



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



Projet de fin d'études

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

Thème

Caractérisation de la famille des PRs chez *Medicago truncatula* et leur implication dans l'immunité et la symbiose.

Présenté par : - MESSAOUDI HALA SELMA
- SOUAIAIA NOUR EL HOUDA

Devant le jury :

Président : BOUTAIBA S.

M.C.A. Uni. Djelfa

Promoteur : BERRABAH F.

M.C.B. Uni. Djelfa

Examineur 1 : OUNISSI M.

M.A.A. Uni. Djelfa

Examineur 2 : BELAOUNI H.A.

M.A.A. Uni. Djelfa

Année universitaires : 2017/2018

Dédicace

À l'amour, et à la bougie de ma vie « maman » pour laquelle je vis et à qui je sacrifie tous mes sentiments.

À mon très cher « papa », pour son amour, son encouragements, qu'il trouve ici toute ma gratitude et ma grande affection.

.....Que Dieu me les garde.

À mes agréables et irremplaçables frères : Wail, Amdjad, Adam.

À ma chère sœur que j'aime beaucoup: Aya.

À mon amie Nour qui a été toujours avec moi dans le meilleur et dans le pire.

À mes amies : K̄hadidja, Sabrina, Selma, Widad, Meriem, Nour, Amina.

À tous les membres de ma famille et les personnes qui m'aiment.

Je dédie ce travail.

Messaoudi Hala Selma

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

À ma chère mère, mon chère père et à la mémoire de mon oncles Majid.

À mes chères frères Sami Ihab que je te souhaite une bonne continuité dans tes études et Oussama Billal que je te souhaite le bon courage lors de l'examen de baccalauréat.

À mes chères sœurs Assma je te souhaite le bon courage dans ton doctorat à Jordanie et Maissa je te souhaite une bonne continuité dans tes études.

À tous les membres de la famille Souaiaia surtout ma grand- mère yima et ma tante nedjoua.

À tous mes amies et collègues surtout Oum Il kïr, Aicha, Lina et Nayla.

Je dédie ce modeste travail à tous qui m'ont soutenu, m'ont encouragé Durant toute ma période d'étude. A ceux qui ont toujours voulu que je Sois la meilleure.

Souaiaia Nour El Houda

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier en premier lieu « Allah » le tout puissant de nous avoir donné le courage ainsi que la volonté pour préparer ce mémoire.

Nous exprimons toute notre gratitude et nos remerciements les plus distingués à notre cher promoteur, Dr Berrabah Fathi, qui a été constamment disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire et pour tous les conseils qu'il nous a prodigués, et sa persévérance dans le suivi.

Nous adressons nos remerciements également :

A tous nos enseignants qui nous ont donnés les bases de la science.

Nous remercions aussi les membres du jury, qui ont accepté de juger ce travail.

Nous adressons nos cordiaux remerciements à tous nos proches et tous nos amis ceux qui nous ont soutenus et encouragés.

Enfin, un grand merci à toute personne qui a participé de près ou de loin pour l'accomplissement de ce modeste travail.

Merci

Sommaire

Introduction

Partie I. Synthèse bibliographique

Chapitre 1. Introduction à l'immunité chez les plantes	1
1.1. Les interactions plantes-pathogènes	1
1.2. La PAMP TriggerdImmunity (PTI): première réponse immunitaire	1
1.3. L'EffectorTriggerdImmunity (ETI) : un rempart au blocage de la PTI	2
1.4. Les hormones immunitaires	3
Chapitre 2. Les PRs une classe majeure de protéine immunitaire	3
2.1. Rôles des PRs dans la réponse immunitaire	4
2.2. Classification des PR	4
Chapitre 3. La symbiose fixatrice d'azote	5
3.1. Définition	5
3.2. Bénéfice écologique de la fixation d'azote	6
3.3. La symbiose <i>Medicago-Sinorhizobium</i>	6
3.4. Structure d'une nodosité indéterminée	7
Chapitre 4. La symbiose et l'immunité	8
4.1. L'immunité au cours des étapes précoces de la symbiose	8
4.2. L'immunité au cours des étapes tardives	9
Chapitre 5. Sénescence et immunité	9
5.1. La senescence des nodosités	9
5.2. Les effecteurs de la sénescence des nodosités décrits	10
5.3. Connexions immunité et sénescence	10

5.4. Les PRs s'impliquent dans sénescence ?	11
5.5. Objectifs de l'étude	11

Partie II. Matériels et méthodes

1. Identification des gènes PRs au sein du génome de <i>M. truncatula</i>	12
2. Représentation des structures génomique	12
3. Prédiction des domaines ayant une fonction biochimique	12
4. Analyse phylogénétique	12
5. Analyse de transcriptome	13

Partie III. Résultats

1. Le génome de <i>M. truncatula</i> présente plusieurs classes de PRs	14
2. Les PR de classe 5, le groupe le plus grand chez <i>M. truncatula</i>	15
3. La PR de classe 10: la seconde groupe de PR chez <i>M. truncatula</i>	17
4. Structure des gènes codants les autres classes de PR	17
5. Structure protéiques des PRs	18
6. Analyse évolutive des PRs : plusieurs origines possibles	19
7. Analyse d'expression des PRs en réponse aux pathogènes	21
8. Des PRs sont spécifiques réponse immunitaires	23
9. Des PRs induites au cours de la sénescence	24
10. Une connexion entre l'immunité et la sénescence ?	28
11. Les PRs impliquées dans la symbiose ?	29

Partie VI. Discussion

Conclusion

Références bibliographiques

Liste des figures

Figure 1. Blocage de PTI par ETI «Effector Triggered Immunity»	2
Figure 2. La symbiose <i>Medicago-Sinorhizobium</i>	7
Figure 3. Analyse de la répartition relative génomique des PRs de <i>M. truncatula</i>	15
Figure 4. Représentation des structures génomiques de membre de la classe PR5	16
Figure 5. Représentation des structures génomiques de membre de la classe de PR10	17
Figure 6. Structure des gènes codant les autres classes de PRs	18
Figure 7. Analyse phylogénétique des PRs de <i>M. truncatula</i>	20
Figure 8. Expression des PRs 5, PRs 10 et des autres PRs de <i>M. truncatula</i> en réponse au pathogène <i>Phymatotricum omnivorum</i>	22
Figure 9. L'analyse des PRs communément ou spécifiquement induites en condition teste par rapport au contrôle pour différents traitements	24
Figure 10. Expression des PRs5, PRs10 et des autres PRs de <i>M. truncatula</i> au sein de racines	26
Figure 11. Expression relative des gènes PRs au cours de la sénescence et de la réponse immunitaire	29
Figure 12. Expression des PRs 5, PRs10 et d'autre PRs de <i>M. truncatula</i> sans inoculation avec <i>Sinorhizobium sp</i> et après l'inoculation	30
Figure 13 ; Connexion immunité symbiose	36
Figure S1. Expression des PR5, PR10 et des autres PRs au sein de racines <i>M. truncatula</i> en réponse au pathogène <i>Aphanomyces eutriche</i>	55
Figure S2. Expression des PR5, PR10 et des autre PRs au sein de racines <i>M. truncatula</i> en réponse au pathogène <i>Ralstonia solanacearum</i>	56

Figure S3. Expression des PR5, PR10 et des autre PRs au sein de racines <i>M. truncatula</i> en réponse au pathogène <i>Macrophomina sp</i>	57
Figure S4 : Expression des PR5, PR10 et des autre PRs de cellules géantes de <i>M. truncatula</i> en réponse aux extraits de levure	58
Figure S5 : Expression des PR5, PR10 et des autre PRs de cellules géantes de <i>M. truncatula</i> en réponse au méthyle de jasmonate	59
Figure S6 : Expression des PRs 5, PRs 10 et des autre PRs au sein de nodosités traite avec de la phosphoétricine	60

Liste des tableaux

Tableau 1. Les différentes classes de PRs et leurs activités biochimiques respectives	4
Tableau S1. Principales caractéristiques physiques des protéines identifiées	45
Tableau S2. Correspondance gènes et sonde affymetrix	49
Tableau S3. Correspondance sonde-numéro sur figure heatmap	53
Tableau S4. PRs induite dans des racines non traitées (contrôles)	54

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique «DNA»
ADN	ADN complémentaire
AJ	Acide jasmonique
AS	Acide salicylique
Avr	Avirulence
Ca²⁺	Ion calcium
CC	Domaine en torsade d'hélices «coiledcoildomain»
CPs	Les cystéines protéase
DAMP	Domage AssociatedMolecular Pattern
DUF26	Domain UnkownFunction 26
Et	Ethylène
ETI	Effector Triggered Immunity
ETS	Effector Triggered Susceptibility
Flg22	Peptide de la flagelline
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
LRR	Séquence répétée riche en leucine «leucine richrepeat»
LRR-RLK	Leucine-Rich Repeat-Receptor-like Kinases
LRR-RLP	Leucine-Rich Repeat-Receptor like Proteins
LTP	Lipid Transfer Protein
MAPK	Protein MAP kinase «Mitogen Activated Protein Kinase»
MAMP	Microbe-associated molecular pattern»
N₂	Azote atmosphérique
NBS	Nucleotide Binding Site
NDIR	Nodule Defficient in Immunty Repression

NFP	Nod Factors Perception
NO	Oxydenitrique
Nod	Facteurs de nodulation
NOP	Nodule Outer Protein
PAMP	Pathogen Associated Molecular pattern
PCD	Mort cellulaire programmée
PR	Pathogenesis Related protein
PRR	Pattern recognition receptor
PTI	PAMP Triggered Immunity
Gène R	Gène de Résistance
RLK	Receptor-Like Kinase
RNase	Ribonucléase qui dégrade l'ARN
ROS	ReactiveOxygenSpecie
TIR	Toll and Interleukin-1 receptor
K	Chromosome

Unités

Aa	Acide aminée
Hpi	Hour post inoculation
Dpi	Day post inoculation
Kda	kilo dalton

Introduction

Medicago truncatula, en condition de carence azotée interagit avec une bactérie du sol fixatrice d'azote, *Sinorhizobium* sp. Au cours de cette interaction un nouvel organe racinaire est formé, la nodosité fixatrice d'azote, au sein de laquelle les bactéries infectent de manière intracellulaire et chronique les cellules de l'hôte. Dans certaines conditions la nodosité entame un processus de sénescence caractérisé par la dégradation des bactéries et des tissus de l'hôte. L'étude réalisée par Guadgaud & Saad a révélé que certains gènes codant des PRs (Pathogenesis-Related protein) peuvent être induits au cours de la sénescence, les auteurs émettent l'hypothèse que ces protéines sont requises pour la suppression des bactéroïdes au cours de la sénescence. La famille des PRs est caractérisée chez *M. truncatula* et dans le but d'améliorer notre compréhension de la relation de cette famille avec la symbiose, nous avons étudié ces gènes chez la plante. Des analyses génomiques, transcriptomiques, protéomiques et phylogénétiques ont été ainsi réalisées.

Nous avons découvert 66 gènes correspondant à des PRs, qui sont principalement de classes 5 et 10, ainsi qu'un petit nombre de PRs de classe variée. Les PRs sont issues de plusieurs origines évolutives et présentent une répartition génomique hétérogène qui recouvre l'ensemble de 8 chromosomes de la plante. L'analyse d'expression a mis en évidence un groupe de PRs qui sont constitutivement exprimés dans les racines et participant fort probablement à l'immunité basale de cet organe. La majeure partie des PRs est induite en réponse aux pathogènes, ce qui conforte la fonction de cette famille. Un groupe de PRs est induit au cours de la sénescence des nodosités, certaines d'entre elles sont stimulées au cours de l'immunité. De manière surprenante, plusieurs PRs sont induites au sein de nodosités fonctionnelles, mettant ainsi en évidence l'importance de cette famille au cours de la symbiose.

Au cours de notre étude, nous démontrons de manière claire que la sénescence recrute des mécanismes immunitaires via l'induction des PRs, probablement afin de détruire les bactéries intracellulaires. Mais aussi que certaines peuvent être induites au sein des nodosités fonctionnelles potentiellement pour réguler le phénomène d'infection des nodosités. Notre travail de recherche constitue la première caractérisation de la famille des PRs chez *M. truncatula* et son implication dans des processus historiquement considérés comme indépendants (Symbiose/ Sénescence/ Immunité).

Partie I

Synthèse bibliographique

Chapitre 1. Introduction à l'immunité chez les plantes

1.1. Les interactions plantes-pathogènes

Les plantes sont continuellement au contact de microorganismes qui peuvent être dans certain cas pathogènes, ces derniers possèdent une batterie d'outils moléculaires permettant de franchir la barrière immunitaire de leur hôte et de provoquer la mort¹. Au cours de l'évolution les plantes ont développées un ensemble de mécanismes allant des barrières protectrices (exemple : la cuticule) à un système immunitaire comportant des gènes leur permettant de résister aux agresseurs².

1.2. La PAMP Triggered Immunity (PTI): première réponse immunitaire

Lorsqu'un pathogène franchit les barrières protectrices, il est détecté au niveau cellulaire par des récepteurs immunitaires nommés PRR (Pathogens Recognition Receptor)³ qui reconnaissent des motifs moléculaire conservés entre différents microorganismes, appelé M/PAMP (Microbial/Pathogen Associated Molecular Pattern) tel que le peptide flg22 de la flagelline⁴. De plus les plantes peuvent reconnaître indirectement les pathogènes par la reconnaissance des DAMPs (Damage Associated Molecular Pattern) qui sont des fragments de parois péctocellulosiques libérés au cours du processus infectieux⁵. L'interaction entre le PRR et son ligand déclenche des cascades de signalisation impliquant entre autre des flux de Ca^{2+} , la génération de formes actives de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species) et l'activation des protéines de signalisation immunitaire telle que les MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinase). Ces évènements aboutissent à la production de composés de défense (exemple : les phénols) et l'induction de l'expression de gènes immunitaires⁶.

1.3. Effector Triggered Immunity (ETI) : un rempart au blocage de la PTI

Afin de bloquer la PTI, les pathogènes ont mis en place des mécanismes, ainsi certaines bactéries peuvent injecter au sein des cellules de la plante des petites peptides, appelés effecteurs qui sont codés par des gènes d'Avirulence (Avr)⁷. Une fois dans le cytosol les effecteurs reconnaissent les protéines associées à la signalisation PTI et bloquent leurs activités biologiques^{7,8}, conduisant à un arrêt de la

réponse immunitaire ^{8,9}, Dans ce cas on parlera d' Effector Trigger Sensitivity ou ETS⁹. Afin de prévenir l'effet des effecteurs, les plantes utilisent des récepteurs intracellulaires codés par des gènes de Résistance ou gènesR⁹. Ces récepteur sont des Nucleotide Binding Site(NBS)-Leucine ReachRepeat (LRR), qui reconnaissent spécifiquement les effecteurs et conduisent à une réactivation de la réponse immunitaire^{8,9}. Ces récepteurs sont composés d'un domaine de fixation aux nucléotides NBS et un domaine LRR permettant la perception des effecteurs. En fonction de la présence ou de l'absence d'un troisième domaine TIR (ToIInterleukin-likeReceptor) on distingue deux grandes classes. La première est celle des récepteurs disposant du domaine TIR, nommés TIR-NBS-LRR et ceux dépourvus de ce domaine, les CC-NBS-LRR¹⁰.L'activation du récepteur aboutie à une réponse plus intense de l'hôte par rapport à la PTI, ce qui est traduit par à l'activation de la mort cellulaire programmée (PCD) des cellules infectées ⁸, ceci vise à supprimer localement le pathogène. Dans ce cas on parlera d'Effector Trigger Immunity(ETI) ¹¹.

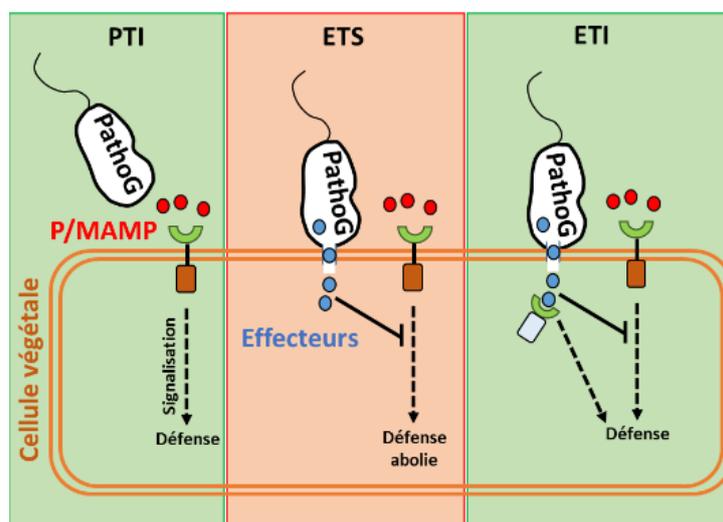


Figure 1.PTI et ETI. Les pathogènes sont d'abord reconnu par leurs motifs P/MAMP via des récepteur PRR, ce qui déclenche une réponse immunitaire PTI. Certain pathogène peuvent injecter des effecteurs au sein de la cellule hôte et bloque la PTI, aboutissant à une ETS, enfin les effecteurs injectés peuvent être reconnu par des récepteurs intracellulaires qui réactivent la réponse immunitaire conduisant à une ETI¹⁰.

Partie I. Synthèse bibliographique

1.4. Les hormones immunitaires

Tous au long du processus de réponse immunitaire, des modifications hormonales sont observées, elles participent entre autre à l'activation des gènes de défense et à la transmission de l'information immunitaire¹². L'acide salicylique (AS) est une hormone végétale dérivée de l'acide phénolique. Elle est impliquée dans la réponse des plantes aux pathogènes biotrophes (se nourrissant de tissus vivant)¹³. L'acide jasmonique (AJ) dérivée de l'acide linoléique¹⁴ est la second grand hormone immunitaire, elle intervient dans la réponse aux pathogènes nécrotiques (se nourrissant de tissus mort). Les voies de signalisations associées au SA et au JA sont généralement antagonistes¹², ce qui permet d'apporter une réponse immunitaire spécifique en fonction du type de pathogène. Enfin, l'éthylène (ET) est une hormone végétale volatile, dérivée de la méthionine, impliquée dans divers processus physiologiques dont la réponse immunitaire¹⁵⁻¹⁷.

Chapitre 2. Les PRs une classe majeure de protéine immunitaire

L'ensemble des évènements cités ci-dessus aboutissent à des modifications physiologiques importantes se traduisant entre-autres par l'activation de l'expression de gènes immunitaires. L'une des classes majeurs de ce type de gènes est celle Pathogenesis Related protein (PR)¹⁸.

2.1. Rôles des PRs dans la réponse immunitaire

Les PRs font parties intégrantes de la réponse immunitaire, elles interviennent en régulant les activités biochimiques de la cellule hôte ou en agissant directement sur les pathogènes par des effets antifongiques et antimicrobiennes¹⁹. Un pathogène peut stimuler une ou plusieurs PRs, de même les PRs sont spécifiques de certaine voies hormonales, telle que la PR1 qui est stimulé en réponse à l'acide salicylique¹². Au niveau de la racine qui est exposée à une densité de microorganismes élevées, un membre de la classe des PR10 chez *M. truncatula* présentent une expression basale élevé, il est probable qu'il garantisse un seuil immunitaire minimal au niveau de cette

organ²⁰. Actuellement peu d'information sont disponibles quant à cette famille de protéine chez les légumineuses telle que *M. truncatula*.

2.2. Classification des PR

La famille des PRs regroupe des protéines ayant des caractéristiques différentes.⁶³Elles sont classées en fonction de leurs propriétés biochimique et moléculaire en 17 classes. Le tableau ci-dessous présente les différents groupes ainsi que l'activité biochimique de chaque protéine.

PRs	Propriété	PRs	Propriété
PR1	inconnue	PR10	Ribonucléase-like
PR2	β -1,3-glucanase	PR11	Chitinase
PR3	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII	PR12	Défensine
PR4	Chitinase type I, II	PR13	Thionin
PR5	Thaumatine like	PR14	Protéine de transfert de lipide
PR6	Inhibiteur I d'inhibiteur de Proteinase	PR15	Oxalate oxidase
PR7	P69 Endoprotéinase	PR16	Oxalate oxidase-like
PR8	Chitinase type III	PR17	Inconnue
PR9	Peroxydase		

Tableau 1. Les différentes classe de PRs et leurs activités biochimiques respectives (modifié de ¹⁸).

Les classes de PR-1 et PR-17 sont de fonction inconnu²¹. Les PR-3, PR-4, PR-8 et PR-11 font partie de la famille des hydrolase, ces protéines en plus de la PR2 qui est une β -1,3-glucanase sont impliquées dans la dégradation des parois fongiques et bactériennes²². La PR-5 quant à elle est induites par divers agents pathogènes et présentant des propriétés antifongiques^{18,23}. La PR-6 est un inhibiteur de protéase, après ingestion elle provoque des indigestions chez les nuisibles¹⁸. La PR-7 représente

Partie I. Synthèse bibliographique

des protéases dont le rôle effectif dans la défense n'a pas été caractérisé²¹. La classe des PR-9 présente des activités peroxydases H₂O₂-dépendantes dont le rôle est de renforcer la paroi végétale. Les PR-10 sont des protéines acides (pI= 4,66) dont la masse moléculaire est remarquablement invariable (154-160 aa, 16-18 kDa), ces protéines sont structurellement proches de ribonucléases, l'hypothèse d'une fonction RNase attribuée à ces protéines a été émise²⁴. La classe des PR-12, appelées également défensives, inhibe la croissance fongique en perméabilisant la membrane des champignons, un rôle identique a été attribué aux PR-13, appelées thionines²¹. La famille des PR-14 comporte des protéines non spécifiques transportant les lipides ou LTP (Lipid Transfer Protein)²⁵. Récemment deux autres classes ont été ajoutées PR15 et PR16 qui comportent des protéines germine et germine-like²⁶. La PR16 a été isolée à partir du piment en situation de résistance à des infections bactériennes et virales²⁷. Identifié sur des cellules de tomate, PR-17 est de fonction inconnue²⁸.

Notre étude porte sur le rôle des PRs au cours de la symbiose fixatrice d'azote. Le chapitre suivant décrit la biologie de la symbiose fixatrice d'azote chez *M. truncatula*.

Chapitre 3. La symbiose fixatrice d'azote

3.1. Définition

La symbiose est une interaction entre deux ou plusieurs organismes avec bénéfices mutuelles¹⁰. A l'inverse des pathogènes, certaines bactéries telles que les rhizobia établissent une interaction symbiotique avec les légumineuses qui sont des plantes de la famille des fabacées²⁹. Cette interaction conduit à la formation d'un nouvel organe, la nodosité au sein de laquelle les bacteroids (forme intracellulaire des rhizobia) fixe l'azote atmosphérique (N₂) en forme d'azote assimilable par la plante (NH₃⁺) via l'action d'une enzyme bactérienne, la nitrogénase. En échange la plante fournit une niche écologique préférentielle à son partenaire³⁰.

3.2. Bénéfice écologique de la fixation d'azote

La révolution verte des années cinquante a été caractérisée par l'utilisation massive et non contrôlée des produits chimiques par les agriculteurs, tel que les engrais minéraux. Cela a permis d'augmenter les rendements mais, malheureusement on constate les

effets nocifs que ces pratiques ont sur la qualité de l'environnement. L'utilisation de ce type d'amendement provoque entre autre l'eutrophisation et l'acidification des sols conduisant à une déstructuration des communautés microbiennes et à la réduction de la biodiversité³¹. Une alternative à l'utilisation des engrais minéraux est l'emploi de plantes ayant la capacité d'enrichir les sols en molécules fertilisantes, les légumineuses peuvent être utilisées en temps qu'engrais vert azoté permettent de réduire fortement l'utilisation d'engrais de ce type³² et de participer ainsi à la préservation de l'environnement.

3.3. La symbiose *Medicago-Sinorhizobium*

En condition de carence azotée *M. truncatula* a la capacité d'établir une interaction symbiotique avec *Sinorhizobium* sp³³. Une phase de reconnaissance entre les deux partenaires a tout d'abord lieu et correspond par la sécrétion des flavonoïdes par *M. truncatula* qui sont reconnus par la bactérie³⁴. Cette dernière produit en retour des facteurs de nodulation (Nod) qui sont des lipochito-oligosaccharides reconnus par le récepteur NFP (NodFactors Perception) de l'hôte, déclenchant une cascade de signalisation symbiotique³⁵. Les bactéries infectent les racines de la plante via la formation d'un cordon d'infection. Parallèlement une réactivation de la division des cellules du cortex de la racine au point d'infection a lieu ce qui formera le futur primordium nodulaire. A la fin du processus un nouvel organe racinaire est formé, la nodosité fixatrice d'azote³⁴ (Figure 2).

3.4. Structure d'une nodosité indéterminée

M. truncatula a la caractéristique de former des nodosités de type indéterminée de forme allongée, dû à la présence d'un méristème apical ayant une forte activité³⁶.
Les nodosités indéterminées

Présentent une zonation de leurs tissus : une première zone ou zone I (ZI) au sein de laquelle on trouve le méristème est observée, elle est suivie par la zone d'infection ou zone II (ZII), au sein de laquelle les rhizobia infectent les cellules de l'hôte, puis une zone de fixation d'azote ou zone III (ZIII) dans laquelle les bacteroids (forme intracellulaire des rhizobia) fixent l'azote atmosphérique (N_2) et le convertissent en NH_3^+ . La ZIII est séparée de la ZII par une inter-zone ou ZII-III dans laquelle les bacteroids subissent un processus de différenciation terminal (voir ci-dessous)³⁷. Enfin quand la nodosité devient trop âgée, quand les plantes subissent un stress ou que de l'azote organique est ajouté à des plantes nodulées, une zone de sénescence ou zone IV (ZIV) apparaît, au sein de laquelle les bacteroids et les composants des cellules de l'hôte sont dégradés³⁸, par ailleurs cette zone peut être recolonisée par des rhizobia saprophytes³⁹ (Figure 2).

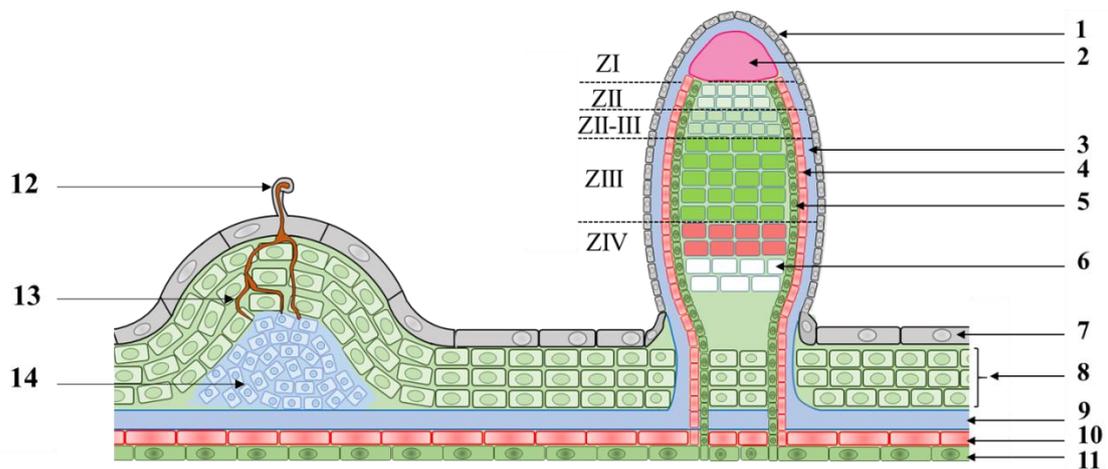


Figure 2. La symbiose *Medicago-Sinorhizobium*. Au de la symbiose, après la phase de reconnaissance les bactéries forment un cordon d'infection (13) qui pénètre au sein de la racine via les poils absorbant (12). En parallèle une réactivation de la division des cellules du cortex à lieu formant le future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

5: phloème, 6: cellules vides, 7: épiderme racinaire, 8: cortex racinaire, 9: endoderme racinaire et péricycle, 10: xylème racinaire, 11: phloème racinaire (modifié de²⁹).

Chapitre 4. La symbiose et l'immunité

4.1. L'immunité au cours des étapes précoces de la symbiose

Plusieurs travaux de recherches ont démontrés le rôle clé du système immunitaire au cours de la symbiose. Par exemple, les rhizobia ont la capacité de stimuler des réponses immunitaire chez des plantes non-hôtes (non légumineuses)⁴⁰, mais aussi chez des plantes hôtes^{41,42}, cette stimulation est dû à la présence de motifs moléculaire conservée entre les microorganismes appelé MAMP. La répression de l'immunité est nécessaire afin de permettre la mise en place de la symbiose, elle est traduite par une répression massive de l'expression des gènes de défens⁴¹. Différentes stratégies sont élaborées par les rhizobia afin de réduire ou de bloquer la stimulation de la réponse immunitaire de l'hôte⁴²; les exopolysaccharides contribuent à masquer les MAMPs et réduises la signalisation immunitaire⁴³. Les rhizobia au cours de leurs évolution ont modifiées certains MAMPs afin d'éviter une stimulation de la réponse chez l'hôte, par exemple *Sinorhizobium meliloti* présente un peptide flg22 avec une structure différente de la structure canonique du peptide^{44,45}. 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 hôte⁴⁶. La plante de son côté réprime son immunité via la signalisation symbiotique ou la mise en place de gènes spécifiques⁴².

4.2. L'immunité au cours des étapes tardives

Une fois la nodosité formée, plusieurs gènes impliqués dans la répression des défenses ont été décrits; *NADI*, *DNF2*, *SymCRK* et *RSD* qui codent respectivement une protéine de fonction inconnue, une phospholipase C phosphatidyl inositol dépendante, un RLK possédant deux Domain Unkown Function 26 (DUF26) et un facteur de transcription de type C₂H₂ respectivement^{20,47-49}. Les mutants correspondants présentent une réactivation de la réponse immunitaire au sein de leurs nodosités caractérisés par une induction de l'expression de gènes de défense tel que la PR10,

l'accumulation de composés phénoliques et une mort des bacteroids^{48,50}. Le mécanisme par lequel fonctionnent ces gènes est actuellement inconnu, mais certains facteurs influencent le phénotype des mutant ; par exemple quand *dnf2* est cultivé dans un milieu sans ulvan (une molécule potentialisant les réponses immunitaires), le mutant produit des nodosités fixatrices d'azote, ce qui indique que l'environnement influence le phénotype du mutant⁵¹. Les mutants *symCRK* et *rsd* quant à eux présentent une forte réduction de la réponse immunitaire au sein de nodosité induite par le mutant *bacAde S. meliloti* incapable de survivre dans la cellule hôte⁵⁰, ce qui laisse à penser que l'infection correcte des tissus et/ou la différenciation des bacteroids sont requises pour la stimulation des défenses chez *symCRK/rsd*.

Chapitre 5. Sénescence et immunité

5.1. La sénescence des nodosités

L'activation de la réponse immunitaire conduit à un arrêt brutal de la symbiose et à la suppression des bacteroid. La sénescence des nodosités est un second mécanisme de suppression de bactérie intracellulaire. C'est un processus par lequel les plantes dégradent de manière progressive les constituants d'une cellule ou d'un tissu et recycle les composés libérés au cours de la lyse³⁸. Quand les plantes sont stressées, quand de l'azote organique est ajouté au milieu de culture ou quand les nodosités deviennent trop âgées, la sénescence est activée. Cette dernière se traduit par la formation d'une zone de sénescence ou ZIV à la base de l'organe³⁸ et progresse tout le long de ce dernier. Dans cette zone les bacteroids, puis les cellules hôtes sont dégradées, il en résulte la présence de cellules vides à la base de la nodosité³⁸, ce tissu peut être recolonisé par des rhizobias qui vivent de manière saprophyte³⁹. 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^{38,52}. 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 ⁵².

5.2. Les effecteurs de la sénescence des nodosités décrits

Les cystéines protéase (CPs) sont des protéines qui possèdent une activité protéolytique ⁵³, 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 ⁵². Le silencing de *MtCP6* et de *Vacuolar Processing Enzyme*. (*MtVPE*) retard la sénescence des nodosités ⁵³, ces deux protéines se localisent au symbiosome et il est postulé qu'elles jouent un rôle dans la dégradation de ces organites au cours de la sénescence ⁵³. 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 ⁵⁴.

5.3. Connexions immunité et sénescence

L'immunité et la sénescence ont toujours été considérées comme deux événements indépendants, bien qu'ils aboutissent tous les deux à la suppression du bactéroïde. L'étude menée par madame Guadguad et madame Saad ⁵⁵ a permis de mettre en évidence que les cystéines protéinase n'ont pas été induites au cours de la réponse aux pathogènes. Ce qui indique que ce type de protéines n'est potentiellement pas essentiel aux processus immunitaires. Par ailleurs l'analyse de l'expression de gènes de défense indique une induction de certains d'entre eux au cours de la sénescence des nodosités stimulées au nitrate. Ces observations ont permis à leurs auteurs d'émettre l'hypothèse qu'au cours de la sénescence, une réactivation de l'immunité a lieu. Remettant en question la théorie de séparation entre immunité et sénescence au sein des nodosités.

5.4. Les PR s'impliquent dans la sénescence ?

Les PR sont des protéines clés de la réponse des plantes aux pathogènes. Différentes études ont montré que la PR10 (utilisée comme marqueur de défense) est induite chez des mutants présentant un dysfonctionnement immunitaire au sein des nodosités

(*symCRK*, *rsd*, *dnf2* et *nad1*)^{20,48,49,56}. De plus, des résultats préliminaires révèlent que certaines PR sont induits au cours de la sénescence⁵⁵. Ces observations font de ces protéines des candidats pour l'étude de la connexion immunité-sénescence au sein des nodosités.

5.5. Objectifs de l'étude

Actuellement aucune donnée n'est disponible quant à l'organisation de la famille des PRs chez *M. truncatula* (plante sur laquelle l'ensemble des études citées ont été réalisées) et sur le rôle de cette famille au cours de la réponse aux stress biotiques, à la symbiose et au processus de sénescence. Notre travail de recherche consisté a validé l'hypothèse émise quant à la connexion de la sénescence et de l'immunité ainsi que de caractériser ce lien à travers l'étude poussée de la famille des PRs chez *M. truncatula* au niveau génomique, protéomique et évolutive ainsi que de l'analyse de leur expression au cours des processus de pathogénie, de symbiose et de sénescence. Notre travail de recherche constitue la première caractérisation de cette famille de gènes chez *M. truncatula* et son implication dans des processus historiquement considérés comme indépendants

Partie II

Matériels & Méthodes

Partie II. Matériels & Méthodes

1. Identification des gènes PRs au sein du génome de *M. truncatula*

Les PRs présentes au sein du génome de *M. truncatula* ont été identifiées via une recherche par annotation et complétée par une recherche d'homologie (blast) en utilisant la séquence protéique type pour chaque classe de PR. Les recherches ont été réalisées au sein de la base de données du Craig Venter Institut (<http://www.medicagogenome.org/>), qui contient entre autre le génome séquencé de cette plante modèle, pour laquelle il possède la dernière version d'annotation.

2. Représentation des structures génomique

La structure intron/exon a été analysée à partir des données génomiques disponibles sur le Craig Venter Institut, puis la représentation des résultats a été réalisée avec le logiciel Power Point. Parallèlement à cela une analyse de la répartition relative des PRs au sein du génome de *M. truncatula* a été effectuée et représentée avec le même logiciel.

3. Prédiction des domaines ayant une fonction biochimique

Afin de détecter la présence des domaines fonctionnels dans les protéines identifiées nous avons soumis les séquences à une analyse par l'outil Protein Domain Prediction du NCBI (National Center for Biotechnology Information ; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Cet outil propose d'identifier les domaines putatifs présents au sein d'une protéine en comparant sa séquence à des bases de données répertoriant les domaines caractérisés dans la littérature.

4. Analyse phylogénétique des protéines

Dans le but de comparer les parcours évolutifs des différents PRs identifiées, nous avons réalisé un arbre évolutif en utilisant le logiciel Molecular Evolutionary Genetics Analysis 7 (MEGA7). Ce logiciel est un outil qui permet d'effectuer un alignement de séquences de manière automatique & manuelle, de construire des arbres phylogénétiques, d'estimer des taux d'évolution moléculaire et de tester des hypothèses d'évolution.

5. Analyse des transcriptome

Au cours de l'étude nous avons analysé l'expression des PRs de *M. truncatula* dans des conditions de réponses immunitaires (*Phymatotricum. omnivorum*, *Ralstoniasolanacearum*, *Aphanomyceseuterich*, *Macrophominasp*, extrait de levure et méthyle de jasmonate)³⁰ et symbiotiques (plante nodulée traitée ou non avec des nitrates ou à un inducteur de sénescence, la phosphénotricine)³⁰. La première étape consiste à télécharger les données à partir de la base de donnée du *Medicago truncatula* Gene Expression Atlas (MtGEA ; <https://mtgea.noble.org/>). Ce dernier contient plusieurs centaines de résultats de transcriptomes (ensemble des transcrits) issues d'hybridation d'ADNc sur des puces à ADN de type Affymetrix. La technologie permet de révéler l'expression simultanée de milliers de gènes. Après téléchargement des données un calcul des moyennes d'expression de chaque gène pour chaque condition a été réalisé, puis une analyse par clustering est effectuée par l'outil heatmapper (<http://heatmapper.ca/>). Au cours de l'analyse nous avons sélectionné l'une des méthodes utilisées dans la littérature qui est clustering de type complet linkage ainsi qu'un calcul de la distance de type Person.

Partie III

Résultats

Partie III. Résultats

1. Le génome de *M. truncatula* présente plusieurs classes de PRs

Lors de notre recherche, 66 gènes correspondants à des PR sont été identifiés au sein du génome de *M. truncatula*. 9 gènes possèdent deux allèles (Medtr1g025420.1, Medtr2g076010.1, Medtr2g076070.1, Medtr3g055120.1, Medtr4g073730.1, Medtr4g120760.1, Medtr5g022310.1, Medtr5g022350.1 et Medtr8g075510.1). Un gène ne code aucune protéine (Medtr4g120950.1), mais la majorité des gènes codent des protéines de la classe des PR5 (38) et PR10 (16). Enfin un faible nombre (12) regroupé dans cette étude sous la nomination de « autres PRs » correspond à des classes de PR2, PR3, PR4 et PR6 et des PRs non-affiliées aux classes décrites dans la littérature. Au cours de l'analyse aucune protéine de type PR 7 à 9 et PR11 à 17 n'a été détectée.

Le génome de *M. truncatula* comporte 8 chromosomes, afin de vérifier si la répartition des PRs au sein du génome de la plante est homogène ou au contraire si certaines classes peuvent se localiser sur des régions chromosomiques définies, nous avons étudié la distribution des PRs par chromosome. La figure 3 présente les résultats obtenus. Les protéines appartenant à la classe des PRs 5 se retrouvent dans l'ensemble des chromosomes avec une accumulation au niveau du chromosome 8. Les PR10 sont identifiées dans l'ensemble du génome excepté dans le chromosome 5 et comme pour la classe précédente, elles se localisent en plus grand nombre au niveau du chromosome 8. Les autres PRs sont réparties sur l'ensemble des chromosomes excepté le K6. Ces résultats indiquent que les PRs se répartissent de manière hétérogène au sein du génome de *M. truncatula* et que le chromosome 8 contient le plus grand nombre de PR5s et PR10s.

Partie III. Résultats

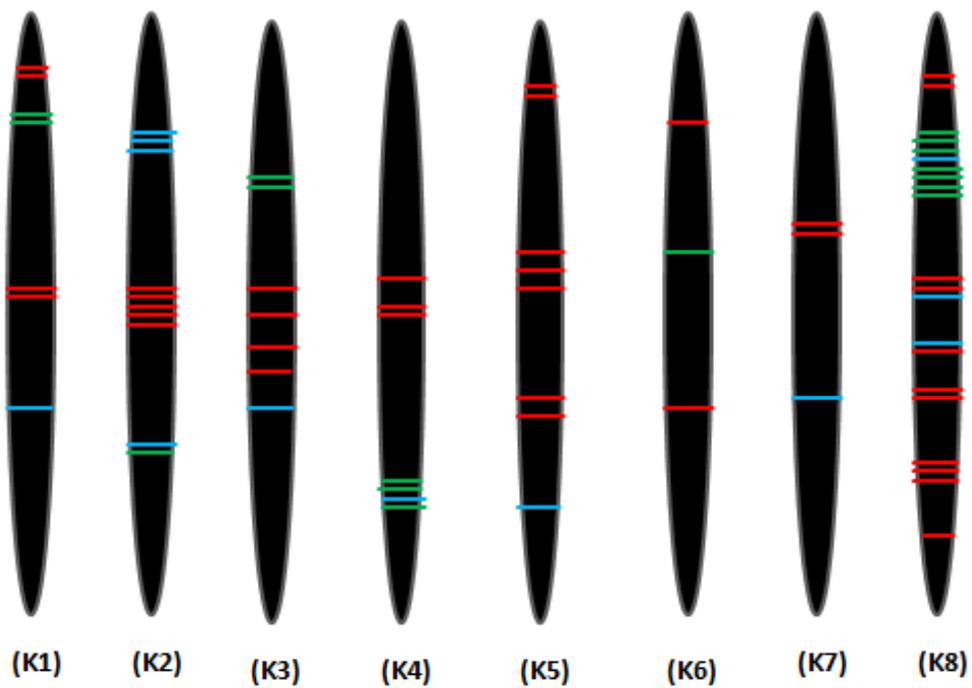


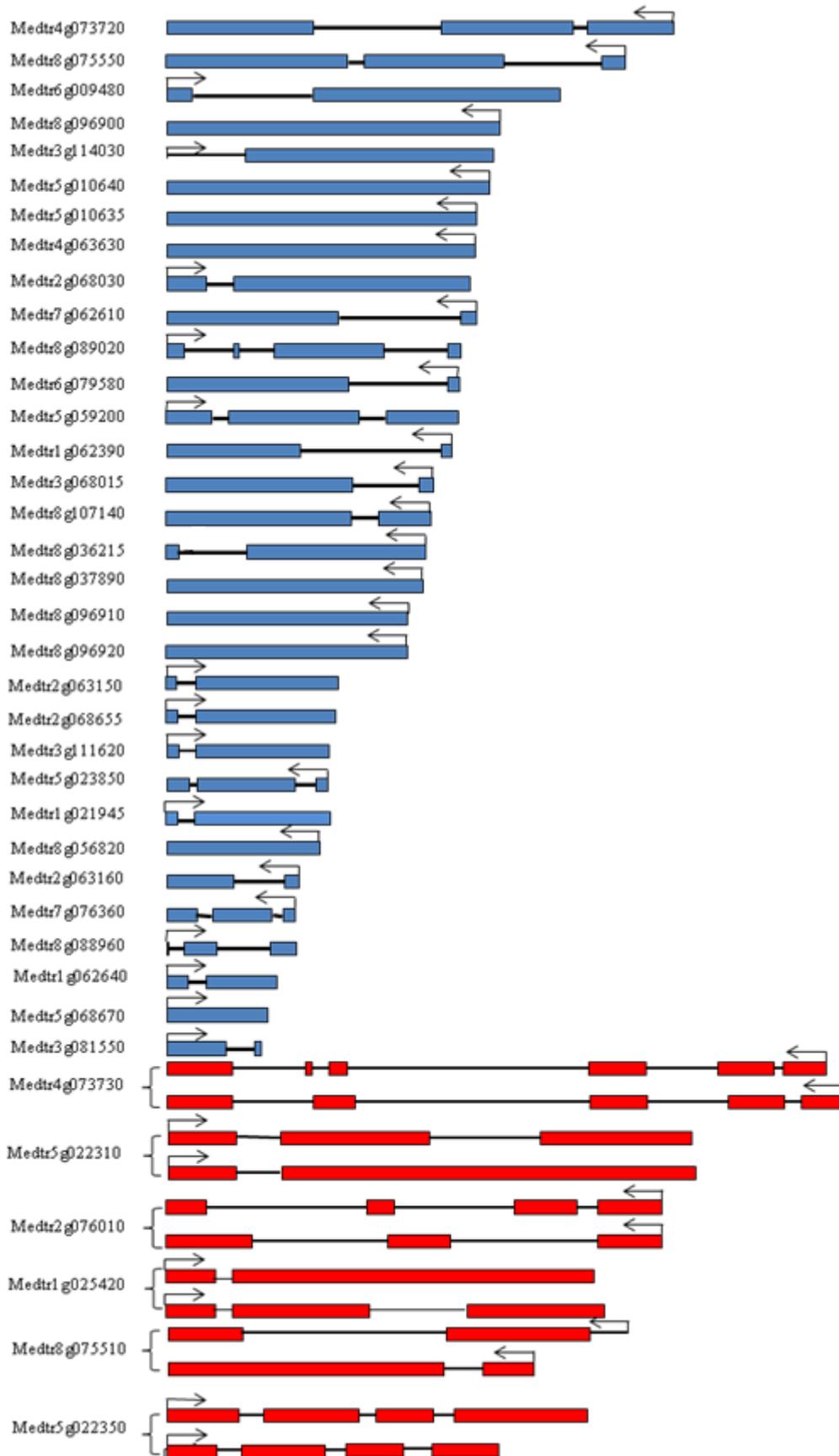
Figure3. Analyse de la répartition relative génomique des PRs de *M. truncatula*. En rouge les PRs5, en vert les PRs10 et en bleu les autres PRs sur les chromosomes de *M. truncatula*. K : chromosome.

Partie III. Résultats

2. Les PR de classe 5, le groupe le plus grand chez *M. truncatula* :

La classe de PR5 est la plus abondante au sein de la famille des PRs chez *M. truncatula* avec 38 membres. Afin de mieux comprendre la structure génomique de ces gènes, nous avons analysé la composition exon/intron pour chaque membre des classes identifiées. La figure 4 représente les structures des gènes codant les PR5s. On observe une hétérogénéité en termes de nombre d'exon et d'intron entre les différents membres allant d'un exon pour le gène *Medtr5g068670* à plusieurs exon/intron pour *Medtr4g073730*. De plus il n'y a pas systématiquement de corrélation entre le nombre d'exon/intron et la taille du gène, ainsi le gène *Medtr5g010635* présente un exon avec une taille supérieur à celle du gène *Medtr3g081550* qui lui dispose de deux exons et un intron. L'analyse a révélé la présence de six gènes (en rouge dans la figure 4 ; *Medtr4g073730*, *Medtr5g022310*, *Medtr2g076010*, *Medtr1g025420.1*, *Medtr8g075510*, *Medtr5g022350*) présentant deux allèles.

Partie III. Résultats



Partie III. Résultats

Figure 4. Représentation des structures génomiques de membre de la classe PR5. Les rectangles représentent les exons, les lignes représentent les introns et les flèches représentent le sens de transcription, **en rouge** les gènes présentant plusieurs allèles.

3. La PR de classe 10: la seconde groupe de PR chez *M. truncatula*

La figure 5 présente la structure des gènes codants les PR10s. De manière identique avec les PR5s, il existe une hétérogénéité dans la composition des gènes avec une absence de corrélation de taille et du nombre d'exon/intron. De plus les PR10s présentent des membres (*Medtr8g04560*, *Medtr8g045570*, *Medtr8g045665* et *Medtr8g045640*) dont la longueur dépasse celle des PR5s.

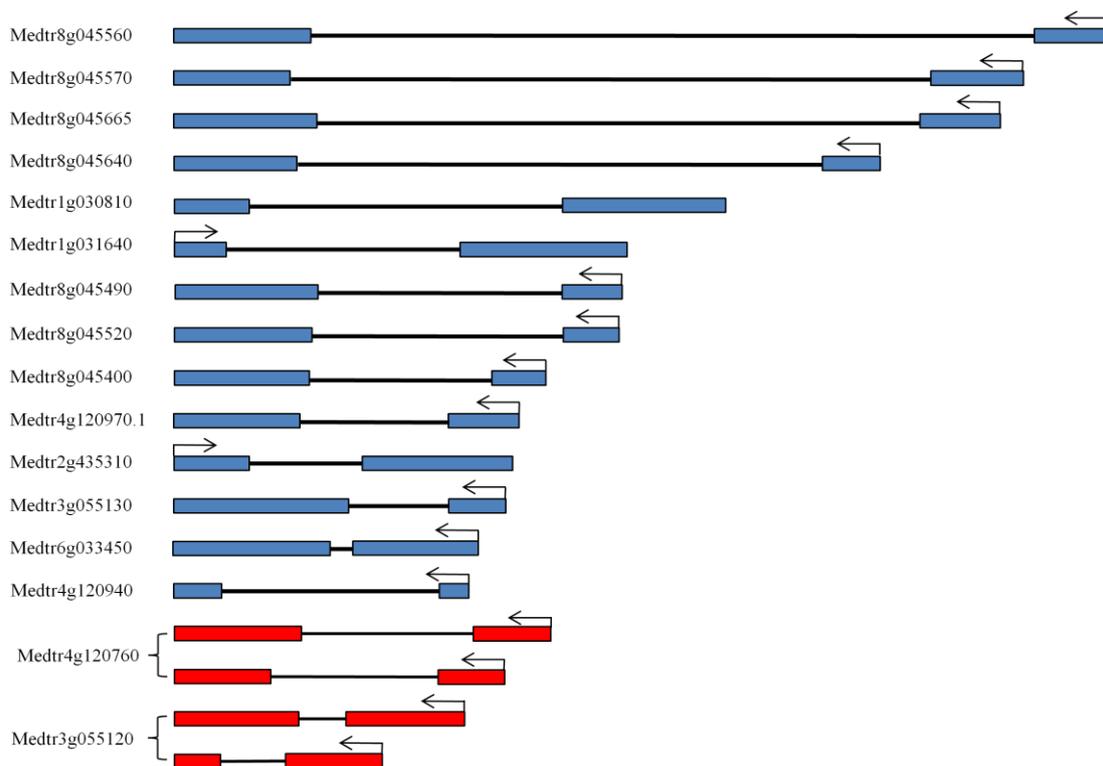


Figure 5. Représentation des structures génomiques de membre de la classe des PR10. Les rectangles représentent les exons, les lignes représentent les introns et les flèches représentent le sens de transcription, **en rouge** les gènes présentant plusieurs allèles.

4. Structure des gènes codants les autres classes de PR

Les autres classes de PRs représentent le nombre le plus faible présent au sein du génome de *M. truncatula*. Comme dans le cas des PR5s et PR10s, une analyse de la structure des gènes a été réalisée. La figure 6 représente les résultats obtenus. On

Partie III. Résultats

observe les mêmes caractéristiques que celle décrites pour les PR5 et PR10. Les gènes *Medtr2g435490.1*, *Medtr2g034480.1*, *Medtr3g118390.1*, *Medtr7g115220.1* et *Medtr5g090250.2* corresponde à des *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR4* et *PR6* respectivement. Le reste des gènes n'appartient à aucune PR décrite et peuvent constituer de nouvelles classes. Enfin Le gène codant la *PR6*et une *PR* de classe inconnue (*Medtr2g076070*) est présent en deux allèles dans le génome de *M. truncatula*.

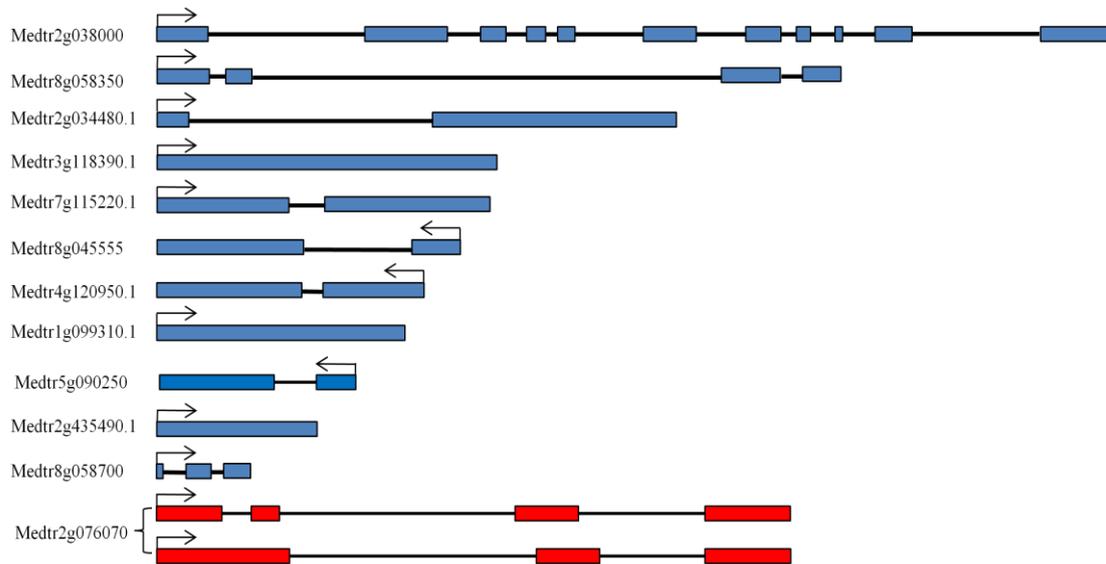


Figure 6. Structure des gènes codant les autres classes de PRs. Les rectangles représentent les exons, les lignes représentent les introns et les flèches représentent le sens de transcription, **en rouge** les gènes présentant plusieurs allèles.

5. Structure protéiques des PRs

Une analyse des protéines a été réalisée afin de confronter les résultats des structures génomiques obtenues en figure 4 à 6 aux structures protéiques correspondantes. Le tableau S1 en annexe présente la taille des protéines, les domaines fonctionnels identifiés avec l'outil PDP (Protein Domain Prediction) ainsi que la fonction biochimique de chaque domaine.

La taille des protéines révèle que la longueur peut aller de 70 Aa (Acides aminés) à 700 Aa, mais la majorité des PRs présentent une taille stable allant de 150 à 300 Aa toute classe confondue. En excluant les cas exagérés, cette observation indique qu'à l'inverse des gènes, une relative conservation de la taille des PRs est observée et cela indépendamment de la classe à laquelle elles appartiennent.

Partie III. Résultats

L'analyse des domaines protéique montre que la classe PR5 présente un domaine **GH64-TLP-SF** qui est une fusion entre le domaine **GH64** glucides hydrolases impliquées dans la dégradation des parois cellulaires fongiques et le domaine **TLP** (Thaumatine et Thaumatinelike) impliqués dans la défense et la dégradation des Béta 1-3 glucanes. Les PR10 présentent un domaine **SRPBCC** qui est une superfamille de domaine de liaison au ligand (START/ RHO_alpha_C/ PITP/ Bet_vl/ CoxG/ CalC) présente au sein d'allergène végétal. La PR1-like (Medtr2g435490.1) possède le domaine **SCP-PR1** qui est extracellulaire et lié à la pathogenèse végétale. Enfin l'analyse révèle que la PR Medtr2g038000.1 de classe inconnue présente un domaine **PHD/PRHA-Li** lié à la réponse aux pathogènes chez *Arabidopsis thaliana*. En plus du domaine **HOX** qui est impliqué dans la régulation transcriptionnelle au cours de processus développementaux.

6. Analyse évolutive des PRs : plusieurs origines possibles pour cette famille

Afin de comparer le parcours évolutif de différentes classes de PRs identifiées, un arbre phylogénétique a été réalisé entre les protéines de *M. truncatula*. La figure 7 présente les résultats obtenus. On distingue plusieurs clusters (groupes) de protéines, les PR5 et PR10 présente de nombreux clusters et peut de protéines dispersées au sein de l'arbre, à l'inverse les autres types de PRs présentent une répartition hétérogène, dans ce dernier cas, cela peut être expliqué par l'hétérogénéité des séquences qui regroupe plusieurs classes de PRs. Selon les résultats obtenus on distingue 5 clusters de protéine pour les PR5s et 2 clusters pour les PR10s. Cela indique que ces classes de protéines dérivent potentiellement de plusieurs ancêtres dont le nombre est égale à celui des clusters.

La confrontation des résultats de la distribution génomique (figure 3) et de l'arbre phylogénétique (figure 7) indique que pour les PR5s, chaque cluster de l'arbre est composé de gènes répartie de manière hétérogène dans le génome, alors que pour la PR10 on retrouve un regroupement préférentiel de gènes au sein des clusters en fonction de la position génomique (exemple figure 7, en haut à gauche, le cluster est composé uniquement de gènes en K8). Ces résultats indiquent que le parcours évolutif de ces protéines est probablement différents. Une hypothèse expliquant ces différences est que les PR5s sont potentiellement localisées dans des régions soumises

Partie III. Résultats

à la recombinaison ou présentant des transposant, ce qui a provoqué leurs dispersion dans le génome.

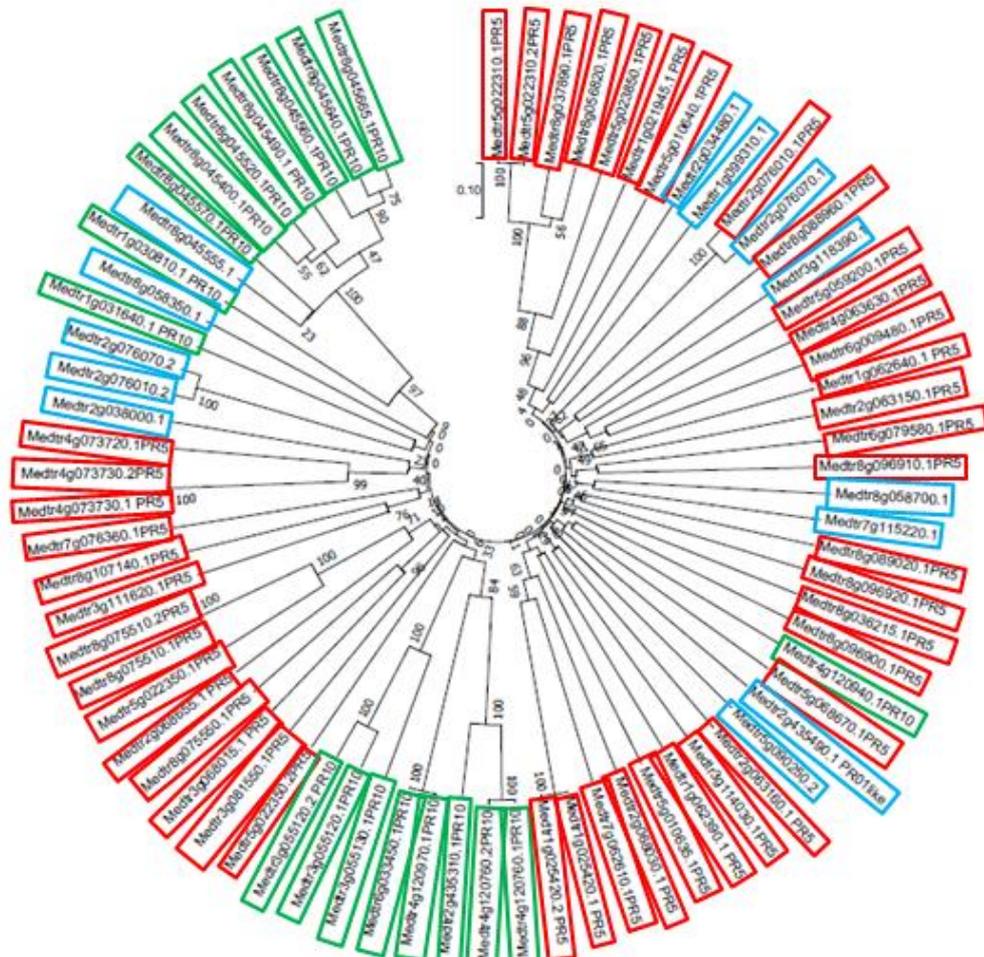


Figure 7. Analyse phylogénétique des PRs de *M. truncatula*. En rouge les PR5s, en vert les PR10s et en bleu les autres types de PRs. L'analyse évolutive a été réalisée grâce au logiciel MEGA7. La méthode de Neighbor-Joining est employée⁶⁴. L'arbre optimale avec la somme des longueurs des branches = 23.80989892 est montré. L'arbre est dessiné à l'échelle, avec des longueurs de branches dans les mêmes unités que celles des distances d'évolutions utilisées pour déduire l'arbre phylogénétique. Les distances d'évolutions ont été calculées à l'aide de la méthode p-distance⁶⁵. L'analyse comportait 74 séquences d'acides aminés. Toutes les positions contenant des lacunes et des données manquantes ont été éliminées. Il y avait un total de 70 postes dans l'ensemble de données final⁶⁶.

Partie III. Résultats

7. Les PRs sont induites au cours de la réponse immunitaire chez *M. truncatula*

Dans le but de comprendre la régulation des PRs au cours des réponses immunitaires, l'expression de ces gènes a été comparée dans des conditions de réponse aux pathogènes (*P. omnivorum*, *R. solanacearum*, *A. eutriches* et *Macrophomina* sp), à un éliciteur de défense (l'extrait de levure) ou à une hormone immunitaire (le méthyle de jasmonate). Les données ont été téléchargées à partir de la base MtGEA qui regroupe des transcriptomes obtenus par la technologie de puce à ADN affymetrix, l'identification des sondes correspondantes aux gènes a été réalisée par recherche d'homologie en utilisant les séquences nucléiques des PRs de *M. truncatula*. Pour chaque gène le meilleur score a été pris en considération, le tableau S2 en annexe présente les correspondances entre les gènes et les sondes isolées. Il est à noter que certains gènes ne possèdent aucune sonde, leur expression n'a donc pas pu être analysée. Les données ont été traitées avec l'outil heatmap qui permet de regrouper les gènes ayant des profils d'expression similaires et de visualiser les résultats sous forme de heatmap.

La figure 8 présente l'expression des gènes au sein de racines de *M. truncatula* en réponse au pathogène *P. omnivorum* en condition contrôle (0 heure post inoculation ; hpi), ou testées à 72 hpi et 96 hpi. On observe trois groupes de PRs induites en fonction du temps d'inoculation, par ailleurs certains gènes présentent une co-induction entre deux ou trois conditions de traitements. Le premier groupe correspond à des PRs induites au sein de racines non-inoculées (0 hpi), cet organe étant soumis à une pression microbiologique importante, une explication plausible est que ces PRs maintiennent un seuil immunitaire basal afin de bloquer les pathogènes infectieux. Les deux autres groupes de PRs induites respectivement à 72 hpi et 96 hpi correspondent à des protéines potentiellement impliquées dans la réponse immunitaire. Au cours de l'analyse aucune répartition préférentielle des classes de PRs (PR5 ou PR10) n'a été observée en fonction du temps d'inoculation, ce qui indique que l'ensemble des classes peuvent intervenir au cours du processus étudié.

Partie III. Résultats

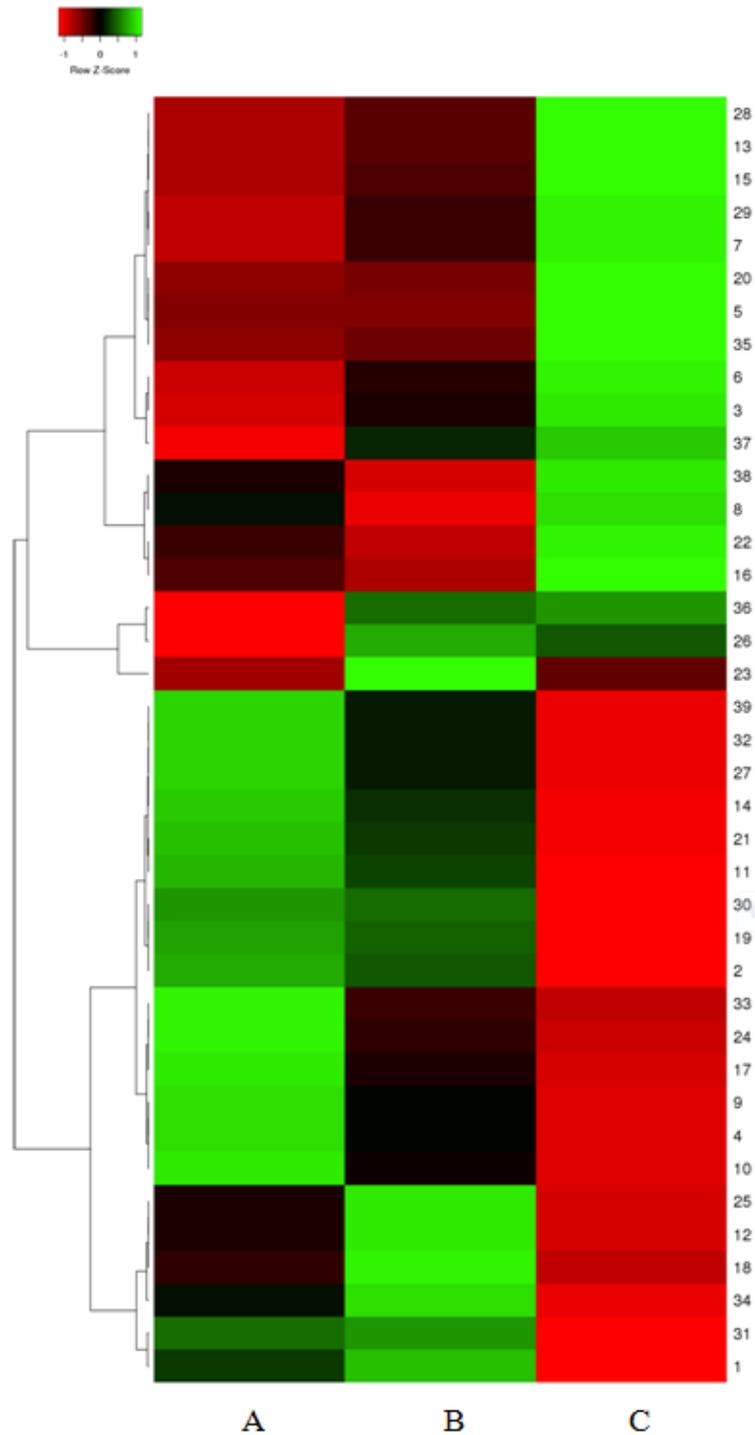


Figure 8. Expression des PRs5, PRs10 et des autres PRs de *M. truncatula* en réponse au pathogène *P. omnivorum* à 0hpi (contrôle, (A)), 72hpi (B) et 96 hpi (C). Les données sont issues du MtGEA et traitées grâce au logiciel heatmapper. En vert les gènes sont induits, en rouge les gènes sont réprimés et en noir les gènes sont peut variables. Chaque numéro en colonne de droite correspond à une sonde, voir tableau S3 pour les correspondances sondes-numéro heatmap.

Partie III. Résultats

8. Des PRs sont spécifiques réponse immunitaires

L'analyse comparative des données d'expressions entre les différentes conditions de réponse immunitaire (figure 8 et figure S1 à S5 en annexe) indique que les PRs exprimées au sein des racines non-traitées sont faiblement variables en nombre et peut différentes avec 79% de PRs communément induites dans au moins deux expérience en condition de racines sans traitements (voir tableau S4 en annexe). Ces résultats permettent de dégager un groupe de PRs potentiellement impliqué dans l'immunité basale racinaire.

L'analyse globale des PRs induites en conditions testées au sein des différents traitements (figure 8 et figure S1 à S5 en annexe) révèle que les profils de PRs stimulés sont relativement proche entre les conditions. La figure 9 présente la comparaison des PRs communément et spécifiquement induites entre : d'une part le méthyle de jasmonate (MeJA) et *P. omnivorum*, le MeJa et *R. solanacearum*, le MeJa et *A. eutriche*, le MeJa et *Macrophomina sp* (Figure 9a) et de l'autre part *P. omnivorum* et *A. eutriche*, *R. solanacearum* et *A. eutriche* (figure 9b). Les résultats indiquent la présence de 19, 20, 11, 26, 12, 9 PRs communément induites de manière respectivement entre les différentes comparaisons. Ces observations indiquent la présence de voies communes de réponse entre ces conditions.

Certaines PRs sont induites entre plusieurs pathogènes (exemple : Msa.2622.1.S1_at, Mtr.12615.1.S1_at, Mtr.34114.1.S1_s_at, Mtr.51369.1.S1_at, Mtr.8763.1.S1_at), alors que d'autres sont spécifiques de certains (exemple : Mtr.17268.1.S1_at spécifique de *Macrophomina sp* et Mtr.15054.1.S1_at spécifique de *R. solanacearum*). L'ensemble des résultats souligne la complexité de la régulation des PRs chez *M. truncatula* au cours de la réponse immunitaire, certains gènes spécifiques ou au contraire d'autres communs entre plusieurs types de réponses immunitaires.

Partie III. Résultats

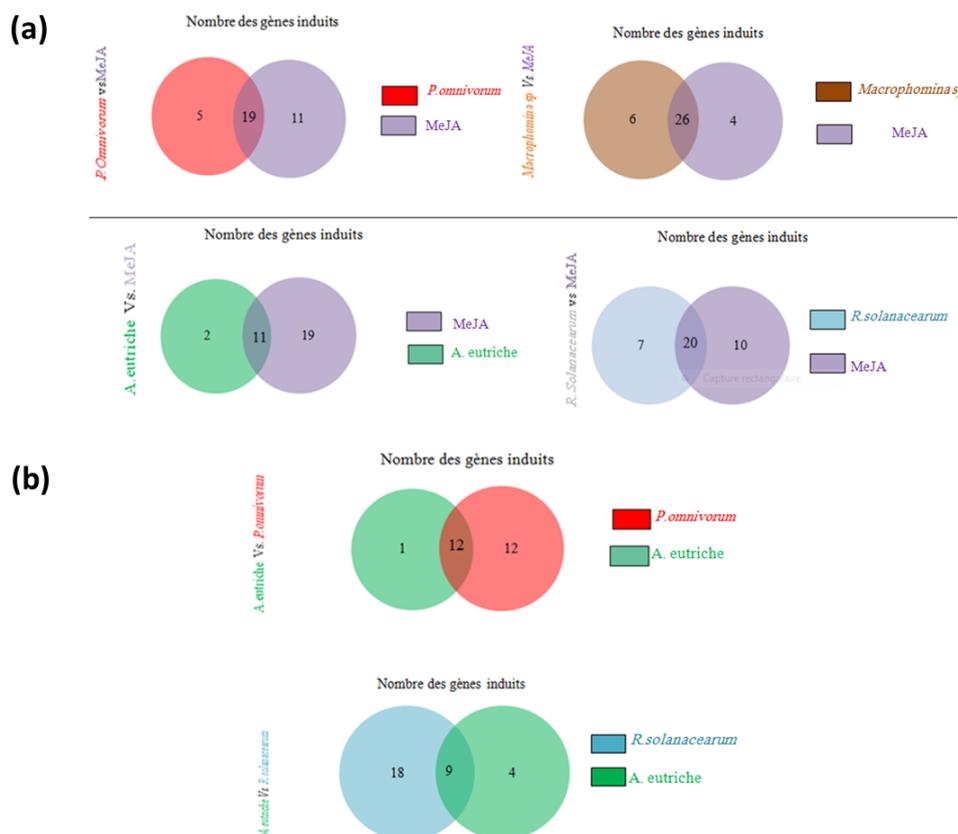


Figure 9. L'analyse des PRs communément ou spécifiquement induites en condition teste par rapport au contrôle pour différents traitements (a) : MeJA vs. *P. omnivorum*, MeJA vs. *R. solanacearum*, MeJA vs. *A. eutriche*, MeJA vs. *Macrophomina sp.* (b) : *P. omnivorum* vs. *A. eutriche*, et *R. solanacearum* vs. *A. eutriche*. Les chiffres au milieu indiquent le nombre des PRs communément induites entre les différentes conditions, et les chiffres aux extrémités indiquent le nombre des PRs induites spécifiquement.

9. Plusieurs PRs sont induites au cours de la sénescence

Les travaux réalisés par Guadguad et Saad en 2017 à révéler la présence de PRs potentiellement induites au cours de la sénescence des nodosités en réponse au nitrate (NO_3)⁵⁵ remettant en question la théorie historique de séparation de l'immunité et de la sénescence au sein des nodosités⁵⁷. Notre travail de recherche c'est donc inséré dans la continuité des résultats précédemment obtenus.

Partie III. Résultats

Afin de valider les observations réalisées et d'identifier les PRs induites au cours de la sénescence, leur expression a été analysée dans deux conditions de stimulation de ce processus, l'une par traitement au nitrate (figure 10) et la seconde par traitement à la phosphoénolpyruvate kinase (figure S6), un herbicide induisant une sénescence précoce des nodosités. Les résultats de la figure 10 indiquent la présence d'un groupe de 11 PRs (PR10, PR5) qui sont induites : Mtr.8763.1.S1_at, Msa.2622.1.S1_at, Mtr.51369.1.S1_at, Mtr.10968.1.S1_at, Mtr.12615.1.S1_at, Mtr.6757.1.S1_at, Mtr.32260.1.S1_at, Mtr.15053.1.S1_at, Mtr.42989.1.S1_at, Mtr.34114.1.S1_s_at et Mtr.42529.1.S1_at. Par ailleurs dans le cas d'un traitement à la phosphoénolpyruvate kinase, on remarque l'induction de plusieurs PRs (Figure S6). En comparons les résultats obtenus entre la sénescence induites par les nitrates et celle par les phosphoénolpyruvate kinase, on remarque que la quasi-totalité des PRs induites en réponse au NO_3 sont également stimulées en condition de traitement à l'herbicide (toutes sauf Mtr.42529.1.S1_at). On isole 9 PRs communément induites entre les deux types de sénescence. Ces résultats confirme les observations précédemment réalisées et montre que les PRs peuvent être induites au cours de la sénescence. De plus le groupe des 9 gènes communs correspond à des protéines probablement impliquées dans la sénescence des nodosités.

Partie III. Résultats

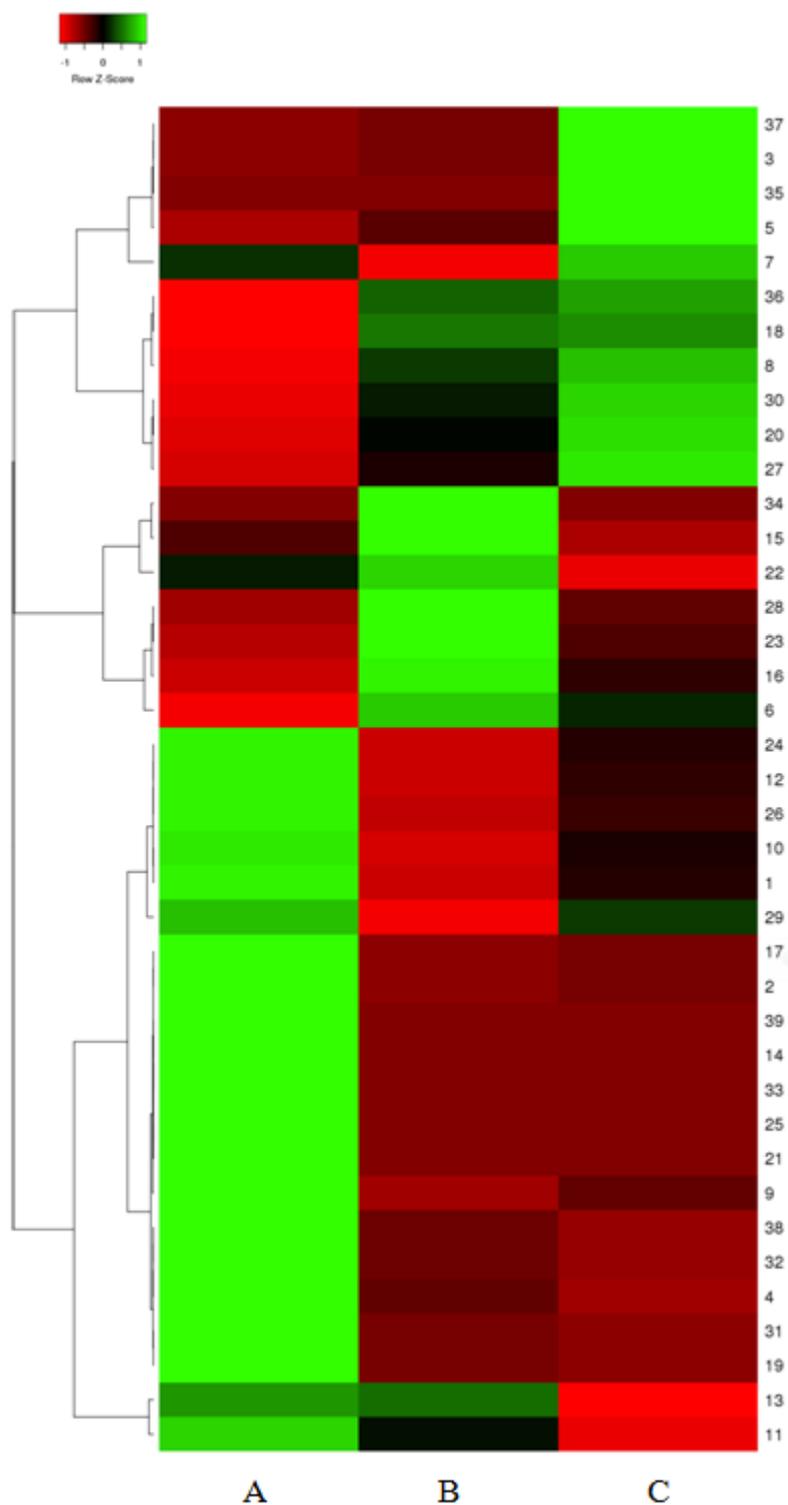


Figure 10. Expression des PRs5, PRs10 et des autres PRs de *M. truncatula* au sein de racines, 0hpi (A), de nodosités âgées de 14 jours post inoculation (B) et de nodosités traitées au nitrate (C). Les données sont issues du MtGEA et traité grace au logiciel heatmaper. En vert les gènes sont induits, en rouge les gènes sont réprimés, en noir les gènes sont peut variables. Chaque numéro en colonne de droite correspond à une sonde, voir tableau S3 pour les correspondances sondes-numéro heatmap.

Partie III. Résultats

10. Une connexion entre l'immunité et la sénescence ?

Dans le but de vérifier si les PRs induites au cours de la sénescence pouvaient être stimulées au cours de la réponse immunitaire, nous avons comparé l'expression du groupe des 9PRs induites au cours de la sénescence (nitrate et phosphoenotricine) et dans des conditions de réponse immunitaire. La figure 11 présente les niveaux d'expression des gènes en condition de sénescence induite par les nitrates et la phosphoenotricine (Figure 11, A & B respectivement) et de *M. truncatula* en réponse à *R. solanacearum* et *P. omnivorum* (Figure 11, C & D respectivement). Les résultats montrent que plusieurs des PRs induites en condition de sénescence sont également exprimées au cours de la réponse à l'un ou les deux pathogènes. Ces résultats montrent la présence de voies communes stimulants les PRs au cours de la réponse immunitaire ainsi qu'au cours de la sénescence des nodosités.

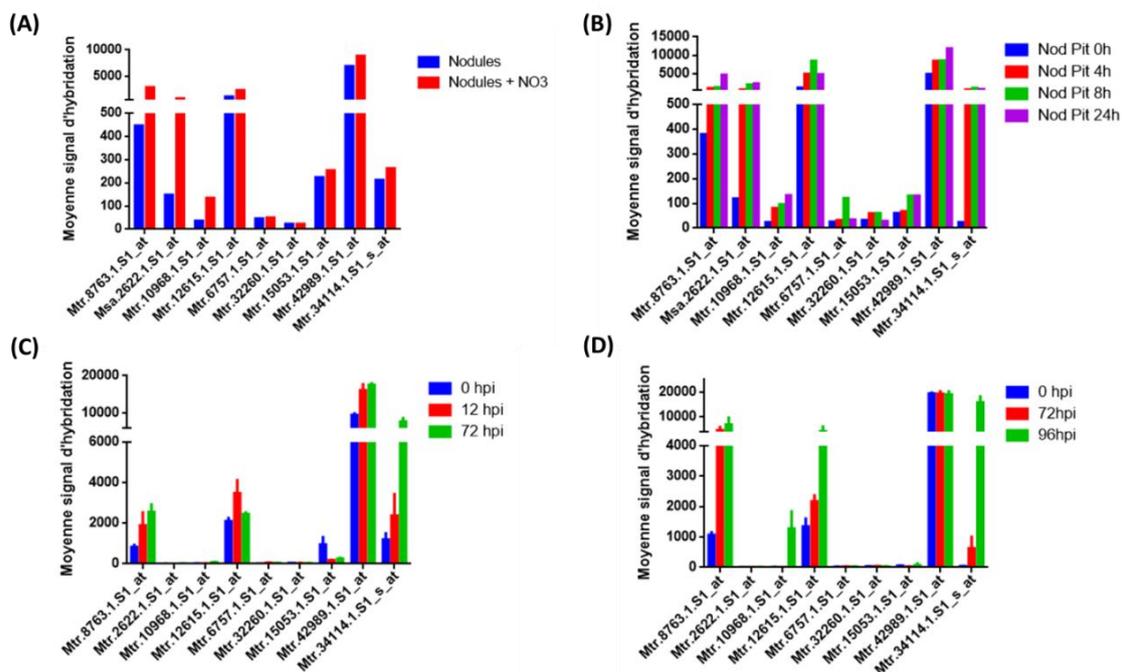


Figure 11. Expression relative des gènes PRs au cours de la sénescence et de la réponse immunitaire. Les graphes représentent la moyenne du signal d'hybridation correspondant au niveau d'expression relative pour (A) : des nodosités traités ou non au nitrate.(B) : Des nodosités non-traités ou 4 heures, 8 heures et 24 heures post traitement à la phosphoenotricine. (C) : des racines non-traitées (0 hpi) ou après 12 et 72 heures post inoculation avec le pathogènes *R. solanacearum*. (D) Des racines non-traitées (0 hpi) ou après 72et 96 heures post inoculation avec le pathogènes *P.*

Partie III. Résultats

omnivorum. Pour les graphes (C) et (D) l'erreur standard est représentée. Les données sont issues de la base de données MtGEA.

11. Les PRs impliquées dans la symbiose

Au cours de nos analyses nous avons observé de manière surprenante la présence d'un groupe de PRs induites au sein de nodosités fixatrices d'azotes (figure 10). Afin d'aller plus loin nous avons réalisé une étude plus poussée en observant l'expression des PRs à différents temps d'inoculation de *M. truncatula* avec la souche *Sinorhizobium* sp. La figure 12 présente les résultats obtenus. On observe plusieurs PRs qui sont stimulées au cours du processus symbiotique dès 4 jours post inoculation (dpi). Ces résultats sont met pour la première fois en évidence le rôle potentiel de ces protéines au cours de la symbiose entre les deux partenaires symbiotiques.

Partie III. Résultats

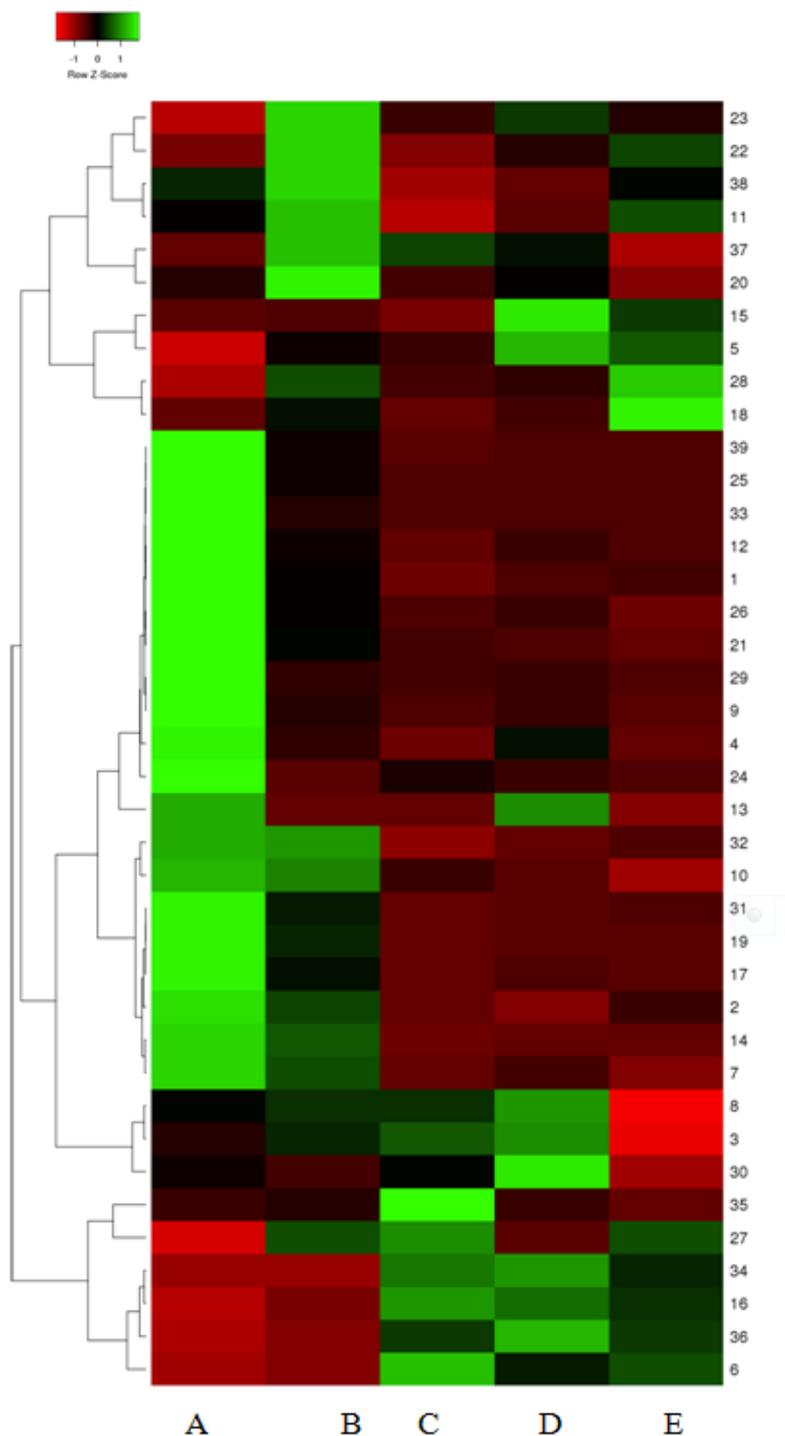


Figure 12. Expression des PRs 5, PRs10 et d'autres PRs de *M. truncatula* sans inoculation avec *Sinorhizobium* sp (0 dpi (A)), à 4, 10, 14 et 28 jours post inoculation (dpi) (B, C, D et E respectivement). Les données sont issues du MtGEA et traité grâce au logiciel heatmaper. En vert les gènes sont induits, en rouge les gènes sont réprimés, en noir les gènes sont peut variables. Chaque numéro en colonne de droite correspond à une sonde, voir tableau S3 pour les correspondances sondes-numéro heatmap.

Discussion

Partie IV

Discussion

Discussion

Au cours de notre travail nous nous sommes focalisé sur l'étude de la famille de gènes PRs chez la plante *M. truncatula*. Afin d'apporter une vue d'ensemble et complète sur cette famille plusieurs aspects ont été abordés : génomique, protéomique, phylogénétique et transcriptomique. De plus, le rôle des PRs au cours des interactions *M. truncatula*-microorganismes a été analysés afin de comprendre la régulation de ces gènes clés de l'immunité au cours de la pathogénèse et de la symbiose.

1. *M. truncatula* présente 8 classes de PRs

66 PRs ont été identifiées au sein du génome de *M. truncatula*, l'étude à montrer qu'elles appartiennent aux classes des PR1, PR2, PR3, PR4, PR5, PR6, PR8, PR10 ou à des PRs non-affiliées aux groupes décrit dans la littérature. Les PR 5 et 10 sont les classes qui présentent le plus grand nombre de gènes, ce qui souligne l'importance de ces protéines chez cette plante. Plusieurs études ont montrées que les PR5/PR10 été importantes au cours de la réponse des plantes au pathogène¹⁸. Dans le cas de la PR5 un effet antimicrobien est détecté⁵⁸, alors la PR10 semble jouer un rôle dans la signalisation cellulaire immunitaire. Les PR1, PR2 ; PR3, PR4, PR6 et PR8 n'ont été identifiées qu'en simple copie, néanmoins les analyses d'expression de ces familles reste à réaliser afin de déterminer leur rôle au cours de la réponse aux microorganismes.

2. Des gènes dispersés dans le génome avec plusieurs ancêtres

L'analyse phylogénétique des PRs a révélé un groupement des protéines en plusieurs clusters pour les classes de PR5 et PR10. A l'inverse les autres classes de PRs sont majoritairement dispersées au sein de l'arbre. La présence de plusieurs clusters indique qu'il n'existe pas un ancêtre commun entre l'ensemble des PR5s et des PR10, mais plutôt plusieurs ancêtres qui se sont dupliqués et qui ont évolués donnant ainsi les protéines identifiées. Ces résultats sont à mettre en corrélation avec la répartition des gènes au sein du génome de *M. truncatula*, les PRs indépendamment de leur classe sont distribuées sur l'ensemble des chromosomes avec une préférence pour le chromosome 8 dans le cas des PR5 et 10. Nous émettant l'hypothèse que les PR5 et PR10 résulte de plusieurs ancêtres localisés sur un ou plusieurs chromosomes qui ont donnés au cours de l'évolution l'ensemble des PR5 et PR10 identifiés. De plus les

Discussion

PR5 semble être associée à des régions génomiques soumises au phénomène de transposition ou à la recombinaison, car pour cette classe une absence de corrélation entre les clusters de l'arbre phylogénétique et la localisation génomique des gènes a été observée, à l'inverse des PR10 dont les clusters regroupe majoritairement des gènes présent au sein d'un même chromosome.

3. Plusieurs fonctions biochimiques associées aux classes identifiées

Afin de déterminer la fonction biochimique de chaque PRs nous avons cherché la présence de domaines fonctionnels au sein des protéines. Sur les 66 gènes, 38 sont des PRs de classe 5 caractérisées par le domaine GH64-TLP-SF regroupant les glucides hydrolases, les Thaumatine et les ThaumatineLike. Ces domaines jouent un rôle clé dans la défense de l'hôte contre les agents pathogènes⁵⁹. 16 gènes codes des PRs de classe 10 et présentent le domaine SRPBCC⁶⁰. Un gène correspondant à la PR1 a été isolé, il possède le domaine SCP-PR1 Like utilisé comme marqueur de résistance, ce dernier s'accumule après infection et agit comme agent antifongiques. Les trois classes de PR2, 3 et 4 présentes des domaines à activité chitinases ayant des propriétés antimicrobiennes⁵⁸. Enfin une protéine non-classée a été identifiée comme possédant deux domaines : HOX et PHD-PRHA-Li impliqués dans la régulation transcriptionnelle des processus développementaux et dans la résistance aux pathogènes respectivement. Ces résultats sont en corrélation avec les données bibliographiques et montre une spécialisation biochimique des différentes classes, mais ayant dans la majorité des cas des activités antimicrobiennes²¹.

4. Les PRs sont recrutées au cours de la réponse aux pathogènes

L'analyse de l'expression des PRs au cours de la réponse aux pathogènes et dans le cas de l'activation de l'immunité par traitement éliciteur ou hormonale montre une induction massive des PRs dans la majorité des cas étudiés. Ceci souligne le rôle clé de ces protéines au cours de l'interaction entre *M. truncatula* et les pathogènes. Ce phénomène est observé chez plusieurs autres plantes telle qu'*A. thaliana* qui recrute plusieurs PRs, telle que la PR1 afin de prévenir l'infection à *Pseudomonas syringae*⁶¹.

Discussion

5. La sénescence fait intervenir des PRs

Au cours de leurs travaux de recherche Guadguad et Saad⁵⁵ avait indiquées une potentielle stimulation des PRs au cours de la sénescence, afin de valider cette observation nous avons analysés l'expression des PRs dans le cas de deux types de sénescence, la première induite par l'ajout d'une source organique d'azote, les nitrates et la seconde par traitement à l'herbicide phosphoénoltricine. De cette étude nous avons dégagé 9 PRs induites au cours de la sénescence stimulée par les deux agents susmentionnés. L'amplitude des variations d'expression entre les différentes PRs est très hétérogènes, mais une accumulation d'au moins un facteur deux est observée entre la condition contrôle et la condition test indiquant une accumulation des transcrits. Les variations d'amplitudes peuvent être expliquées par **i)** la durée de vie des transcrits/protéines qui change d'un gène à un autre, ainsi un transcrit/protéine ayant une durée de vie long ne requiert pas une expression intense, **ii)** l'importance du gène dans les phénomènes biologiques, un gène ayant un rôle important sera de manière générale plus exprimé qu'un gène ayant une fonction ponctuel.

Le rôle des PRs induites au cours de la sénescence pourraient être de supprimer le bacteroid afin de faciliter sa dégradation au sein des cellules hôtes. Ce phénomène est observé chez les mutants NDIR (Nodule Deficient in Immunity Repression) identifiés chez *M. truncatula* dont les bacteroids meurent précocement et l'induction d'un membre de la classe des PR10 est observée²⁹.

6. La symbiose recrute des PRs

De manière surprenante au cours de notre recherche nous avons pu observer l'induction de plusieurs PR au cours du processus symbiotique. Ceci constitue la première description de ce genre. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces observations, l'une d'entre elles serait l'utilisation par *M. truncatula* des PRs afin de contrôler les phénomènes d'infection au cours de la symbiose et cela dans le but d'éviter une surinfection des tissus par les rhizoïdes ou de bloquer des bactéries non symbiotiques essayant d'infecter les racines au cours de la symbiose. Plusieurs études

Discussion

ont montrés que les légumineuses peuvent sélectionner les symbiotes et éviter la pénétration de bactérie non symbiotique par des mécanismes actuellement inconnus⁶².

7. La connexion SIS (symbiose-immunité-sénescence)

Plusieurs PRs identifiés comme induites au cours de la symbiose et de la sénescence sont également stimulées au cours de la réponse aux pathogènes. C'est résultats montrent que l'immunité est connectée à la sénescence, mais aussi à la symbiose via au moins les PRs. Les relations établies entre l'immunité et la symbiose ont souvent été considérés comme antagoniste avec la nécessité de supprimer l'immunité afin de permettre la symbiose, mais nos observations sous-entendent qu'il y a aussi la nécessité d'activer certain gènes immunitaire pour permettre la mise en place de ce phénomène.

Nous proposons un nouveau modèle permettant d'expliquer les observations réalisées, la **Figure 13** présente la connexion que nous avons nommée SIS (Symbiose Immunité Senescence). Il y'a ainsi au cours de l'interaction *Medicago-Sinorhizobium* la nécessité de connecter les trois processus afin que l'association soit complète. Au cours de la symbiose l'immunité est utilisée afin de contrôler l'infection des nodosités et d'éviter ainsi une surinfection, au cours de la sénescence l'immunité est requise pour faciliter la destruction des bacteroids qui sont par la suite recyclés, l'interconnexion symbiose-sénescence permet l'optimisation de la fixation d'azote par la suppression des bacteroids inefficaces. Une réponse immunitaire précoces tel qu'observé chez les mutants NDIR conduit à la destruction des bacteroids avant leurs maturations, l'accomplissement de la symbiose permet la formation de bacteroids différenciés et vivant, enfin lors de la sénescence les bactéroïdes défectu eux tel que dans le cas des mutants de *Sinorhizobium* non-fixateurs d'azote ou lorsque la sénescence est stimulée, une destruction des bacteroids différenciés à lieu (Figure 13).

Discussion

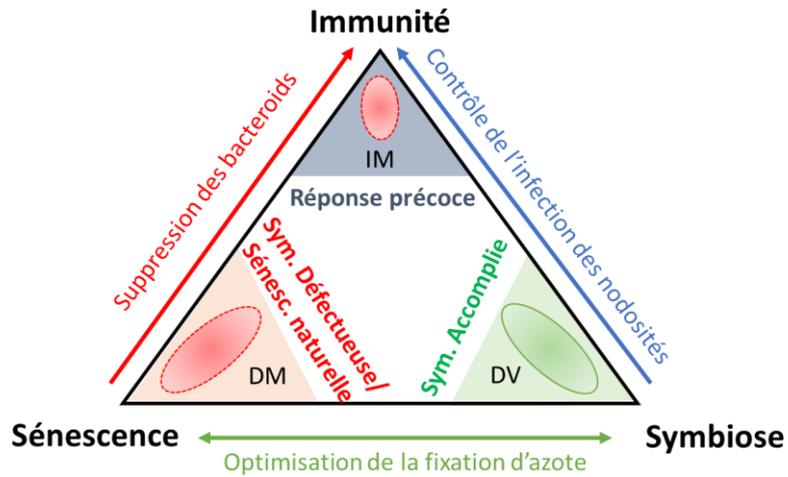


Figure 13. Triangle SIS (connexion Symbiose-Immunité-Senescence). Les trois phénomènes sont interconnectés au cours de l'interaction entre *M. truncatula* – *Sinorhizobium* sp. IM : bacteroid Indifférencier Mort, DV : bacteroid Différencier Vivant, DM : bacteroid Différencier Mort

Conclusion

Au cours de nos recherches nous avons caractérisé la famille des gènes PRs chez *M. truncatula*. Nos résultats montrent que cette famille est largement présente au sein du génome de la plante et qu'elle joue un rôle important dans la réponse immunitaire de cette dernière. L'analyse d'expression des PRs a révélé la complexité des régulations qui ont lieu et reste encore à expliquer. Plusieurs PRs sont impliquées au cours du processus symbiotique entre *Medicago Truncatula* et son partenaire *Sinorhizobium*, cela à différentes étapes de l'interaction. Nos travaux montrent de manière claire qu'il existe bien une relation triangulaire entre la symbiose, l'immunité et la sénescence au cours de l'interaction symbiotique. Néanmoins le rôle précis des PRs reste encore à être déterminé.

Références bibliographiques

1. Klarzynski O, Fritig B. “Stimulation des défenses naturelles des plantes, ”;324:953-963, 2001.
2. Vera G, Silke R. “ Breaking the Barriers: Microbial Effector Molecules Subvert Plant Immunity, ”, doi:10.1146/annurev.phyto.46.120407.110050, 2008.
3. Li L, Yu Y, Zhou Z, Zhou J., “ Plant pattern-recognition receptors controlling innate immunity, ” *SCIENCE CHINA Life Sciences.*, vol. 59(9), pp.878-888. doi:10.1007/s11427-016-0115-2, 2016.
4. Robatzek S, Chinchilla D, Boller T., “ Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis, ” *Genes Dev.*, vol. 20, pp. 537–542, 2006.
5. Choi HW, Klessig DF., “ DAMPs , MAMPs , and NAMPs in plant innate immunity, ”*BMC Plant Biol.*,pp. 1-10. doi:10.1186/s12870-016-0921-2. 2016
6. Schwessinger B, Ronald PC., “ Plant Innate Immunity: Perception of Conserved Microbial Signatures, ” doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105518, 2012.
7. Abramovitch RB, Anderson JC, Martin GB., “Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity, ” *Nat Rev Mol Cell Biol.*, vol. 7(8), pp. 601-611, doi:10.1038/nrm1984, 2006.
8. Bigeard J, Colcombet J, Hirt H., “ Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity(PTI),” *MolPlant.*, vol. 8(4), pp. 521-539doi:10.1016/j.molp.2014.12.022, 2015.
9. Van Der Biezen E a., Jones JDG., “Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept, ” *Trends Biochem Sci.*, vol. 23(12), pp. 454-456, doi:10.1016/S0968-0004(98)01311-5, 1998.
10. Berrabah F., “Contrôle symbiotique de l’immunité au cours des étapes tardives de la symbiose Medicago-Sinorhizobium, ” Univ. *Paris-SACLAY*, pp. 6-10, 2016.
11. Jones JDG, Dangl JL. “The plant immune system, ” *Nature*, vol. 444, pp. 323-329. doi:10.1038/nature05286, 2006.
12. Pieterse MJ, Does D Van Der, Zamioudis C, Leon-reyes A, Wees SCM Van.

Références bibliographiques

- “Hormonal Modulation of Plant Immunity,” pp. 1-33, doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154055, 2012.
13. Tsuda K, Glazebrook J, Katagiri F. “The interplay between MAMP and SA signaling, *Plant Signaling & Behavior*,” pp. 359-361, 2008.
 14. Review I., “ Jasmonates an update on biosynthesis signal Transduction and Action in plant stress response growth and development, ” *Annals of Botany*., pp. 681-697, doi:10.1093/aob/mcm079, 2007.
 15. García MJ, Romera FJ, Lucena C, Alcántara E, Pérez-vicente R., “ Ethylene and the Regulation of Physiological and Morphological Responses to Nutrient Deficiencies, ” *American Society of Plant Biologists*:51-60. doi:10.1104/pp.15.00708, 2015.
 16. Guinel F.C., “Ethylene, a Hormone at the Center-Stage of Nodulation, ” *Front. Plant Sci*, 2015.
 17. Zhou B, Jia P, Gao F, Guo H., “Molecular Characterization and Functional Analysis of a Necrosis- and Ethylene-Inducing , Protein-Encoding Gene Family from *Verticillium dahliae*, ” vol. 25, nod. 7, pp. 964-975, 2012.
 18. Loon LC Van, Rep M, Pieterse CMJ. “ Significance of inducible defense-related proteins in infected plants, ” *Annu Rev Phytopathol.*, vol. 44, pp. 135-62, 2006.
 19. Sels J, Mathys J, Coninck BMA De, Cammue BPA, Bolle MFC De. “Plant Physiology and Biochemistry Plant pathogenesis-related (PR) proteins : A focus on PR peptides, ” *Plant Physiology and Biochemistry*., vol. 46, pp. 941-950, 2008.
 20. Marie B, Brocard L, Pislariu CI. , “*Medicago truncatula* DNF2 is a PI-PLC-XD-containing protein required for bacteroid persistence and prevention of nodule early senescence and defense-like reactions, ” *New phytologiste.*, vol. 197, pp. 1250-1261, 2013.
 21. Julier B, Langin T, Lefebvre V., “Etude de la résistance de la légumineuse modèle, ” 2009.
 22. Andreu AB, Guevara G, Wolski EA, Daleo GR, Caldiz DO. “Enhancement of natural disease resistance in potatoes by chemicals, ” *Pest Management Science*; vol. 62(2) , pp.162-170. 2006.

Références bibliographiques

23. Loon LC Van., “Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins, ” *European Journal of Plant Pathology* ., vol.103(9), pp. 753-754, 1997
24. Mounira Elbez, Claire Kevers, Saïd Hamdi, Marc Rideau and Geneviève Petit-Paly., “Les protéines de pathogenèse PR-10 des végétaux,” *Botany Letters*, vol. 149(4), 2002.
25. Yeats TH, Rose JKC., “The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs), ” *ProteinScience.*, vol.17(2) , pp. 191-198, doi:10.1110/ps.073300108.Protein. 2008;
26. Edreva A. “Pathogenesis-related proteins : research progress in the last 15 years. *Gen. Appl. Plant Physiology*, ”vol. 31(1-2), pp. 105-124, 2005.
27. Shin Cpæjaæy, Paek Kkæblæk. “Molecular characterization of pepper germin-like protein as the novel PR-16 family of pathogenesis-related proteins isolated during the resistance response to viral and bacterial infection, ”*Planta.*, Vol. 219(5), pp. 797–806, doi:10.1007, 2004.
28. Okushima Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H., “Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells : identification of a new member of pathogenesis-related proteins, ” *Plant Molecular Biology.*, vol. 42(3), pp. 479-488, 2000.
29. Berrabah F, Hosseyn E, Salem A, Garmier M, Ratet P., “The Multiple Faces of the *Medicago-Sinorhizobium*Symbiosis, ”*Functional Genomics in Medicago truncatula.*, pp 241-260, 2018.
30. Benedito VA, Torres-jerez I, Murray JD., “A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*, ” *The Plant Journal.*,vol. 55(3), pp. 504-513, 2008.
31. Heaton T., “ Isotopic studies of nitrogen pollution in the hydrosphere and atmosphere, ” *Chim Geol Isot Geoscience Sect.*, vol. 59,pp. 87-102, 1986.
32. Bio R., “Les principaux types de fertilisants Les fertilisants destinés à enrichir le sol en humus, ” <http://www.revuebio.fr/types-fertilisants>, 2018.
33. Jones KM, Sharopova N, Lohar DP, Zhang JQ, Vandenbosch KA, Walker GC., “ Differential response of the plant *Medicago truncatula* to its symbiont *Sinorhizobium meliloti* or an exopolysaccharide-deficient mutant, ” *PNAS.*,

Références bibliographiques

- vol. 105(2), pp. 704-709, 2008.
34. Gilles EDO, Jeremy D M, Philip S P, J Allan D., “ The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis, ” *Annu Rev Genet.*, vol. 45, pp. 119-144, 2011.
 35. Rival P, Billy F De, Bono J, Gough C, Rosenberg C., “ Epidermal and cortical roles of NFP and DMI3 in coordinating early steps of nodulation in *Medicago truncatula*, ” doi: 10.1242, 2012.
 36. Ting X, Schilderink S, Moling S, Eva E. Deinum, Kondorosi E, Franssen H, Kulikova O, Niebel A, Bisseling A., “Fate map of *Medicago truncatula* root nodules, ” *Development.*, vol. 141(18), pp. 3517-3528. doi:10.1242, 2014.
 37. Kereszt A, Mergaert P, Maróti G, Kondorosi É., “Innate immunity effectors and virulence factors in symbiosis, ” *Curr Opin Microbiol.*, vol. 14(1), pp. 76-81. doi:10.1016, 2011.
 38. Van de Velde W, Guerra JCP, De Keyser A., “ Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*, ” *Plant Physiol.*, vol. 141(2), pp. 711-720, doi:10.1104, 2006.
 39. Antonius C, Timmers J, Soupène E, Christine M, BillyF , Vasse J, Boistard P, and Truchet G., “Saprophytic Intracellular Rhizobia in Alfalfa Nodules, ” *Mol Plant-Microbe Interact.*, vol. 13(11), pp. 1204-1213, doi:10.1094/MPMI, 2000.
 40. Baier R, Schiene K, Kohring B, Flaschel E, Niehaus K., “Alfalfa and tobacco cells react differently to chitin oligosaccharides and *Sinorhizobium meliloti* nodulation factors, ” *Planta.*, Vol. 210(1), pp. 157–164, 1999.
 41. Maunoury N, Redondo-nieto M, Bourcy M, et al., “ Differentiation of Symbiotic Cells and Endosymbionts in *Medicago truncatula* Nodulation Are Coupled to Two ,” *Journal pone PLOS.*, vol. 5(3), doi:10.1371/ 0009519, 2010.
 42. Gourion B, Berrabah F, Ratet P, Stacey G., “ Rhizobium – legume symbioses : the crucial role of plant immunity, ” *Trends Plant Sci.*, vol. 20(3), pp; 186-194, doi:10.1016/j.tplants, 2015.
 43. Aslam SN, Newman M, Erbs G., “Report Bacterial Polysaccharides Suppress Induced Innate Immunity by Calcium Chelation, ” *Current Biologie.*, vol.

Références bibliographiques

- 18(14), , pp. 1078-1083. doi:10.1016/j.cub, 2008.
44. Lopez-Gomez M, Sandal N, Stougaard J, Boller T., “Interplay of flg22-induced defence responses and nodulation in *Lotus japonicus*, ” *J Exp Bot.*, vol. 63(1), pp. 393-401, doi:10.1093/jxb/err291, 2012.
45. Berrabah F, Ratet P, Benjamin Gourion., “Legume Nodules: massive infection in the absence of defense induction, ” *APS Journals.*, <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-18-0205-FI>.
46. Deakin WJ, Broughton WJ., “Symbiotic use of pathogenic strategies : rhizobial protein secretion systems, ” *Nature Reviews Microbiology.*, vol. 7, pp. 312–320, 2009.
47. Wang C, Yu H, Luo L., “ nodules with activated defense 1 is required for maintenance of rhizobial endosymbiosis in *Medicago truncatula*, ” *New phytologist.*, vol. 212(1), 2016.
48. Berrabah F, Bourcy M, Eschstruth A., “ A nonRD receptor-like kinase prevents nodule early senescence and defense-like reactions during symbiosis, ” *New Phytol.*, vol. 203(4), pp. 1305-1314. doi:10.1111, 2014.
49. Sinharoy S, Torres-Jerez I, Bandyopadhyay K., “The C2H2 transcription factor regulator of symbiosome differentiation represses transcription of the secretory pathway gene VAMP721a and promotes symbiosome development in *Medicago truncatula*, ” *Plant Cell.*, vol. 25(9), pp. 3584-3601 doi:10.1105/tpc, 2013.
50. Berrabah F, Ratet P, Gourion B., “Multiple steps control immunity during the intracellular accommodation of rhizobia, ” *J Exp Bot.*, vol. 66(7), pp. 1977-1985. doi:10.1093/jxb/eru545, 2015.
51. Berrabah F, Bourcy M, Cayrel A., “ Growth conditions determine the DNF2 requirement for symbiosis, ” *PLoS One.*, vol. 9(3), doi:10.1371/journal.pone.0091866, 2014.
52. Pérez Guerra JC, Coussens G, De Keyser A., “ Comparison of developmental and stress-induced nodule senescence in *Medicago truncatula*., ” *Plant Physiol.*, vol. 152(3), pp. 1574-1584. doi:10.1104, 2010.
53. Pierre O, Hopkins J, Combiér M., “Involvement of papain and legumain

Références bibliographiques

- proteinase in the senescence process of *Medicago truncatula* nodules, ” *New Phytol.*, vol. 202(3), pp. 849-863, doi:10.1111/nph.12717. 2014.
54. Cam Y, Pierre O, Boncompagni E, Hérouart D, Meilhoc E, Bruand C., “Nitric oxide (NO): A key player in the senescence of *Medicago truncatula* root nodules, ” *New Phytol.*, vol. 196(2), pp.548-560, doi:10.1111/j.1469-8137.2012.04282.x, 2012.
55. Guadquad F, Saad F., “ La Comparaison Entre La Sénescence et l’immunité Des Nodosité Chez *Medicago Truncatula*, ” Mém., inst. bio., Univ. Djelfa, 2017.
56. Domonkos A., “NAD1 Controls Defense-Like Responses in *Medicago truncatula* symbiotic Nitrogen Fixing Nodules Following Rhizobial Colonization in a BacA-independent Manner, ” *Genes* , vol. 8(12), 2017.
57. Benjamin G, Fathi B, Pascal R, Stacey G, “Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar, ” *BMC Plant Biol.*, vol. 10, pp. 11-33, 2011.
58. Salma El Mnouchi., “Le rôle des microARNs dans la mise en place de la maladie chez les plantes, ” thèse doct. , Univ. Sherbrooke, Canada, 176 p, 2015.
59. Wang X, Tang C, Deng L., “Characterization of a pathogenesis-related thaumatin-like protein gene TaPR5 from wheat induced by stripe rust” *Physiol Plant.* , vol. 139, no. 1, pp. 27-38, 2010.
60. Radauer C, Lackner P, Breiteneder H. “The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands, ” *BMC Evol Biol.* , vol. 10, 2008.
61. Groen SC, Humphrey PT, Chevasco D, Ausubel FM, Pierce NE, Whiteman NK., “*Pseudomonas syringae* enhances herbivory by suppressing the reactive oxygen burst in *Arabidopsis*, ” *J Insect Physiol.*, vol. 84, pp. 90-102. doi:10.1016/j.jinsphys, 2016
62. Yang S, Wang Q, Fedorova E., “Microsymbiont discrimination mediated by a host-secreted peptide in *Medicago truncatula*, ” *PNAS.*, vol. 114 (26), pp. 6848-6853, 2017.

Références bibliographiques

63. Cazaux M., “Etude de la résistance de la légumineuse modèle *Medicago truncatula* à *Colletotrichum trifolii*, agent de l’anthraxnose, ” Univ. Toulouse III – Paul Sabatier, pp. 16-17, et 36. 2009
64. Saitou N., Nei M., “The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees, ” *Molecular Biology and Evolution.*, vol. 4 , pp. 406-425, 1987.
65. Nei M., Kumar S., “Molecular evolution and phylogenetics, ” Univ. Oxford. New York, 2000.
66. Kumar S., Stecher G., Tamura K., “Molecular Evolutionary Genetics Analysis 7 for bigger datasets *Molecular Biology and Evolution.*, ” vol. 33, pp. 1870-1874, 2016.
67. Petre B, Major I, Rouhier N and Duplessis S. , “Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar, ” *BMC Plant Biol.*, vol. 10, pp. 11-33, 2011.
68. Wang, Chunlei Tanga, Lin Deng. a. , “ Characterization of a pathogenesis-related thaumatin-like protein gene TaPR5 from wheat induced by stripe rust fungus, ” *Physiol Plant.* , vol. 139, no. 1, pp. 27-38, 2010.
69. Mao Wu H, Wen Liu S, Tsung Hsu M. , “Structure, mechanistic action, and essential residues of a GH-64 enzyme, laminaripentaose-producing beta-1,3-glucanase, ” *J Biol Chem.* , vol. 284, no. 39, 2009.
70. Radauer C¹, Lackner P and Breiteneder H. , “The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands, ” *BMC Evol Biol.* , vol. 10, 2008.
71. Samanani N, Liscombe D.K and Facchini P. , “Molecular cloning and characterization of norcochlorogenic acid synthase, an enzyme catalyzing the first committed step in benzyloxyphenol alkaloid biosynthesis, ” *Plant J.* , vol. 40, no. 2, pp. 302-13, 2004.
72. Fujimoto Y, Nagata R, Fukasawa H. , “Purification and cDNA cloning of cytokinin-specific binding protein from mung bean (*Vigna radiata*), ” *Eur J Biochem.*, vol. 258, no. 2, pp. 794-802, 1998.

Références bibliographiques

73. Vershon AK¹ . , “ Protein interactions of homeodomain proteins, ” *Curr Opin Biotechnol.* , vol. 7, no. 4, pp. 392-6, 1996.
74. Korfhage U.,Trezzini G.H, Meier I , Hahlbrock K and. Somssich I.E. , “Plant homeodomain protein involved in transcriptional regulation of a pathogen defense-related gene, ” *Plant Cell.* , vol. 6, no. 5, pp. 695-708, 1994.
75. Behravan G, Lycksell P and Larsson G. , “Expression, purification and characterization of the homeodomain of rat ISL-1 protein, ” *Protein Engineering.*, vol. 10, no.11, pp.1327–1331, 1997.
76. L.C. van Loon,¹ M. Rep,² and C.M.J. Pieterse¹. , “ Significance of inducible defense-related proteins in infected plants, ” *Annu Rev Phytopathol.*, vol. 44, pp. 135-62, 2006.
77. Serrano R.L, Kuhn A, Hendricks A. , “Structural analysis of the human Golgi-associated plant pathogenesis related protein GAPR-1 implicates dimerization as a regulatory mechanism, ” *J Mol Biol.*, vol. 339, no. 1, pp. 173-83, 2004.
78. Fernández C, Szyperski T, Bruyeáre T. , “NMR solution structure of the pathogenesis-related protein P14a, ” *J Mol Biol.*, vol. 266, no. 3, pp. 576-93, 1997.
79. Durand A, Hughes R, Roussel A. , “Emergence of a subfamily of xylanase inhibitors within glycoside hydrolase family 18, ” *the FEBS journal.*, vol. 272, pp. 1745–1755, 2005.

Annexe

Tableau S1. Principales caractéristiques physiques des protéines identifiées

ID gène	Protéine (Aa)	Type	Domaines	Fonction	Référence
Medtr1g021945.1	249			Cette superfamille regroupe des glucosides hydrolases de la famille (GH64), plus la thaumatine, et les protéines de type thaumatin-like protéines (TLP) qui sont impliquées dans la défense de l'hôte	-67
Medtr1g025420.1	323				-68
Medtr1g025420.2	267				
Medtr1g062390.1	244				
Medtr1g062640.1	154				
Medtr2g063150.1	256				
Medtr2g063160.1	114				
Medtr2g068030.1	254				
Medtr2g068655.1	309				
Medtr2g076010.1	227				
Medtr3g068015.1	249				
Medtr3g081550.1	115				
Medtr3g111620.1	250				
Medtr3g114030.1	237				
Medtr4g063630.1	252	PR05	GH64-TLP-SF _ pathogenesis-related thaumatin family protein _ pathogenesis-like protein		
Medtr4g073720.1	344				
Medtr4g073730.1	290				
Medtr4g073730.2	326				
Medtr5g010635	241				
Medtr5g010640	236				
Medtr5g022310.1	300				
Medtr5g022310.2	256				
Medtr5g022350.1	316				
Medtr5g022350.2	223				
Medtr5g023850	224				
Medtr5g059200	282				
Medtr5g068670	132				
Medtr6g009480	272				
Medtr6g079580	240				
Medtr7g062610	245				
Medtr7g076360	172				

Annexe

Medtr8g036215	237				
Medtr8g037890	317				
Medtr8g056820	257				
Medtr8g075510.1	308				
Medtr8g075510.2	249				
Medtr8g075550	306				
Medtr8g088960	104				
Medtr8g089020.1	159				
Medtr8g096900.1	248				
Medtr8g096910.1	176				
Medtr8g096920.1	173				
Medtr8g107140.1	249				
Medtr1g030810.1	153		SRPBCC	La Superfamille de	
Medtr1g031640.1	147			SRPBCC est une	-70
Medtr2g435310.1	160			superfamille de	
Medtr3g055120.1	156			domaine de liaison au	-71
Medtr3g055120.2	154		pathogenesis-related protein bet	ligand de START	
Medtr3g055130.1	155	PR10	V I family protein	()	-72
Medtr4g120760.1	160				
Medtr4g120760.2	160				
Medtr4g120940.1	120				
Medtr4g120970	158				
Medtr6g033450	158				
Medtr8g045400	156				
Medtr8g045490	156				
Medtr8g045520	157				
Medtr8g045560	156				
Medtr8g045570	152				
Medtr8g045640	156				
Medtr8g045665	156				
Medtr2g038000.1	707	ND	HOX/PHD,PRHA-Li	-PHD,PRHADoigt	-73

Annexe

				PHD trouvé dans la protéine homéodomaine liée à la pathogenèse d'Arabidopsisthaliana (PRHA) et des protéines similaires -HOXHomeodomaine	-74 -75
Medtr2g076070.1 Medtr2g076070.2	227 164	ND		-pathogenesis-likeprotein	
Medtr4g120950 Medtr8g045555	163 152	ND		-pathogenesis-related protein bet V I family protein	
Medtr8g058350 Medtr8g058700	237 98	ND		-pathogenesis-likeprotein	
Medtr2g435490.1	183	PR1	SCP_PR-1_like	domaine de protéines extracellulaires de type SCP, c'est une protéine liée à la pathogenèse végétale	-76 -77 -78
Medtr2g034480.1	362	PR2	Glyco_hydro_17	Glycosyl hydrolases family 17 une activité hydrolytique	
Medtr3g118390.1	382	PR3	Glyco_hydro_19 Chitin_bind_1	-Chitinase class I -ChtBD1: Domaine de liaison de hévéine ou de chitine de type 1	
Medtr7g115220.1	202	PR4	Barwin	-Barwinfamily	

Annexe

			Chitin_bind_1	-ChtBD1: Domaine de liaison de hévéine ou de chitine de type 1	
Medtr1g099310.1	296	PR8	GH18_hevamine_XipI_class_III	Cette famille regroupe les chitinases de plantes de classe III telles que l'hévéine,est importante pour la défense contre les bactéries et les champignons pathogènes	-79
Medtr5g090250.2	70	PR6	potato_inhibit	Potato inhibitor I family	

Annexe

Tableau S2.Correspondance gènes et sonde affymetrix

Le numéro de gène	ID gène	ID probset	classe de protéine	E-value	Bit score
1	Medtr5g022310.2	Msa.1526.1.S1_at	PR5	0	662
2	Medtr8g045560.1	Msa.1635.1.S1_at	PR10	1E-146	517
	Medtr8g045640.1			1E-137	488
	Medtr8g045665.1			1E-130	462
3	Medtr5g010640.1	Msa.2622.1.S1_at	PR5	0	928
4	Medtr8g045400.1	Mtr.10364.1.S1_at	PR10	0	664
5	Medtr8g096900.1	Mtr.10968.1.S1_at	PR05	0	799
6	Medtr2g076070.1	Mtr.1214.1.S1_at		0	969
	Medtr2g076070.2				
7	Medtr2g435310.1	Mtr.12615.1.S1_at	PR10	8,00E-59	226
	Medtr4g120760.1			1,00E-171	599
	Medtr4g120760.2			1,00E-167	585
8	Medtr8g075510.1	Mtr.15053.1.S1_at	PR5	0	1049
	Medtr8g075510.2				718
9	Medtr8g075550.1	Mtr.15054.1.S1_at	PR5	0	1082
10	Medtr2g038000.1	Mtr.15743.1.S1_at		0	809

Annexe

11	Medtr8g107140.1	Mtr.17268.1.S1_at	PR5	0	1098
	Medtr6g079580.1			0.0000000000000001	83.8
12	Medtr5g022310.1	Mtr.17914.1.S1_at	PR5	0	1019
13	Medtr8g036215.1	Mtr.19129.1.S1_at	PR5	0.000000001	63.9
	Medtr8g037890.1			1E-174	611
	Medtr3g068015.1			0.000004	52
	Medtr8g056820.1			0	1031
14	Medtr6g009480.1	Mtr.19465.1.S1_at	PR5	0	963
15	Medtr7g076360.1	Mtr.26405.1.S1_at	PR5	1E-161	565
16	Medtr2g076010.1	Mtr.26632.1.S1_at	PR5	0	979
	Medtr2g076010.2				
17	Medtr5g059200.1	Mtr.28302.1.S1_at	PR5	4E-62	238
18	Medtr2g068030.1	Mtr.32260.1.S1_at	PR05	3,00E-41	168
19	Medtr3g114030.1	Mtr.33394.1.S1_at	PR05	0	672
20	Medtr4g120940.1	Mtr.34114.1.S1_s_at	PR10	1,00E-120	430
	Medtr4g120970.1			1E-167	587
	Medtr6g033450.1			1E-167	587
21	Medtr1g030810.1	Mtr.36367.1.S1_at	PR10	1,00E-177	618

Annexe

22	Medtr4g063630.1	Mtr.37482.1.S1_at	PR05	1,00E-168	591
23	Medtr4g120950.1	Mtr.37852.1.S1_at		1E-175	613
24	Medtr8g045570.1	Mtr.38110.1.S1_at	PR10	0	749
	Medtr8g045490.1			2E-90	331
25	Medtr8g045520.1	Mtr.40106.1.S1_s_at	PR10	1E-129	460
26	Medtr8g045555.1	Mtr.40109.1.S1_at		1E-72	272
27	Medtr4g073730.1	Mtr.42529.1.S1_at	PR05	0	1013
	Medtr4g073730.2				
28	Medtr2g068655.1	Mtr.42536.1.S1_at	PR05	0	1063
29	Medtr8g096920.1	Mtr.42775.1.S1_at	PR05	0	795
30	Medtr5g010635.1	Mtr.42989.1.S1_at	PR5	0	759
31	Medtr3g055120.1	Mtr.43078.1.S1_s_at	PR10	0	858
	Medtr3g055120.2				813
	Medtr3g055130.1				0.0000006
32	Medtr4g073720.1	Mtr.43370.1.S1_at	PR05	1,00E-158	557
33	Medtr1g031640.1	Mtr.45999.1.S1_at	PR10	0	854

Annexe

34	Medtr7g062610.1	Mtr.49138.1.S1_at	PR5	0.0000003	56
35	Medtr8g058350.1	Mtr.51369.1.S1_at		0	1130
	Medtr8g058700.1			1E-62	238
36	Medtr1g062640.1	Mtr.6757.1.S1_at	PR05	1,00E-63	242
37	Medtr8g096910.1	Mtr.8763.1.S1_at	PR05	0	793
38	Medtr1g025420.1	Mtr.9391.1.S1_at	PR05	0	785
	Medtr1g025420.2				783
39	Medtr5g022350.1	Mtr.9418.1.S1_s_at	PR05	1E-156	551
	Medtr5g022350.2			1E-131	466

Annexe

Tableau S3. Correspondance sonde-numéro sur figure heatmap

Sonde	Numéro sur Heatmap
Msa.1526.1.S1_at	1
Msa.1635.1.S1_at	2
Msa.2622.1.S1_at	3
Mtr.10364.1.S1_at	4
Mtr.10968.1.S1_at	5
Mtr.1214.1.S1_at	6
Mtr.12615.1.S1_at	7
Mtr.15053.1.S1_at	8
Mtr.15054.1.S1_at	9
Mtr.15743.1.S1_at	10
Mtr.17268.1.S1_at	11
Mtr.17914.1.S1_at	12
Mtr.19129.1.S1_at	13
Mtr.19465.1.S1_at	14
Mtr.26405.1.S1_at	15
Mtr.26632.1.S1_at	16
Mtr.28302.1.S1_at	17
Mtr.32260.1.S1_at	18
Mtr.33394.1.S1_at	19
Mtr.34114.1.S1_s_at	20
Mtr.36367.1.S1_at	21
Mtr.37482.1.S1_at	22
Mtr.37852.1.S1_at	23
Mtr.38110.1.S1_at	24
Mtr.40106.1.S1_s_at	25
Mtr.40109.1.S1_at	26
Mtr.42529.1.S1_at	27
Mtr.42536.1.S1_at	28
Mtr.42775.1.S1_at	29
Mtr.42989.1.S1_at	30
Mtr.43078.1.S1_s_at	31
Mtr.43370.1.S1_at	32
Mtr.45999.1.S1_at	33
Mtr.49138.1.S1_at	34
Mtr.51369.1.S1_at	35
Mtr.6757.1.S1_at	36
Mtr.8763.1.S1_at	37
Mtr.9391.1.S1_at	38
Mtr.9418.1.S1_s_at	39

Annexe

Tableau S4. PRs induite dans des racines non traitées (contrôles). E1 : *P. omnivorum*, E2 : condition symbiotique, E3 : *A. eutriches*, E4 : *R. solanacearum* et E5 : *Macrophomina* sp.

Expériences	PRs induites
E1	Mtr.42989.1.S1_at
E2	Mtr.51369.1.S1_at/Mtr.9391.1.S1_at
E3	Mtr.37852.1.S1_at/Mtr.42536.1.S1_at/Mtr.6757.1.S1_at
E4	Mtr.26405.1.S1_at
E4 Vs. E5	Mtr.1214.1.S1_at/Mtr.15053.1.S1_at
E3 Vs. E4	Mtr.19129.1.S1_at/Mtr.32260.1.S1_at/Mtr.37482.1.S1_at
E2 Vs. E3	Mtr.43078.1.S1_s_at
E2 Vs. E3 Vs. E5	Mtr.40109.1.S1_at
E2 Vs. E3 Vs. E4	Msa.1526.1.S1_at/Mtr.37482.1.S1_at/Mtr.40106.1.S1_s_at
E1 Vs. E2 Vs. E3	Mtr.19465.1.S1_at/Mtr.28302.1.S1_at/Mtr.43370.1.S1_at
E3 Vs. E4 Vs. E5	Mtr.26632.1.S1_at
E1 Vs. E3 Vs. E5	Mtr.42529.1.S1_at/Mtr.45999.1.S1_at
E2 Vs. E4 Vs. E5	Mtr.42775.1.S1_at
E1 Vs. E2 Vs. E3 Vs. E5	Msa.1635.1.S1_at/Mtr.10364.1.S1_at/Mtr.15054.1.S1_at/Mtr.36367.1.S1_at/Mtr.38110.1.S1_at
E1 Vs. E2 Vs. E3 Vs. E4	Mtr.15743.1.S1_at/Mtr.17268.1.S1_at/Mtr.33394.1.S1_at
E1 Vs. E2 Vs. E3 Vs. E4 Vs. E5	Mtr.9418.1.S1_s_at

Annexe

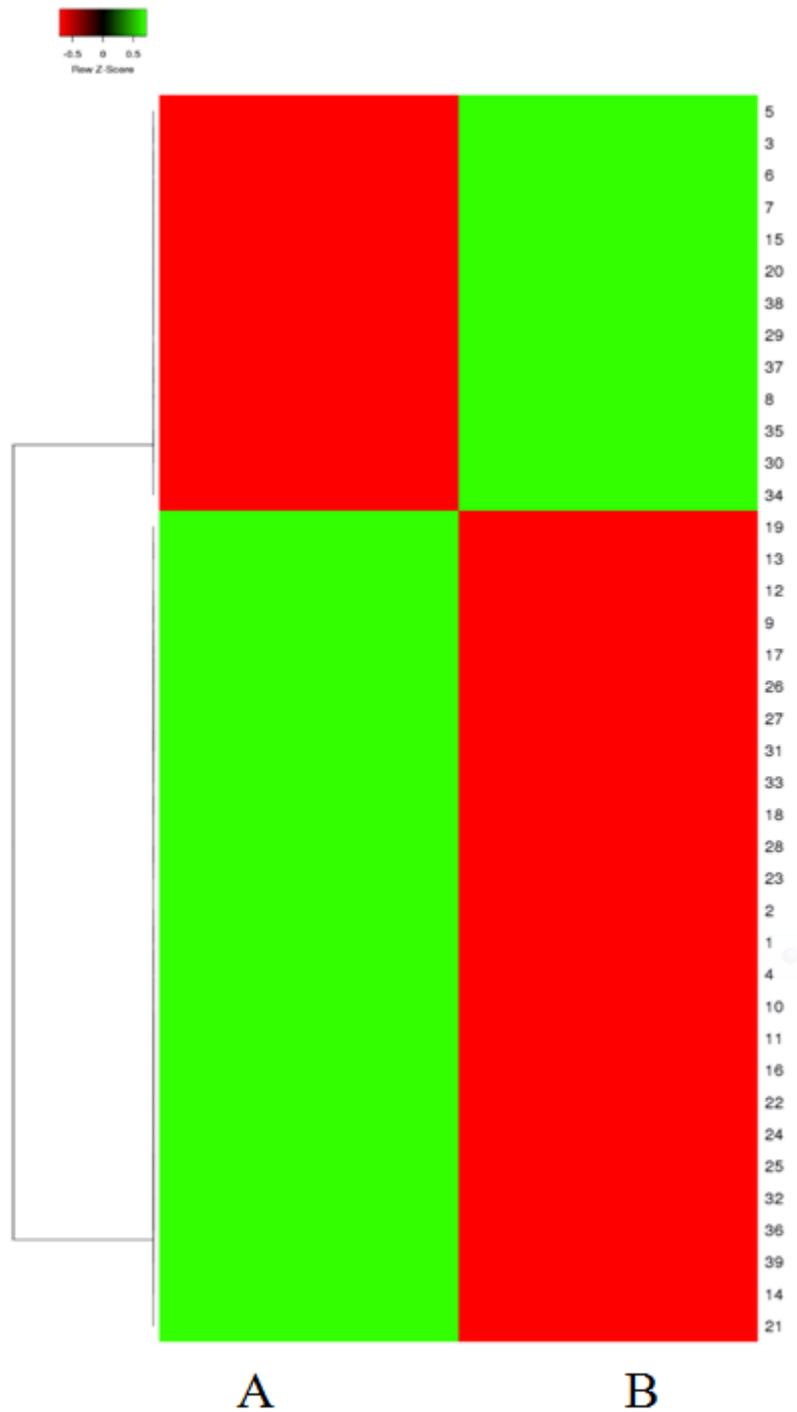


Figure S1. Expression des PRs5, PRs10 et des autres PRs au sein de racines *M. truncatula* en réponse au pathogène *A. etryche* à 0hpi (contrôle ; A), 24hpi (B). Les données sont issues du MtGEA et traitées grâce au logiciel heatmap. En vert les gènes sont induits, en rouge les gènes sont réprimés, en noir les gènes sont peut variables. Chaque numéro en colonne de droite correspond à une sonde, voir tableau S3 pour les correspondances.

Annexe

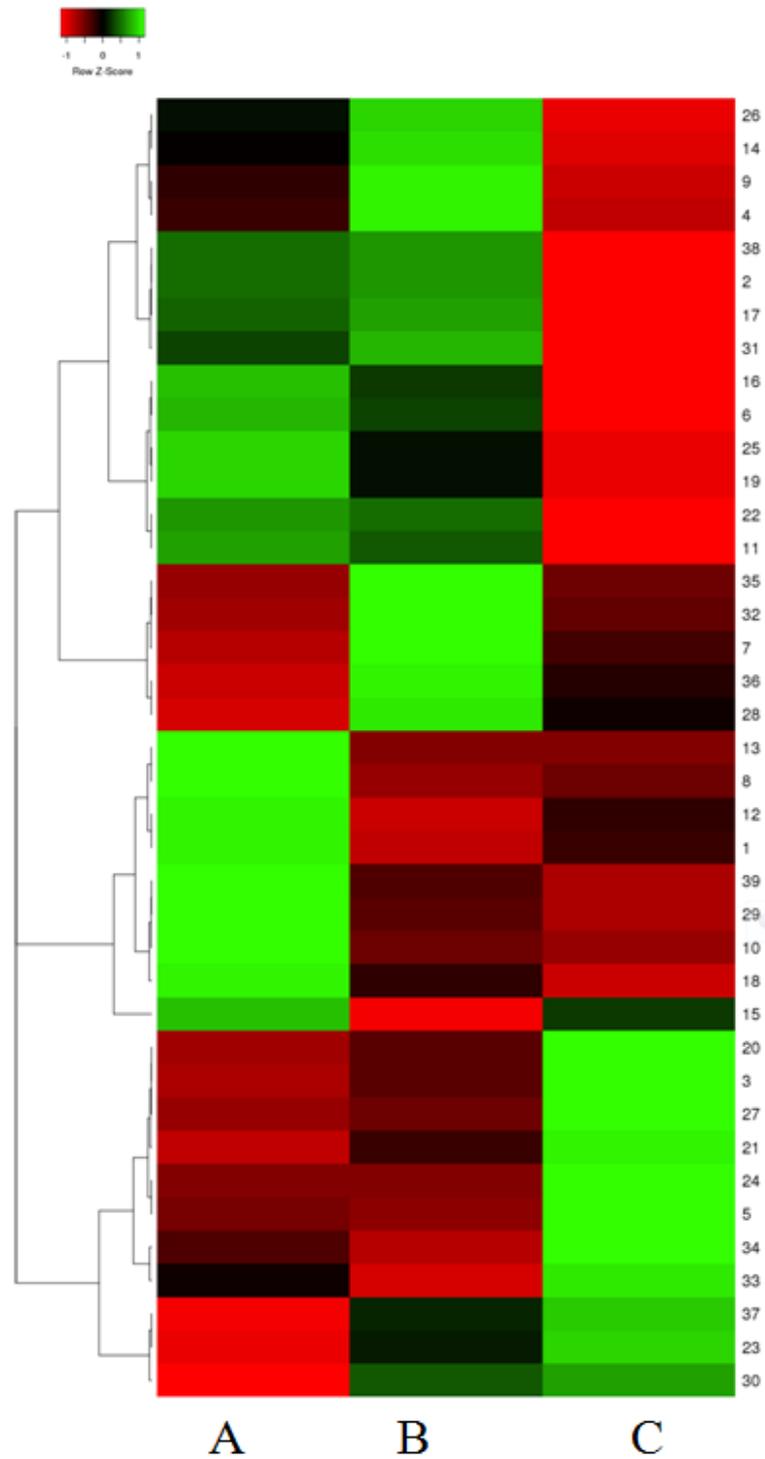


Figure S2. Expression des PRs5, PRs10 et des autres PRs au sein de racines *M. truncatula* en réponse au pathogène *R. solanacearum* à 0hpi (contrôle, A), 12hpi (B) et 72hpi (C). Les données sont issues du MtGEA et traitées grâce au logiciel heatmapper. En vert les gènes sont induits, en rouge les gènes sont réprimés, en noir les gènes sont peut variables. Chaque numéro en colonne de droite correspond à une sonde, voir tableau S3 pour les correspondances.

Annexe

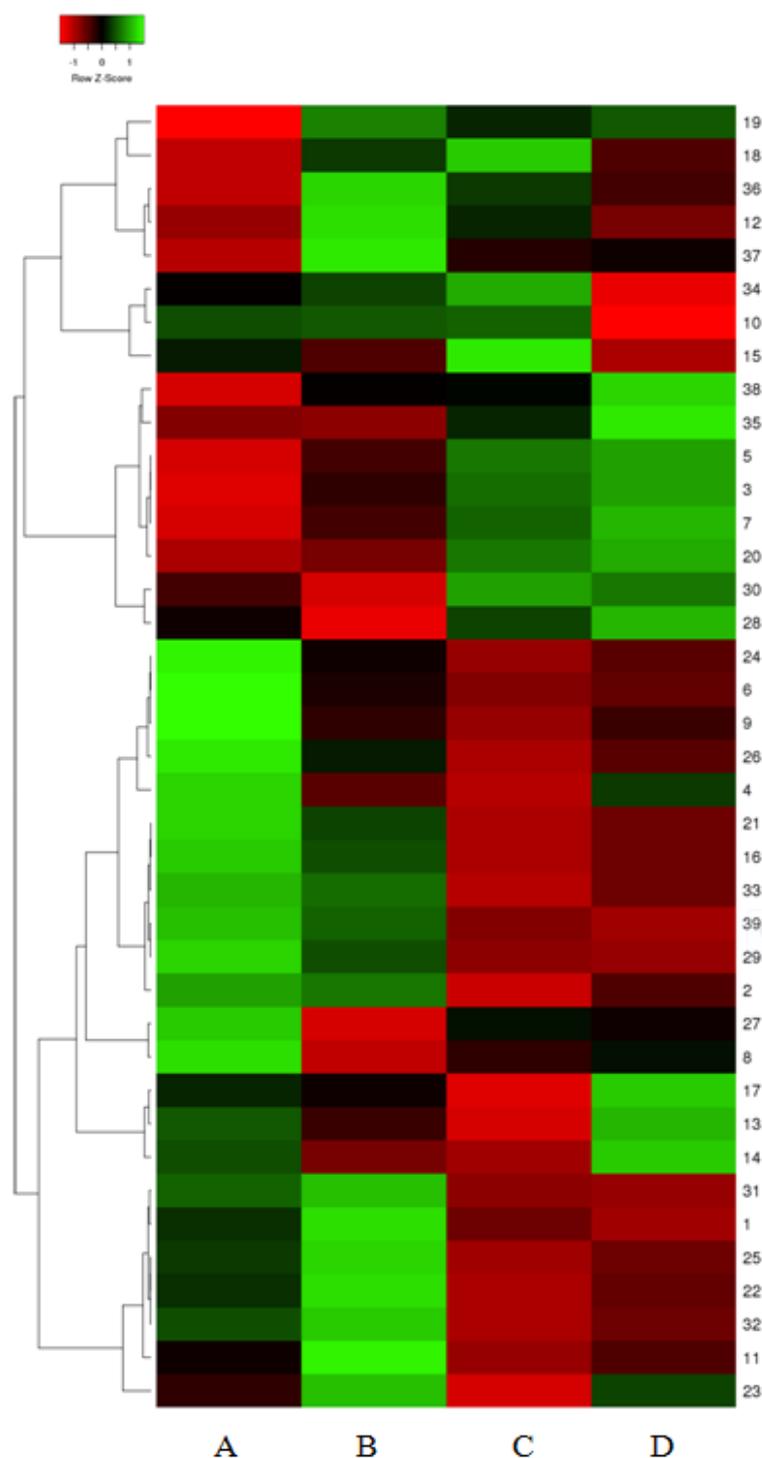


Figure S3. Expression des PRs 5, PRs 10 et des autres PRs au sein de racines *M. truncatula* en réponse au pathogène *Macrophomina* sp à 0hpi (contrôle, A), 24hpi (B), 36hpi (C) et 48 hpi (D). Les données sont issues du MtGEA et traitées grâce au logiciel heatmap. En vert les gènes sont induits, en rouge les gènes sont réprimés, en noir les gènes sont peut variables. Chaque numéro en colonne de droite correspond à une sonde, voir tableau S3 pour les correspondances.

Annexe

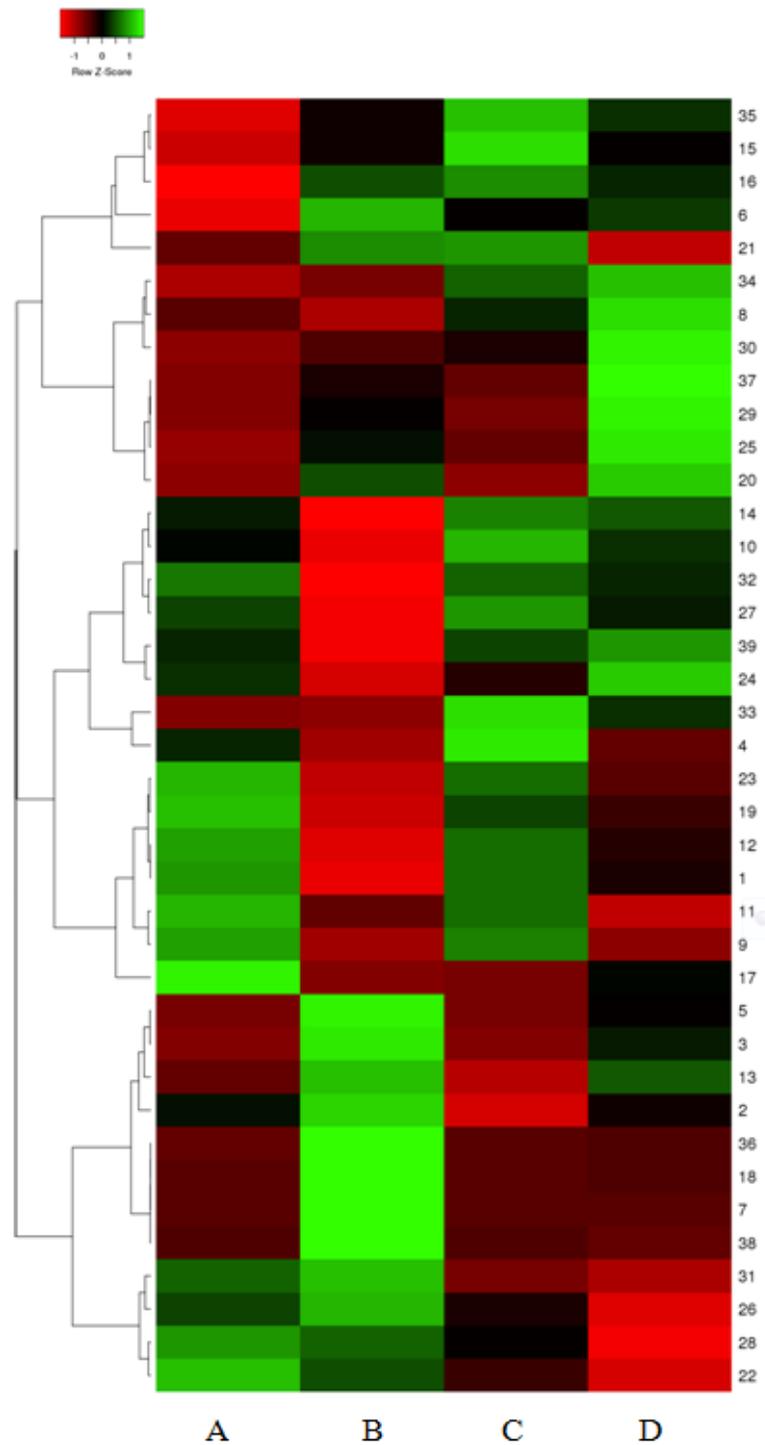


Figure S4. Expression des PRs 5, PRs 10 et des autres PRs de cellules géantes de *M. truncatula* en réponse à un traitement aux extraits de levure à 2 heures (B) (Vs. Contrôle 2 heures, (A)) et 24 heures (D) (Vs. Contrôle 24 heures (C)). Les données sont issues du MtGEA et traitées grâce au logiciel heatmaper. En vert les gènes sont induits, en rouge les gènes sont réprimés, en noir les gènes sont peut variables. Chaque numéro en colonne de droite correspond à une sonde, voir tableau S3 pour les correspondances.

Annexe

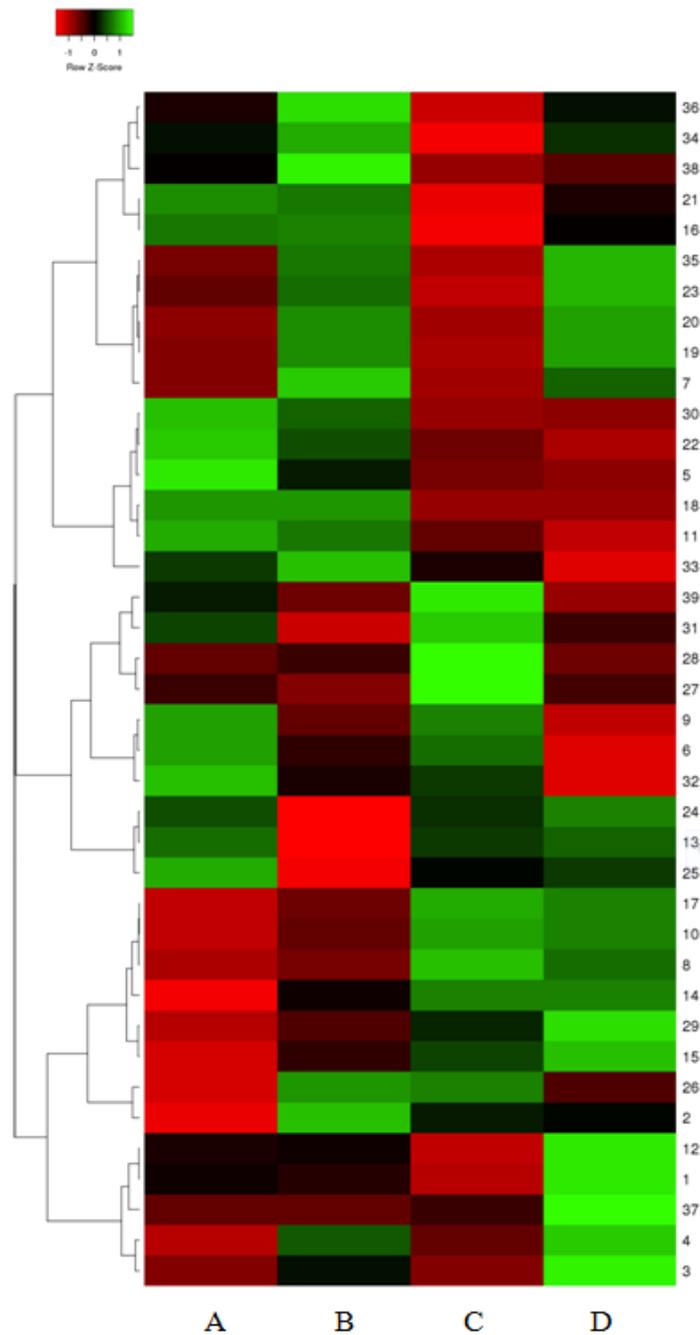


Figure S5. Expression des PRs5, PRs10 et des autres PRs de cellules géantes de *M. truncatula* en réponse à un traitement au méthyle de jasmonate à 2 heures (B) (Vs. Contrôle 2 heures, (A)) et 24 heures (D) (Vs. Contrôle 24 heures, (C)). Les données sont issues du MtGEA et traitées grâce au logiciel heatmaper. En vert les gènes sont induits, en rouge les gènes sont réprimés, en noir les gènes sont peut variables. Chaque numéro en colonne de droite correspond à une sonde, voir tableau S3 pour les correspondances.

Annexe

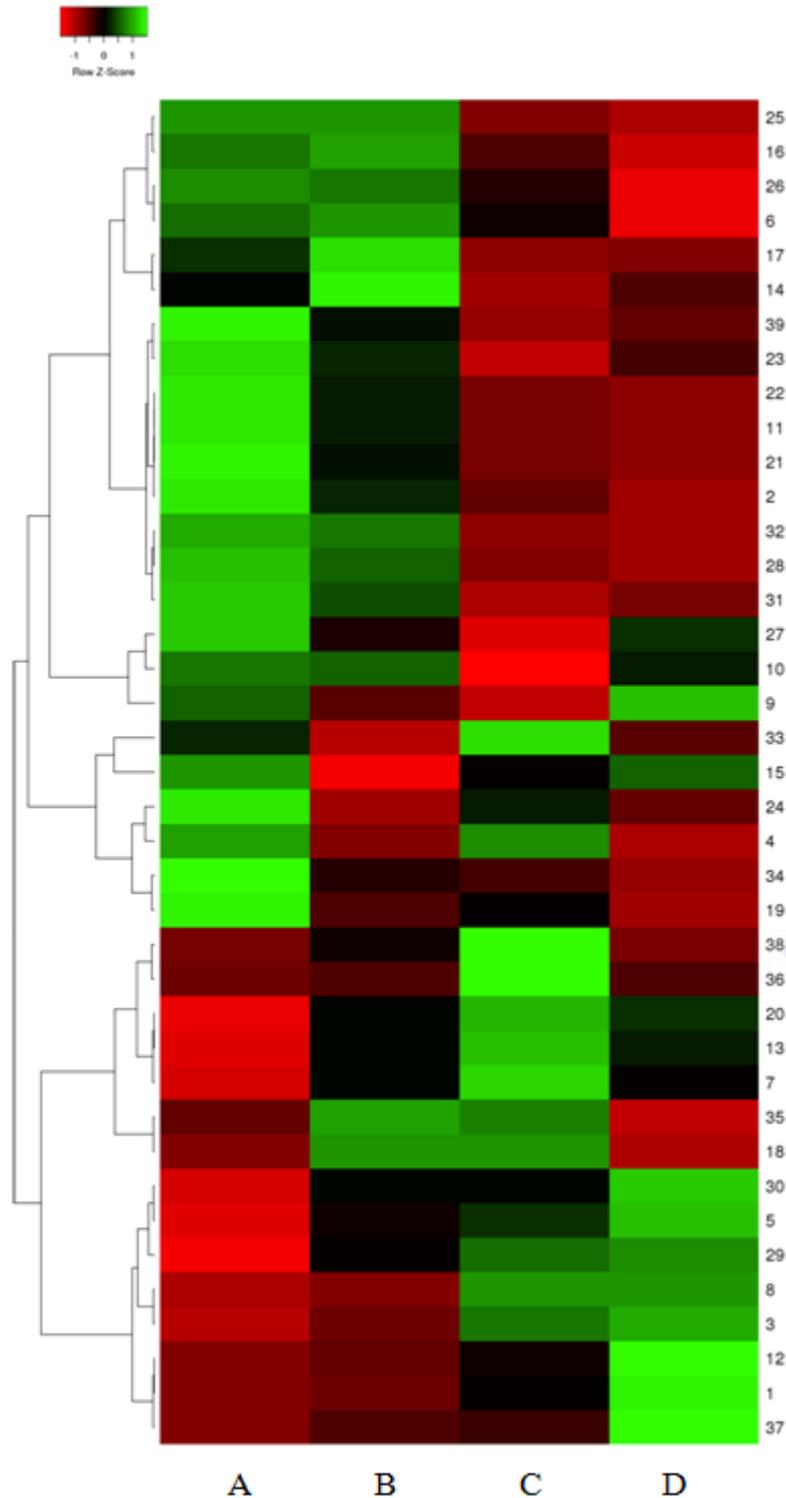


Figure S6. Expression des PRs5, PRs10 et des autres PRs au sein de nodosités traitées avec de la phosphoéntricine à 0 heure (contrôle, (A)), 4 heures (B), 8 heures (C) et 24 heures (D). Les données sont issues du MtGEA et traitées grâce au logiciel heatmaper. En vert les gènes sont induits, en rouge les gènes sont réprimés, en noir les gènes sont peut variables. Chaque numéro en colonne de droite correspond à une sonde, voir tableau S3 pour les correspondances.

Résumé

En condition de carence en azote *Medicago truncatula* a la capacité d'établir une interaction symbiotique avec la bactérie du sol fixatrice d'azote *Sinorhizobium medicae*. Au cours de cette association un nouvel organe racinaire est formé, la nodosité fixatrice d'azote, cette dernière est infectée de manière massive et chronique par les bactéries sans qu'aucune réponse immunitaire soit enclenchée. Nos recherches ont portées sur l'étude d'une famille de gènes les Pathogenesis Related protein (PRs) et leur implication au cours des interactions *Medicago*-microorganismes, dont la symbiose et la sénescence. Des approches d'analyses de génomiques, protéomique, transcriptomique et phylogénétique ont été réalisées. Nos résultats montre que cette famille de gènes comporte 66 membres répartie essentiellement entre les PR5 et PR10. Dérivant de plusieurs ancêtre, ces gènes sont induit de manière différentielle en réponse au pathogène, au cours de la symbiose et au cours de la sénescence des nodosités (processus de destruction). Nos résultats constitue la première description de cette famille et souligne l'importance de ces gènes au cours des interactions avec les microorganismes. De plus certain PRs semble jouait un rôle important au cours de la symbiose et de la sénescence. Notre travail montre de manière claire que la sénescence fait intervenir des phénomènes immunitaires.

Mots clés :

Medicago truncatula, sénescence, immunité, symbiose, rhizobia, Pathogenesis Related protein.

ملخص

في حالات نقص الازوت *Medicago truncatula* لديها القدرة على تكوين روابط تعايشية مع بكتيريا التربة المثبتة للازوت *Sinorhizobium medicae*. خلال هذه العلاقة التعايشية يتم تشكيل عضو جذري جديد ألا وهو العقدة المسؤولة على تثبيت الازوت الجوي. تصاب هذه الأخيرة بطريقة ضخمة ومزمنة من قبل عدد كبير من البكتيريا لكن هذه الاصابات تكون دون أي استجابة مناعية. ركزنا خلال بحثنا على دراسة عائلة من الجينات و هي عائلة (PRs) و هدفنا لمعرفة دورها أثناء تفاعل *Medicago*-و الكائنات الحية الدقيقة، و كذلك أثناء فترة التعايش و الشيخوخة. تحاليل جينومية بروتينية استنساخية و تطويرية قد تم انجازها. تشير النتائج التي تحصلنا عليها إلى أن هذه العائلة الجينية تضم 66 عضواً موزعة بشكل أساسي بين PR5 و PR10. المستمدة من العديد من الأسلاف، هذه الجينات تعبر بطريقة مختلفة في حالة الكائن الممرض. خلال التعايش و خلال شيخوخة العقيدات (عملية التدمير). نتائجا تشكل أول وصف لهذه العائلة وتؤكد على أهمية هذه الجينات خلال التفاعل مع الكائنات الحية الدقيقة. علاوة على ذلك، يبدو أن بعض (PRs) يلعبون دوراً مهماً أثناء التعايش و الشيخوخة. يظهر عملنا بوضوح أن الشيخوخة تنطوي على ظواهر مناعية.

الكلمات المفتاحية

Medicago truncatula، الشيخوخة، المناعة، التعايش، rhizobia، pathogenesis related protein.

Abstract

In nitrogen deficiency, *Medicago truncatula* has the ability to establish a symbiotic interaction with a nitrogen-fixing soil, *Sinorhizobium medicae* bacterium. During this association a new root organ is formed, the nitrogen fixing nodule, this new organ is infected in a massive and chronic way by the bacteria without any immune response triggered. Our research is focused on the study of a gene family Pathogenesis Related Protein (PRs) and their involvement during interactions *Medicago*-microorganisms, including symbiosis. Genomics, proteomic, transcriptomic and phylogenetic analysis approaches have been carried out. Our results show that this gene family has 66 members and is essentially distributed between PR5 and PR10. Deriving from several ancestors, these genes are differentially induced in response to the pathogen, during symbiosis and during the senescence of nodules (destruction process). Our results constitute the first description of this family and underline the importance of these genes during interactions with microorganisms. Moreover, some PRs seem to play an important role during symbiosis and senescence. Our work clearly shows that senescence involves immune phenomena.

Keywords :

Medicago truncatula, senescence, immunity, symbiosis, rhizobia, Pathogenesis Related protein.