.1	

Section V. Annexe

Figure supplémentaire 2. . Identité et similarité des PR5 chez *M. truncatula*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
1. Medtr5g022310.1		85.0	30.6	16.0	67.0	57.5	69.7	14.6	28.3	42.1	46.7	45.8	24.9	27.2	42.9	37.4	41.1	34.5	44.2	44.6	41.7	42.0	28.5	42.9	40.9	14.2	18.2	32.1	53.6	40.8	34.1	38.9	47.1	22.2	55.6	57.5	42.0	27.5	37.8	18.7	39.5	17.7	71.8	27.0	43.7
2. Medtr5g022310.2	85.0		35.4	17.1	62.0	66.8	80.5	17.1	31.7	47.5	44.0	53.8	29.3	31.5	49.4	38.4	39.7	39.9	40.6	51.4	48.8	49.2	32.8	50.2	47.9	12.3	21.3	37.5	53.2	38.9	37.9	45.5	44.4	25.2	51.7	62.6	49.0	33.1	44.2	21.5	46.0	19.1	65.4	31.3	51.2
3. Medtr5g096900.1	45.0	52.7		11.6	30.7	35.4	34.8	12.5	28.8	35.8	31.5	38.4	41.8	43.0	35.1	32.3	35.3	31.5	27.0	35.2	36.3	38.1	22.9	35.7	34.3	10.4	19.7	51.4	31.9	29.5	53.8	33.8	31.3	22.1	28.9	34.4	37.7	28.1	34.9	18.7	30.9	20.1	29.6	23.5	41.4
4. Medtr5g088960.1	20.7	22.3	19.8		15.6	16.0	16.7	17.6	16.6	16.9	14.2	15.9	17.8	17.1	16.0	14.7	17.0	16.2	12.7	15.7	16.2	15.1	13.1	14.8	13.9	4.8	11.6	14.6	16.6	14.6	13.5	16.7	12.9	14.7	13.6	15.0	14.7	15.2	16.4	22.5	16.0	17.8	14.5	33.5	15.9
5. Medtr5g075550.1	78.1	69.9	43.5	20.3		54.2	59.1	10.8	30.1	44.0	46.0	44.8	24.4	27.5	43.8	37.9	41.4	35.7	46.1	43.5	41.4	44.4	26.2	42.0	42.0	14.8	19.0	34.1	54.0	45.0	34.4	37.5	47.3	23.3	55.9	57.1	45.3	27.6	37.0	17.9	38.1	17.0	60.4	26.8	43.5
6. Medtr5g114030.1	66.0	77.0	51.6	24.5	63.4		61.9	13.5	35.7	48.8	44.7	55.2	30.0	30.4	47.9	41.8	39.1	39.2	42.0	49.6	47.6	50.8	27.9	47.6	52.2	13.0	24.2	38.6	50.9	42.0	37.1	44.5	45.0	24.8	59.8	72.3	51.2	30.5	44.6	26.6	41.2	21.9	52.5	33.3	52.5
7. Medtr5g056020.1	75.7	86.4	49.4	22.6	67.3	74.7		13.6	31.9	50.2	41.3	50.2	29.5	30.8	46.9	38.7	39.9	38.6	39.4	48.7	46.3	47.3	30.4	48.3	46.7	13.0	21.5	37.1	53.1	40.3	37.7	43.8	43.9	27.2	51.4	60.1	50.4	33.0	42.9	20.1	45.4	17.6	70.0	32.7	50.2
8. Medtr5g031610.1	19.0	22.3	19.8	35.1	17.3	20.7	19.5		16.9	14.9	11.3	13.5	18.3	15.4	14.4	13.9	12.6	18.8	9.6	15.2	13.7	13.9	32.6	16.0	15.2	5.2	19.1	12.8	10.7	10.7	15.3	12.9	10.1	15.1	10.8	12.4	13.6	16.1	14.9	16.0	15.2	14.2	11.3	15.9	14.6
9. Medtr5g036360.1	35.0	39.8	38.7	28.1	36.9	45.6	40.1	25.0		31.1	27.3	32.4	28.2	26.4	30.0	27.5	26.8	28.5	24.1	29.8	31.9	33.3	24.4	50.2	36.3	9.1	27.0	26.3	27.2	28.5	28.2	27.6	27.2	19.4	27.6	33.3	31.9	25.4	28.1	19.2	25.4	20.7	28.1	25.2	32.5
10. Medtr5g068000.1	57.0	65.2	52.4	24.8	55.9	64.6	67.3	21.7	42.9		13.6	44.1	31.6	30.7	43.5	38.3	37.1	36.3	34.6	45.0	39.5	45.9	26.9	41.6	41.8	19.7	22.7	36.8	42.5	44.5	38.8	37.6	37.2	23.5	42.5	50.7	45.6	31.6	37.8	18.7	36.8	19.2	41.3	28.0	43.5
11. Medtr5g075550.1	63.6	57.1	46.4	20.1	64.6	58.4	55.2	19.2	35.4	51.6		80.5	23.9	26.5	41.5	36.2	40.5	30.7	53.3	42.9	41.6	43.2	27.2	38.3	37.3	14.3	19.7	32.3	44.4	37.3	34.8	34.8	31.4	30.0	50.2	50.0	43.8	27.1	36.1	15.9	32.3	18.1	46.8	26.4	41.7
12. Medtr5g075550.2	58.0	68.4	57.4	24.9	58.2	72.3	65.4	23.3	42.2	62.2	80.5		28.5	32.7	51.4	40.9	40.8	37.6	48.0	52.7	51.2	52.3	31.4	47.1	45.9	11.5	23.5	39.7	46.0	36.1	39.3	42.4	55.5	35.4	46.8	55.6	53.1	32.4	43.9	19.1	38.5	20.8	43.8	31.7	51.4
13. Medtr5g069200.1	35.3	42.6	51.6	25.4	34.0	41.4	42.4	26.6	45.1	42.1	35.1	43.8		79.0	29.2	27.5	30.6	27.5	23.7	31.3	28.8	29.5	22.0	31.6	30.0	7.8	27.9	39.5	28.1	24.1	41.7	28.9	24.8	27.3	24.1	29.1	30.8	23.0	27.9	17.5	28.8	24.7	24.5	22.2	35.5
14. Medtr5g096900.1	37.7	44.9	51.2	25.6	37.6	44.3	40.9	26.7	44.9	39.8	35.7	44.2	86.9		30.4	28.8	27.9	28.1	23.3	30.2	29.6	31.3	21.3	31.1	30.1	8.2	26.2	38.4	27.6	24.8	43.0	38.0	25.9	27.3	26.2	31.6	32.0	23.2	30.3	16.3	29.6	25.4	26.2	23.8	34.4
15. Medtr5g107140.1	54.0	62.1	55.0	22.1	56.2	61.8	59.5	21.7	40.2	59.1	50.6	63.1	41.4	42.6		41.4	43.3	42.5	36.4	51.2	67.5	54.4	29.8	45.8	48.2	11.5	21.4	39.4	41.8	35.5	38.5	48.0	40.1	24.7	39.9	48.5	51.8	30.8	48.4	18.3	36.6	23.9	40.5	30.9	54.6
16. Medtr5g094900.1	53.0	53.7	50.0	24.6	51.6	52.9	51.1	19.9	36.0	55.1	50.3	53.3	39.7	40.8	57.4		40.4	39.4	34.2	39.7	45.1	42.1	28.4	40.9	38.0	10.9	20.2	32.1	39.3	34.3	36.0	40.3	35.2	20.9	35.2	39.1	41.1	28.7	41.2	18.3	31.8	19.8	34.7	25.7	42.9
17. Medtr5g059200.1	58.3	56.4	50.0	24.1	56.2	52.5	55.7	20.2	35.1	53.2	55.2	53.9	40.8	39.0	54.3	56.0		35.6	37.6	41.0	41.5	41.9	25.7	37.0	34.6	12.3	18.9	36.9	39.2	35.9	38.0	36.2	39.6	20.9	40.4	42.0	41.7	27.9	37.1	15.8	29.3	18.9	38.6	32.6	43.2
18. Medtr5g063630.1	49.7	57.8	50.4	23.8	50.0	55.6	57.6	27.4	42.1	55.9	46.8	56.7	42.1	40.1	60.3	55.5	51.4		32.3	37.8	42.4	39.9	32.8	40.1	39.8	10.5	25.6	32.4	33.3	31.1	34.4	36.3	33.5	22.7	32.6	38.8	41.6	30.3	37.2	16.9	32.0	17.0	33.1	29.0	42.9
19. Medtr5g073720.1	58.1	52.6	39.0	17.7	60.2	52.6	52.9	15.1	34.6	46.8	66.3	58.4	32.3	30.8	46.5	46.2	48.5	43.9		37.5	37.0	37.1	22.3	35.0	35.4	16.5	17.1	28.2	43.5	38.4	34.2	31.2	53.0	25.3	50.8	46.9	37.5	22.0	31.1	15.7	29.7	16.2	46.9	24.8	39.7
20. Medtr5g111620.1	56.0	65.2	52.4	26.8	56.2	64.0	63.8	20.8	39.2	63.8	56.5	69.2	44.4	42.4	65.2	51.8	52.1	57.9	52.3		50.0	53.0	30.1	46.6	49.0	11.6	21.4	37.2	42.0	36.0	39.8	43.8	41.5	25.5	39.6	47.1	73.7	31.0	44.3	19.4	37.3	20.2	41.6	32.8	57.4
21. Medtr5g079300.1	51.3	60.2	53.2	25.0	52.0	62.5	58.4	20.8	40.8	57.5	53.2	65.9	42.1	43.3	81.1	57.7	55.3	56.0	46.5	64.8		52.5	31.7	52.5	45.5	10.2	21.8	38.3	43.1	32.5	39.5	46.6	37.7	23.7	38.7	46.8	50.4	30.0	40.6	20.6	35.6	22.7	38.9	34.4	54.5
22. Medtr5g062625.1	52.3	61.3	54.4	24.9	54.9	66.7	61.1	21.5	43.0	59.1	51.3	63.9	43.5	43.9	66.3	53.3	55.2	45.3	66.8	68.3		29.0	51.9	49.6	11.5	23.4	40.3	44.1	38.4	38.2	47.0	39.9	24.8	40.9	49.4	53.2	32.0	47.4	20.0	33.8	23.9	40.3	33.8	54.3	
23. Medtr5g063150.1	46.7	54.3	43.4	21.9	43.1	46.1	49.4	37.5	34.4	45.7	42.5	48.8	36.3	34.4	49.2	44.9	45.0	51.6	37.5	46.3	48.4	49.6		33.7	30.5	8.8	20.5	24.5	26.2	23.5	26.8	30.7	23.6	17.9	25.1	29.4	30.0	24.7	27.9	13.1	24.3	14.3	26.0	21.7	31.7
24. Medtr5g069660.1	54.7	64.1	53.6	23.5	54.6	65.8	63.4	22.2	56.8	64.2	51.6	63.9	45.7	44.9	62.7	54.4	51.8	57.1	48.3	60.4	65.4	65.4	48.8		58.8	11.9	28.4	37.4	41.4	36.0	36.4	43.2	37.2	24.3	40.2	48.5	51.0	33.2	42.9	17.6	33.2	11.8	40.4	30.7	50.6
25. Medtr5g102380.1	54.7	64.1	51.2	23.0	56.2	69.5	61.9	22.2	46.9	61.4	51.6	63.9	44.4	44.0	63.1	55.5	50.7	55.6	47.1	62.4	62.6	67.5	73.7		11.6	29.6	33.2	42.8	37.0	38.4	43.0	41.2	26.6	41.8	50.6	47.4	30.1	43.5	22.0	35.0	19.7	39.5	27.6	49.0	
26. Medtr5g067980.1*	19.8	16.4	12.9	6.9	19.4	16.7																																							

## Résumé :

En condition de carence en azote, les légumineuses ont la capacité d'établir une association symbiotique avec des bactéries du sol fixatrice d'azote, les rhizobia. Au cours de cet événement un nouvel organe, la nodosité est formée au sein de laquelle les bactéries fixent l'azote atmosphérique pour le bénéfice de la plante.

Une répression massive de l'immunité est observée lors de ce phénomène. Par ailleurs dans certaines conditions le phénomène de sénescence est mise en place et aboutit à la suppression des bactéroïdes (la forme intracellulaire des rhizobia) et à la dégradation de la nodosité. Lors de notre étude nous avons évalué le rôle de l'immunité au cours de la sénescence à travers l'analyse de différentes familles de « Pathogen-related Protein » PRs caractéristique des réponses de défense, ainsi que leur caractérisation au sein des végétaux et chez les légumineuses. Nos résultats montrent que ces gènes sont induits lors de la sénescence, mais qu'ils présentent un comportement différentiel en fonction de leur famille.

## Abstract:

In nitrogen deficiency condition, leguminous have the capacity to establish a symbiotic association with bacteria of the nitrogen-fixing soil (rhizobia); during this event a new organ, the nodosity is formed within which the bacteria fix the atmospheric nitrogen for the benefit of the plant.

Massive suppression of immunity is observed during this phenomenon, moreover, under certain conditions; this phenomenon of senescence is set up and leads to the suppression of the bacteria (the intracellular from the rhizobia) and the degradation of the nodule. In our study we evaluated the role of immunity during senescence through the analysis of different families of "pathogen-related protein" PRs characteristic of defense response, as well as their characterization within plant and legumes. Our results show that these genes are induced during senescence, but may show differential behavior depending on their family.

## تلخيص:

في ظل نقص النيتروجين تتمتع البقوليات بالقدرة على تأسيس علاقة تكافلية مع بكتيريا التربة المسؤولة على تثبيت النيتروجين (rhizobia). يتم خلال هذه الأحداث تكوين عضو جديد (العقيدة) التي من خلالها تقوم البكتيريا بتثبيت النيتروجين الموجود في الغلاف الجوي من أجل فائدة النبات. لوحظ قمع هائل للمناعة خلال هذه الظاهرة.

علاوة على ذلك، في ظل ظروف معينة يتم إنشاء ظاهرة الشيخوخة وتؤدي إلى قمع البكتيريا وتدهور العقيدات، من خلال دراستنا قمنا بتقييم دور المناعة خلال فترة الشيخوخة وذلك من خلال تحليل عائلات مختلفة من البروتينات المرتبطة بالمرض المتميزة في الاستجابات الدفاعية وكذلك خصائصها داخل النباتات والبقوليات.

تظهر نتائجنا أن هذه الجينات يتم تحفيزها خلال فترة الشيخوخة ولكنها قد تظهر سلوكا تفاضليا وفقا لعائلاتهم.