



THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*

Discipline ou spécialité : *Biosciences Végétales*

Présentée et soutenue par *Malick MBENGUE*

Le 8 Novembre 2010

Titre :

Perception et transduction du signal bactérien facteur Nod dans l'établissement de la symbiose rhizobium-légumineuse : recherche et caractérisation de partenaires du LysM-RLK LYK3, un récepteur putatif des facteurs Nod chez Medicago truncatula.

JURY

Guillaume BECARD - Professeur de l'Université Paul Sabatier, Toulouse

Didier BOGUSZ - Directeur de recherche IRD, Montpellier (Rapporteur)

Jean-Benoît MOREL - Directeur de recherche INRA, Montpellier (Rapporteur)

Julie CULLIMORE - Directrice de recherche INRA, Toulouse (Directrice de Thèse)

Ecole doctorale : *Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques, Bioingénierie (SEVAB)*

Unité de recherche : *Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes*

Directeur(s) de Thèse : *Julie CULLIMORE et Benoît LEFEBVRE*

Rapporteurs : *Didier BOGUSZ, Jean-Benoît MOREL*

Le travail présenté dans ce manuscrit de thèse n'aurait jamais abouti sans le support constant et infailible de Julie Cullimore, Benoit Lefebvre et Christine Hervé. Ils ont su, chacun à leur manière et tous par leur disponibilité, me guider, me conseiller, et enfin m'aider à terminer ce travail pour que ma thèse touche à sa fin. Je les en remercie chaleureusement et les admire pour leur extrême patience avec moi.

Je remercie également tous les membres du labo qui participent à former cette atmosphère de travail du L.I.P.M., amicale et décontractée tout en sachant transmettre le goût de l'exigence scientifique. Aussi, j'ai une pensée particulière pour mes camarades thésards, Alex, Amin, Laure, Philippe, Guillaume, Joanne, Mathieu et Maud grâce à qui les traversées du désert et les pauses-café n'ont jamais été solitaires et toujours d'excellente compagnie.

Enfin, je tiens à saluer l'endurance de mon entourage, mes parents Claudie et Oumar, et mes amis Benoit, Nathalie, Olivier, François, Julie, Fanny et Thomas, qui ont su gérer sans repos l'alternance de ces moments d'euphorie et de dépression que l'exercice d'une thèse peut provoquer...

A Marguerite,

Auteur : Malick Mbengue

Titre : Perception et transduction du signal bactérien facteur Nod dans l'établissement de la symbiose rhizobium-légumineuse : recherche et caractérisation de partenaires d'un récepteur putatif des NFs chez *Medicago truncatula*

Directeurs de thèse : Julie Cullimore et Benoît Lefebvre

Résumé :

Les légumineuses sont capables d'établir une interaction symbiotique avec des bactéries du sol, collectivement appelées rhizobia. Les facteurs Nod (NFs), molécules produites par le symbiote, sont indispensables à l'établissement de cette symbiose. Les études génétiques chez *M. truncatula* ont révélé l'implication de deux récepteurs kinase de la famille des LysM-RLKs, NFP et LYK3, dans la perception des NFs. NFP est indispensable à toutes les réponses induites chez l'hôte par les NFs alors que LYK3 contrôle spécifiquement l'infection.

Afin de mieux comprendre les mécanismes de signalisation encore mal connus en aval de LYK3, deux criblages de banques d'ADNc de *M. truncatula* dans deux systèmes double-hybride ont été entrepris dans le but d'identifier des partenaires de ce récepteur. Un de ces criblages a permis l'identification d'un gène codant pour une E3 ubiquitine ligase de la famille des U-Box et nommé *MtPUB1*. *MtPUB1* joue un rôle négatif dans les processus d'infection et de nodulation. Comme pour *LYK3*, ce rôle dépend de la nature des NFs produits par le symbiote. En parallèle, il a été montré par une approche ciblée que LYK3, NFP et DMI2 peuvent interagir avec une remorine, protéine membranaire contrôlant positivement l'infection chez *M. truncatula*.

Mots-clés : *Medicago truncatula*, *Sinorhizobium meliloti*, Symbiose, Nodulation, LysM-RLK, LYK3, Facteurs Nod, E3 ubiquitine ligase, U-Box, Remorine, Infection.

Discipline Administrative : Biosciences Végétales

Intitulé et adresse du laboratoire : Laboratoire des Interactions Plantes – Microorganismes CNRS/INRA 2594/441, Chemin de Borde-Rouge, BP52627, 31326, Castanet-Tolosan Cedex

Author: Malick Mbengue

Title: Transduction of the bacterial Nod factor signal in the establishment of the legume-rhizobia symbiosis: searching for partners of a putative Nod factor receptor of *Medicago truncatula*

Thesis supervisors: Julie Cullimore and Benoit Lefebvre

Abstract:

To acquire nitrogen, legume plants can establish symbiotic interactions with nitrogen fixing soil-born bacteria, collectively referred to as rhizobia. Nod factors (NFs) are rhizobia produced molecules essential for the establishment of this interaction. Genetic studies of NF perception in *Medicago truncatula* led to the identification of two lysin motif receptor-like kinases (LysM-RLKs), NFP and LYK3. NFP is necessary for all NF induced responses while LYK3 specifically controls infection.

Signalling events downstream of LYK3 are poorly understood. To decipher this signalling pathway, two different yeast two-hybrid screens using *M. truncatula* cDNA libraries and LYK3 as bait were performed. One screen identified an E3 ubiquitin ligase of the U-Box family named *Medicago truncatula* Plant U-Box 1. MtPUB1 symbiotic role has been determined. In parallel, a second approach based on pairwise interaction assays identified a remorin protein as partner of the three symbiotic receptor-like kinases, NFP, LYK3 and DMI2.

Key words: *Medicago truncatula*, *Sinorhizobium meliloti*, Symbiosis, Nodulation, LysM-RLK, LYK3, Nod factors, E3 ubiquitin ligase, Ubiquitination, Remorin, Infection.

Laboratory: Laboratoire des Interactions Plantes – Microorganismes CNRS/INRA 2594/441, Chemin de Borde-Rouge, BP52627, 31326, Castanet-Tolosan Cedex

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
I) FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE MOLECULAIRE ET SYMBIOSE RHIZOBIUM- LEGUMINEUSE	3
1) <i>Intérêt agronomique et écologique.....</i>	3
2) <i>Les micro-organismes fixateurs d'azote atmosphérique</i>	4
3) <i>La symbiose rhizobium-légumineuse.....</i>	7
4) <i>La symbiose endomycorhizienne à arbuscules</i>	11
II) LES BASES MOLECULAIRES DE L'INTERACTION RHIZOBIUM-LEGUMINEUSE	13
1) <i>Les flavonoïdes.....</i>	13
2) <i>Les facteurs Nods</i>	14
3) <i>Les réponses de l'hôte aux NFs.....</i>	16
III) PERCEPTION ET TRANSDUCTION DU SIGNAL FACTEUR NODS CHEZ M. TRUNCATULA	20
1) <i>La perception des NFs.....</i>	21
2) <i>Transduction du signal NFs.....</i>	25
3) <i>Gènes requis pour l'infection.....</i>	31
4) <i>Interférences entre organogenèse nodulaire et infection : vers un modèle génétique</i>	33
IV) ETUDES DE LA SIGNALISATION NFs PAR DES APPROCHES BIOCHIMIQUES ET PHARMACOLOGIQUES.....	35
1) <i>Approches biochimiques.....</i>	35
2) <i>Approches pharmacologiques</i>	36
V) RECEPTEURS KINASE ET PARTENAIRES DE SIGNALISATION.....	38
1) <i>Diversité des RLKs et rôles biologiques</i>	38
2) <i>Mode d'action des RLKs, BRI1 et SRK en exemples.....</i>	40
3) <i>Les E3 ubiquitine ligases comme partenaires de RLKs</i>	45
VI) PRESENTATION DU SUJET DE THESE	50
CHAPITRE I.....	52
I) LES SYSTEMES DOUBLE-HYBRIDE DE LEVURE	53
1) <i>Principes généraux du double-hybride de levure.....</i>	53
2) <i>Le système double-hybride de levure Split-Ubiquitine.....</i>	54
3) <i>Le système double-hybride de levure GAL4</i>	56
II) RECHERCHE DE PARTENAIRES DE LYK3 AVEC A PRIORI	58

1) Interaction entre LYK3 et les protéines membranaires de la voie de signalisation NFs : LYK3, NFP, DMI1 et DMI2	58
2) Interaction entre LYK3 et MtSYMREM1.....	60
III) RECHERCHE DE PARTENAIRES DE LYK3 SANS A PRIORI.....	63
1) Criblage d'une banque d'ADNc en système Split-Ubiquitine	63
2) Criblage d'une banque d'ADNc en système GAL4.....	67
3) Choix du candidat pour la poursuite des travaux de recherche	71
CHAPITRE II.....	72
RESUME DE L'ARTICLE.....	73
CHAPITRE III	84
RESUME DE L'ARTICLE.....	85
DISCUSSION.....	111
I) MtPUB1, UN REGULATEUR NEGATIF DANS L'ETABLISSEMENT DE LA SYMBIOSE FIXATRICE D'AZOTE	112
1) Une régulation nouvelle	112
2) Phylogénie et similarités chez les légumineuses.....	113
3) Relations entre voie d'organogenèse et voie d'infection.....	115
4) Localisation subcellulaire de MtPUB1	116
5) Quel mode d'action pour MtPUB1 ?	117
6) Un modèle de fonctionnement pour MtPUB1	120
7) Perspectives de recherche	121
II) MTSYMREM1 ET LA SIGNALISATION NFs	124
1) Les remorines.....	124
2) Quel rôle et quelle fonction pour MtSYMREM1 dans la signalisation NFs ?.....	125
III) CONCLUSIONS	128
BIBLIOGRAPHIE	129

INTRODUCTION

Etymologiquement, le terme symbiose signifie « vivre avec ». Au sens large, une symbiose implique au minimum deux organismes vivants dont l'association stable dans le temps existe sous trois aspects suivant les bénéfices retirés par l'un ou l'autre des partenaires. Le parasitisme profite à l'un des partenaires au détriment de l'autre. Le commensalisme définit une symbiose où l'un des partenaires tire profit de son association à l'autre sans lui nuire. Enfin le mutualisme représente une association à bénéfice réciproque. Pour les organismes vivants, le mutualisme présente l'avantage de pouvoir partager des fonctions biologiques spécifiques à chacun. Il devient alors possible pour les deux partenaires de pouvoir se développer ensemble dans un environnement hostile ou peu adapté. Ce type d'association stable est proposé comme modèle pour expliquer l'origine de la mitochondrie au sein des cellules eucaryotes et celle du chloroplaste dans les cellules végétales. En effet, ces deux organites cellulaires possédant leur propre molécule d'ADN, il est probable qu'ils résultent chacun d'une endosymbiose ancestrale. Par exemple, le chloroplaste des végétaux serait l'évolution d'un type de cyanobactérie photosynthétique entrée en symbiose avec un protiste hétérotrophe (Reyes-Prieto et al., 2007).

Chez les végétaux supérieurs, l'acquisition des minéraux à partir du sol est d'une importance majeure et la carence en ces éléments constitue une limite à leur développement. Certains végétaux ont acquis au cours de l'évolution la capacité d'établir des associations symbiotiques avec des micro-organismes du sol dans le but d'améliorer l'acquisition des nutriments. Certaines de ses associations se forment à l'intérieur des cellules de la racine de l'hôte végétal et sont appelées endosymbioses racinaires.

I) Fixation biologique de l'azote moléculaire et symbiose rhizobium-légumineuse

1) Intérêt agronomique et écologique

Constituant entre autres des acides aminés et nucléiques, l'azote (N) est un élément essentiel pour toutes formes de vie. L'atmosphère terrestre est composée majoritairement d'azote sous forme gazeuse ou moléculaire (N₂) non assimilable par les plantes alors qu'il constitue, avec le manque d'eau et de phosphate, une des principales limitations à la croissance des plantes (Cleland and Harpole, 2010). De plus, les formes assimilables de l'azote présentes dans les sols (ammonium, nitrates, nitrites) n'y sont peu ou pas retenues, au contraire d'autres nutriments qui peuvent s'y trouver sous forme de précipités (ex. phosphate). A cause du lessivage des sols et du processus constant de nitrification/dénitrification, les formes assimilables de l'azote doivent être constamment renouvelées. Ce renouvellement se fait naturellement à travers la minéralisation de matières organiques ou l'action de microorganismes fixateurs d'azote moléculaire et de manière artificielle par l'épandage de fertilisants azotés (Dixon and Wheeler, 1986).

Le recours à l'ajout d'engrais azoté a quasiment décuplé entre 1960 et 2000 pour atteindre 88 millions de tonnes par an dans le monde, les projections prévoyant l'usage de 120 millions de tonnes en 2040 (Vance, 2001). Cependant, toutes cultures confondues, il est estimé qu'environ 50 % cet azote épandu n'est pas absorbé mais lessivé, causant de graves problèmes environnementaux tel que l'eutrophisation des milieux aquatiques (Vance, 2001). A cela s'ajoute le fait que la production et l'épandage de ces engrais consomment de grandes quantités d'énergies fossiles aggravant leur impact écologique (Graham and Vance, 2003).

A l'opposé, le renouvellement des formes assimilables de l'azote peut être assuré par certains microorganismes du sol qui réduisent biologiquement l'azote moléculaire. De plus, les plantes de la famille des légumineuses sont capables d'établir des associations symbiotiques avec certains microorganismes, les rhizobia, leur permettant ainsi de pourvoir leurs besoins nutritionnels en azote. On estime à environ 60 millions de tonnes par an l'azote fixé de cette manière par les légumineuses cultivées, c'est à dire presque autant que la quantité d'engrais azotés répandue dans la même période. Aussi appelées couramment plantes protéagineuses, les légumineuses cultivées couvrent environ 30 % de nos besoins alimentaires en azote, principalement sous forme de grain, pour une occupation comprise entre 12 et 15 % des terres agricoles. En plus de leurs qualités nutritionnelles, l'utilisation en rotation de ces cultures pour

fertiliser les sols d'une année sur l'autre permettrait de faire l'économie de 200 à 300 millions de dollars US d'engrais azotés au États-Unis (Graham and Vance, 2003). Au delà de cet aspect agronomique, certaines espèces de plantes non cultivées et d'arbres de la famille des légumineuses sont aussi d'un grand intérêt dans les écosystèmes naturels en permettant la colonisation de milieux pauvres en azote grâce à cette capacité symbiotique. On estime que 5 millions de tonnes d'azote sont fixées par les légumineuses dans les écosystèmes naturels (Graham and Vance, 2003). A cela, il faut ajouter que certaines non-légumineuses peuvent aussi remplir ce rôle d'espèces pionnières grâce à une autre forme de symbiose fixatrice d'azote, brièvement abordée dans cette introduction.

2) Les micro-organismes fixateurs d'azote atmosphérique

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est une propriété de certains procaryotes. Cette fixation se fait grâce à la nitrogénase, une enzyme catalysant plusieurs réactions de réduction dont celle du diazote (N_2) en ammoniac (NH_3), forme de l'azote assimilable par les végétaux. La réduction d'une mole de diazote gazeux en ammoniac par la nitrogénase nécessite 16 moles d'ATP, ce qui en fait une réaction énergétiquement coûteuse. Pour cette raison, certaines espèces de microorganismes effectuent cette fixation d'azote lors d'interactions symbiotiques avec des plantes (Dixon and Wheeler, 1986). Le microorganisme produit alors de l'ammoniac pour le partenaire végétal en échange de molécules carbonées issues de la photosynthèse.

2-1) Les diazotrophes

Les organismes fixateurs capables de fixer le diazote sous leur forme libre sont regroupés sous l'appellation « diazotrophes ». Parmi eux, certains sont des anaérobies stricts comme les archaebactéries des genres *Methanosarcina* et *Methanococcus* et les procaryotes du genre *Clostridium*. Certains procaryotes fixateurs sont des anaérobies facultatifs comme les genres *Klebsiella* et *Erwinia* ou des aérobies stricts comme les membres du genre *Azotobacter*. Enfin les cyanobactéries photosynthétiques des genres *Anabaena* ou *Nostoc* sont aussi capables d'effectuer cette fixation de l'azote au sein de cellules spécialisées appelées hétérocystes (Dixon and Wheeler, 1986).

2-2) Les fixateurs symbiotiques d'azote

Il existe deux types majoritaires de symbioses fixatrices d'azote impliquant un microorganisme et un hôte végétal : la symbiose actinorhizienne et la symbiose rhizobium-légumineuse. Ces deux symbioses ont pour particularité d'aboutir à la formation d'un nouvel organe chez les plantes, le nodule, au sein duquel la bactérie fixe l'azote atmosphérique. Les termes « noduler » et « nodulation » font référence à cette capacité. Il est à noter que les cyanobactéries peuvent aussi établir des associations symbiotiques avec les végétaux. C'est le cas par exemple pour les membres du genre *Anabaena*, symbiotes des fougères d'eau *Azolla sp.* et pour le genre *Nostoc*, symbiote des angiospermes du genre *Gunnera*.

2-2-1) *Frankia*

Les bactéries actinomycètes gram positif du genre *Frankia* sont capables d'établir une symbiose avec plus de 200 angiospermes répartis dans 8 familles (*Betulaceae*, *Casuarinaceae*, *Coriariaceae*, *Datisceae*, *Elaeagnaceae*, *Myricaceae*, *Rhamnaceae*, et *Rosaceae*) et 25 genres. Les plantes hôtes sont toutes des dicotylédones pérennes, arbres ou arbustes, à l'exception du genre *Datisca*, plantes vivaces de la famille des *Datisceae* (Huss-Danell, 1997). Les végétaux capables d'établir ce type de symbiose sont regroupés sous la dénomination de végétaux actinorhiziens. Le prototype de cette symbiose actinorhizienne est représenté par l'association entre *Frankia* et les hôtes *Casuarina glauca* ou *Alnus glutinosa*. Un certain degré de spécificité existe entre l'hôte et le symbiote dans cette symbiose actinorhizienne mais il n'est pas un déterminant majeur pour la caractérisation des espèces de *Frankia*. En effet, une même espèce de bactérie a pu être isolée à partir de nodules formés sur des plantes hôtes issues de différentes familles (Benson and Silvester, 1993).

2-2-2) *Rhizobia*

Certaines bactéries gram négatif de la classe des α - et β -protéobactéries sont capables d'établir des associations symbiotiques avec les plantes de la famille des légumineuses (*Leguminosae* ou *Fabaceae*) constituée de plus de 700 genres (Doyle and Luckow, 2003). Ces bactéries sont appelées rhizobia et il en a été dénombré 12 genres regroupant 44 espèces dont la

Tableau 1. Exemples d'associations entre rhizobia et légumineuses

Rhizobia	Plantes hôtes
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Luzerne (<i>Medicago sp</i>)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	
<i>biovar viciae</i>	Pois (<i>Pisum</i>), Vesce (<i>Vicia</i>)
<i>biovar trifolii</i>	Trèfle (<i>Trifolium</i>)
<i>biovar phaseoli</i>	Haricot (<i>Phaseolus</i>)
<i>Mesohizobium loti</i>	Lotier (<i>Lotus</i>)
<i>Sinohizobium fredii</i>	Soja (<i>Glycine</i>)
<i>Rhizobium sp. NGR234</i>	Large spectre et <i>Parasponia</i> (non légumineuse)
<i>Rhizobium tropicii</i>	Haricot (<i>Phaseolus</i>), Faux Mimosa (<i>Leucaena</i>)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Soja (<i>Glycine</i>)
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania</i>

D'après Dénarié et *al.*, 1992 et Sawada et *al.*, 2003

capacité à noduler a été démontrée (Sawada et al., 2003). Il s'agit des genres *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Devosia*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Blastobacter*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Ensifer*, *Rhizobium* et *allorhizobium*. Contrairement à ce qui est observé dans la symbiose actinorhizienne, ces associations entre l'hôte et le symbiote sont spécifiques et dans certains cas exclusives (**Tableau 1**). Par exemple, la légumineuse *Sesbania rostrata* n'établit cette symbiose qu'avec *Azorhizobium caulinodans*. D'autres légumineuses peuvent entrer en symbiose avec plusieurs espèces de bactéries, comme *Phaseolus vulgaris* (haricot) avec les symbiotes *Rhizobium tropicii*, *R. leguminosarum biovar. phaseoli* et *R. etli*. La réciproque est aussi vraie avec par exemple le cas de *R. leguminosarum biovar. viciae* qui peut noduler la vesce et le pois (*Vicia sativa* et *Pisum sativum*) (Doyle, 1998). Seules exceptions à cette règle, les souches de rhizobium NGR234 et *R. fredii* USDA257 possèdent un spectre d'hôte étendu (Pueppke and Broughton, 1999). NGR234 est en effet capable de noduler 112 genres de légumineuses ainsi que la seule non-légumineuse *Parasponia andersonii*. Quant à *R. fredii* USDA257, cette souche bactérienne peut noduler 79 genres de légumineuses (Pueppke and Broughton, 1999).

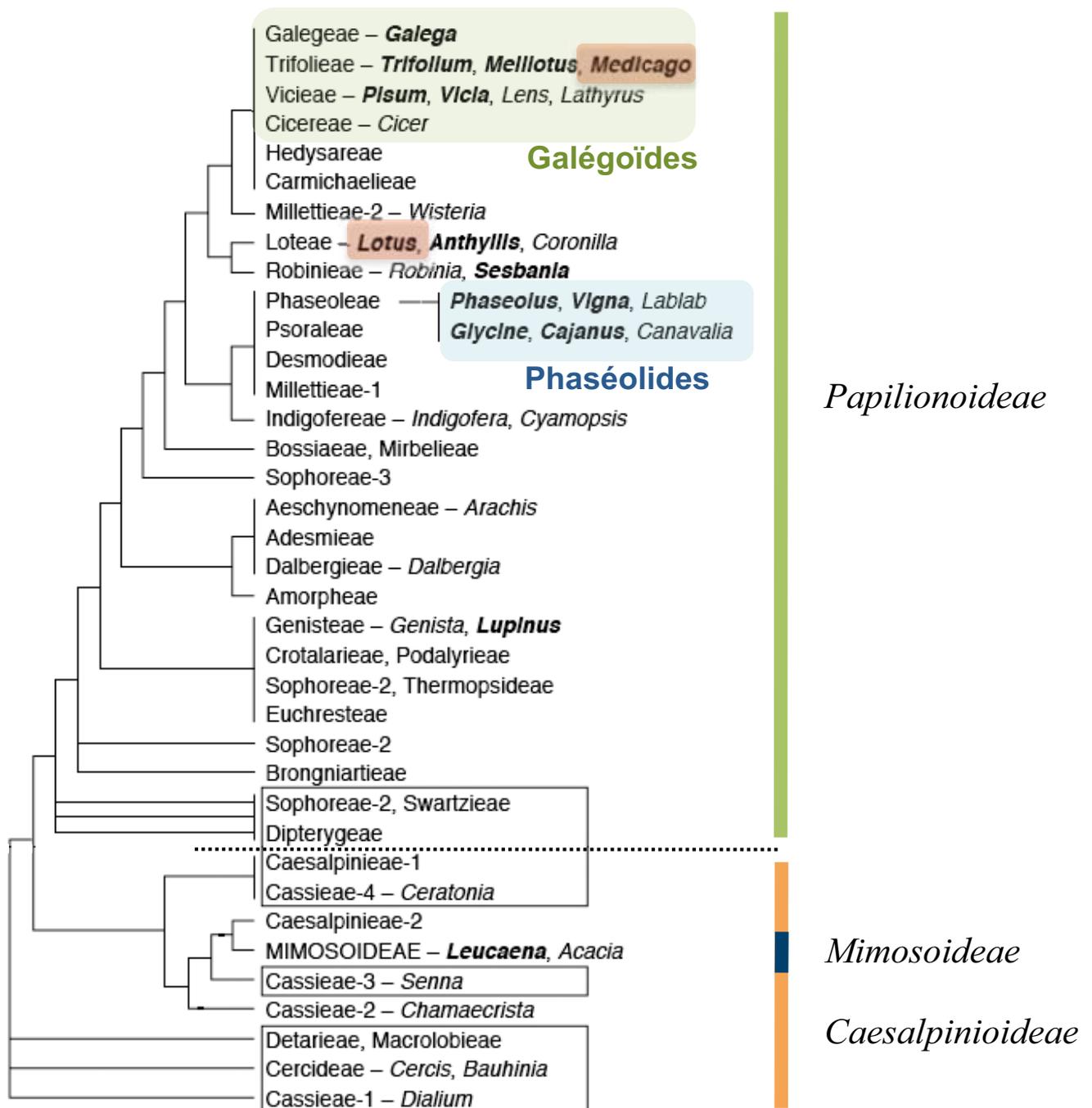


Figure 1. Phylogénie des *Leguminosae* d'après l'analyse des séquences du gène chloroplastique *rbcL*

Les trois sous-familles *Papilionoideae*, *Caesalpinioideae* et *Mimosoideae* sont représentées par les barres verticales de couleur. Les tribus et genres encadrés ne forment pas de nodules. Les clades des Galégoïdes et des Phaséolides, comprenant la majorité des plantes cultivées, sont marqués d'un rectangle coloré. Les deux genres dont sont issues légumineuses modèles sont encadrés en rouge.

D'après Doyle et *al.* 1998

3) La symbiose rhizobium-légumineuse

3-1) Les légumineuses modèles

La famille *Leguminosae* est classée en trois sous-familles, les *Caesalpinioideae*, les *Mimosoideae* et les *Papilionoideae* (**Figure 1**). Les *Papilionoideae* constituent la sous-famille la plus grande avec 476 genres et environ 14000 espèces (Doyle and Luckow, 2003). A l'exception de l'arachide, les légumineuses d'intérêt agronomique (ex. soja, luzerne, pois, haricot) appartiennent aux clades des Galégoïdes et Phaséolides, de la sous-famille des *Papilionoideae* (Choi et al., 2004) (**Figure 1**). Afin de comprendre les mécanismes régissant la symbiose rhizobium-légumineuse, deux légumineuses servent de modèle pour la communauté scientifique. Les plantes *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus* ont été choisies pour la petite taille de leurs génomes (entre 450 et 500 Mb), leurs caractères diploïdes et autogames, et leur faible encombrement (Journet et al., 2001a; Stougaard, 2001). Il est par ailleurs possible de transformer *M. truncatula* par *A. rhizogenes* et *A. tumefaciens* (Boisson-Dernier et al., 2001; Chabaud et al., 2003). De plus, ces plantes modèles présentent des régions synténiques (macro et micro) entre elles et avec les légumineuses d'intérêt agronomique (Choi et al., 2004; Zhu et al., 2005) (**Figure 2**). Ainsi, le clonage des gènes d'intérêts chez les plantes cultivées est facilité une fois ces derniers identifiés chez les plantes modèles.

3-2) Le couple modèle *Medicago truncatula* – *Sinorhizobium meliloti*

La légumineuse modèle *Medicago truncatula*, choisie par le Laboratoire des Interactions Plantes Microorganismes de Toulouse, est apparentée à la luzerne fourragère *Medicago sativa* et fait partie du clade des Galégoïdes. Tout comme les genres *Trigonella* et *Melilotus*, elle est nodulée par la bactérie *Sinorhizobium meliloti* (Sawada et al., 2003). A l'instar d'autres plantes modèles comme *Oryza sativa* ou *Arabidopsis thaliana*, de nombreuses ressources génomiques, bioinformatiques et biologiques sont aujourd'hui disponibles. Sa carte génétique, établie en 2002, est composée de huit groupes de liaisons ou chromosomes (Thoquet et al., 2002) et son génome est séquencé à près de 75 % (F. Debellé, communication personnelle). La communauté de chercheurs utilisant *M. truncatula* a généré de nombreuses ressources, dont des banques d'ESTs et

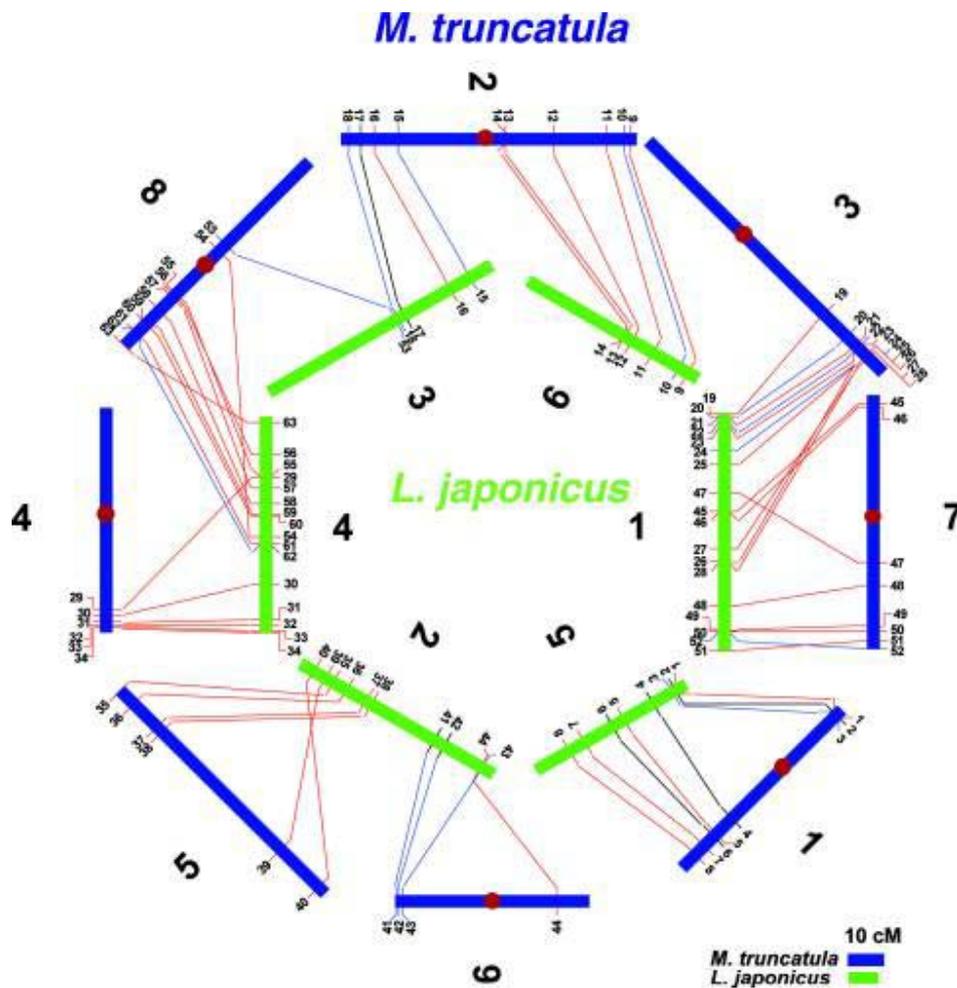


Figure 2. Relation de macrosyténie entre les génomes de *M. truncatula* (2n=16) et de *L. japonicus* (2n=12)

Soixante-trois BACs (Bacterial Artificial Chromosome) séquencés de chaque espèce ont été alignés. Le nombre de gènes conservés par paire de BACs est indiqué par un code couleur. Noir : Deux ; Bleu : de trois à quatre ; Rouge : cinq ou plus.

D'après Choi et *al.*, 2004

le profil d'expression de ses gènes déterminé par micro-array (Benedito et al., 2008; He et al., 2009). Diverses populations de mutants ont été générées par mutagenèse chimique (Le Signor et al., 2009), physique (Rogers et al., 2009) ou biologiques par insertion d'éléments transposables (d'Erfurth et al., 2003; Tadege et al., 2008), facilitant ainsi la découverte de gènes impliqués dans les processus symbiotiques par génétique directe ou inverse. Enfin, la séquence complète du génome de son symbiote *S. meliloti* est disponible (Barnett et al., 2001; Galibert et al., 2001) ainsi que de nombreux mutants bactériens déficients dans l'établissement de la nodulation ou dans la fixation d'azote.

3-3) Le nodule : de l'infection à la fixation de l'azote

Le nodule est un nouvel organe produit par la plante hôte au sein duquel les bactéries, différenciées en bactéroïdes, fixent l'azote atmosphérique. Pour permettre une activité optimale de la nitrogénase, enzyme irréversiblement inactivé par l'oxygène, la plante maintient les nodules en condition de micro-oxie grâce au parenchyme nodulaire pendant que la leghémoglobine transporte et tamponne la concentration d'oxygène indispensable à la respiration (Ott et al., 2005). Les nodules sont majoritairement racinaires comme c'est le cas chez les deux légumineuses modèles *M. truncatula* et *L. japonicus* mais peuvent parfois être caulinaires comme dans le cas de l'interaction *Sesbania rostrata* - *Azorhizobium caulinodans* (Fernandez-Lopez et al., 1998). Une illustration de ces différents types de nodules est présentée **Figure 3**.

La formation d'un nodule fonctionnel peut être divisée en trois étapes : (i) l'infection, (ii) l'organogénèse, (iii) la fixation de l'azote. Les Phaséolides, ou légumineuses tropicales, forment des nodules déterminés. C'est aussi le cas pour *L. japonicus* avec son symbiote *Mesorhizobium loti* bien que non classé parmi les Phaséolides. L'organogénèse de ce type de nodule ne sera pas abordée. *M. truncatula* et les galégoïdes, légumineuses de milieux tempérés, forment sur leurs racines des nodules indéterminés. Les grandes étapes de formation de ce type de nodule sont détaillées ci-dessous et représentées **Figure 4**.

3-3-1) L'infection

Les premières étapes d'infection chez les deux légumineuses modèles sont identiques et passent par une invagination des poils racinaires qui est détaillée dans cette section. Pour mention,

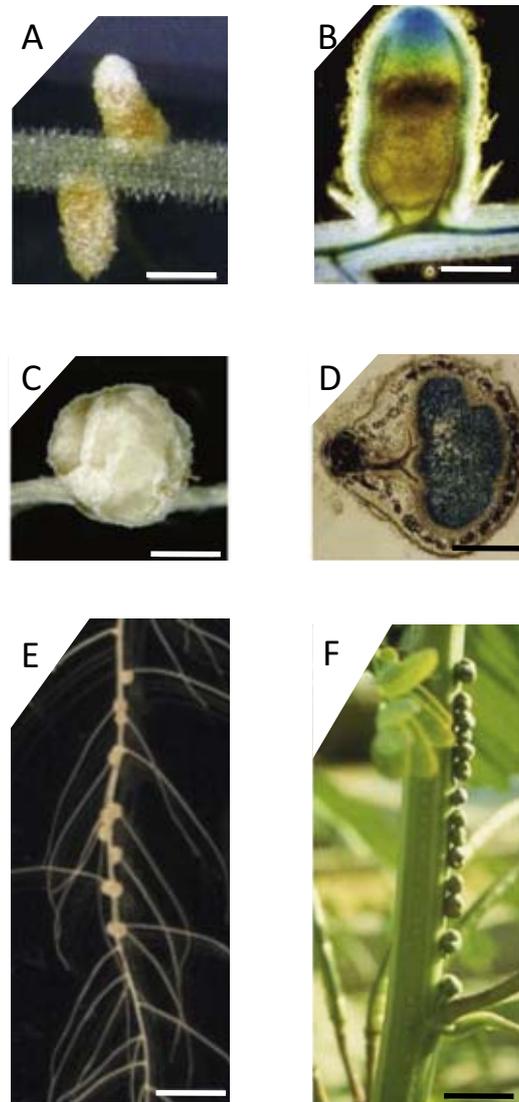


Figure 3. Variations morphologiques des nodules dans l'interaction rhizobium-légumineuse

(**A, B**) *M. sativa* / *S. meliloti* ; (**A**) Nodules indéterminés entier (**B**) Coupe transversale. La coloration bleue est due à l'expression d'une fusion promoteur::GUS. (**C**) *Glycine max* / *S. fredii* ; Nodule déterminé. (**D**) *Lotus japonicus* / *M. loti* ; Coupe transversale de nodule déterminé. Les bactéries expriment le transgène *lacZ* et sont colorées en bleu. (**E, F**) *Sesbania rostrata* / *A. caulinodans* (**E**) Nodules déterminés racinaires (**F**) Nodules caulinaires.

Echelles : (**A, C**) 1 mm (**B, D**) 500 μ m (**E, F**) 1 cm

D'après Masson-Boivin et al., 2009 ; Goormachtig et al., 2004.

il existe aussi un mécanisme d'infection par « crack entry », observé par exemple chez *S. rostrata* dans la formation des nodules caulinaires et non détaillé. Dans ce dernier cas, les bactéries profitent de fissures formées lors de l'émergence des racines latérales et colonisent les espaces intercellulaires en formant des poches d'infection.

Dans le cas de l'infection chez les légumineuses modèles, les rhizobia contenues dans la rhizosphère sont attirées de manière non spécifique par chimiotactisme grâce à de nombreux composés exsudés par les plantes dans leur rhizosphère. Cette attraction n'est pas spécifique d'un couple de partenaires donné (Gaworzewska and Carlile, 1982; Kape et al., 1991). Il s'ensuit l'attachement des bactéries à la surface des poils absorbants. Il a été proposé que des lectines produites par les plantes à la surface des poils absorbants sont responsables de cet attachement en liant des polysaccharides de surface des rhizobia (Laus et al., 2006) et des mutants bactériens incapables de produire certains types de glucanes ne peuvent pas s'attacher aux poils absorbants (Dickstein et al., 1988). Enfin, les fibrilles des rhizobia et des protéines de type adhésines/ Ca^{2+} dépendantes (ricadhésines) qu'elles produisent seraient aussi impliquées dans cet attachement (Smit et al., 1987). A la suite de l'attachement des bactéries, une déformation des poils absorbants est observée (**Figure 4**).

Chez *M. sativa*, les premières déformations des poils absorbants apparaissent entre 12h et 24h après inoculation avec la bactérie (Wais et al., 2002). Le type de déformation des poils absorbants dépend du stade de leur développement. Ainsi, quatre stades de développement du poil absorbants ont été décrits : le bulbe, le poil en croissance active, le poil en fin de croissance et le poil mature (Esseling and Emons, 2004; Patriarca et al., 2004). Les déformations, aussi appelées « Had » pour « root hair deformation » sont classées en plusieurs types : (i) le gonflement ou « Has » pour « root hair swelling », (ii) le branchement ou « Hab » pour « root hair branching », (iii) la courbure en crosse de berger ou « Hac » pour « root hair curling ». Seuls les poils entrés dans le début de leur phase de terminaison de croissance sont capables de produire une courbure en crosse de berger (Hac) pouvant conduire ultérieurement à la formation d'un nodule. Cette restriction se traduit par le concept de zone de susceptibilité racinaire (Bhuvaneshwari et al., 1981) (**Figure 5**).

La courbure en crosse de berger (Hac) piège les bactéries qui forment alors une micro colonie. Dans le cas d'une infection réussie, la paroi pecto-cellulosique du poil absorbant à l'intérieur de la courbure est dégradée. Cette dégradation se ferait en deux temps, des enzymes hydrolytiques de l'hôte intervenant avant des enzymes produites par les rhizobia (van Spronsen et

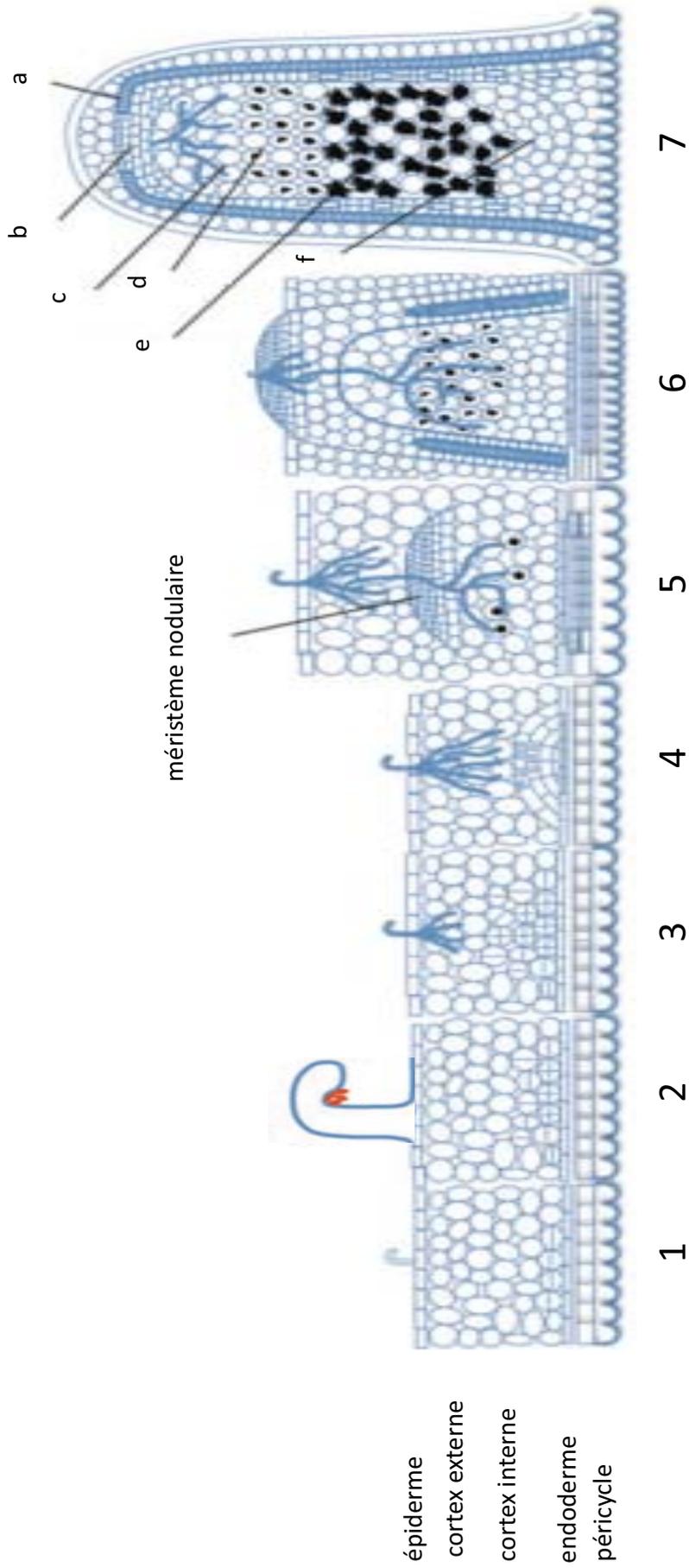


Figure 4. Etapes de formation d'un nodule indéterminé

(1) Chimiotactisme et attachement des rhizobia sur le poil absorbant. (2) Formation de la crosse de berger et divisions coordonnées des cellules du cortex interne (3) Progression des cordons d'infection dans le cortex externe (4) Progression des cordons d'infection dans le cortex interne (5) Invasion des rhizobia dans les cellules du primordium nodulaire et formation du méristème et (6) maturation. (7) Nodule mature fixateur d'azote avec en (a) Vasculature (b) Méristème ou Zone I, (c) Zone II d'infection, (d) Interzone II-III, (e) Zone III de fixation, (f) Zone IV de senescence
 D'après Fergusson et al., 2010.

al., 1994). En parallèle, la membrane plasmique du poil absorbant s'invagine et une nouvelle paroi est formée autour de cette invagination produisant une structure tubulaire appelée le cordon d'infection (Gage, 2004) (**Figure 6**). Ce processus implique la synthèse *de novo* de membrane plasmique par fusion de vésicules issues du golgi et la synthèse de paroi (Patriarca et al., 2004). Il a été postulé qu'à cet égard, la croissance du cordon d'infection, bien qu'inversée, partage certaines propriétés avec l'élongation des tubes polliniques (Gualtieri and Bisseling, 2000).

La croissance du cordon d'infection est un processus discontinu dirigé par la plante, la colonisation des nouvelles portions de cordon formées se faisant alors par l'action conjuguée de la division et du mouvement des bactéries (Gage, 2002; Fournier et al., 2008). Une fois atteinte la base de l'épiderme, la progression des cordons d'infection dans les tissus internes de la racine est guidée par la formation de ponts cytoplasmiques de pré-infection formés dans les cellules du cortex sur le point d'être traversées (van Brussel et al., 1992; Timmers et al., 1999) (**Figure 6**).

3-3-2) *L'organogénèse nodulaire du nodule indéterminé*

En parallèle de l'évènement d'infection et de la progression du cordon dans le poil absorbant, les cellules corticales différenciées situées sous le poil en cours d'infection montrent une réactivation de leur cycle cellulaire (Brewin, 1991). Chez *M. sativa*, les premières divisions des cellules du cortex internes apparaissent entre 18h et 24h après inoculation avec les bactéries. Cela mène à la formation d'un primordium nodulaire ou pré-nodule. Chez *Medicago sp.*, une distinction est faite entre le primordium initial et le primordium nodulaire. Le primordium initial est originaire de divisions des cellules du cortex interne. Le primordium nodulaire englobe le primordium initial et les cellules du cortex moyen et externe réactivées dans leur cycle cellulaire (Timmers et al., 1999). Les cordons d'infection atteignent en premier les cellules en division du cortex interne pendant que de manière croisée, les cellules du cortex moyen forment le méristème nodulaire (**Figure 4**). La formation du méristème nodulaire est indépendante des phénomènes d'infection, comme l'emploi de mutants bactériens affectés dans l'infection a pu le montrer (Leigh et al., 1985; Niehaus and Becker, 1998). Cela amène à supposer que les premières divisions du cortex interne (ou primordium initial) forment un réceptacle pour les premiers cordons d'infections pendant la formation du méristème nodulaire. Deux phénomènes sont donc à l'origine du nodule indéterminé : (i) l'infection dirigée vers le cortex racinaire et (ii) le développement centrifuge du méristème, poussant le nodule vers l'extérieur de la racine (Timmers et al., 1999).

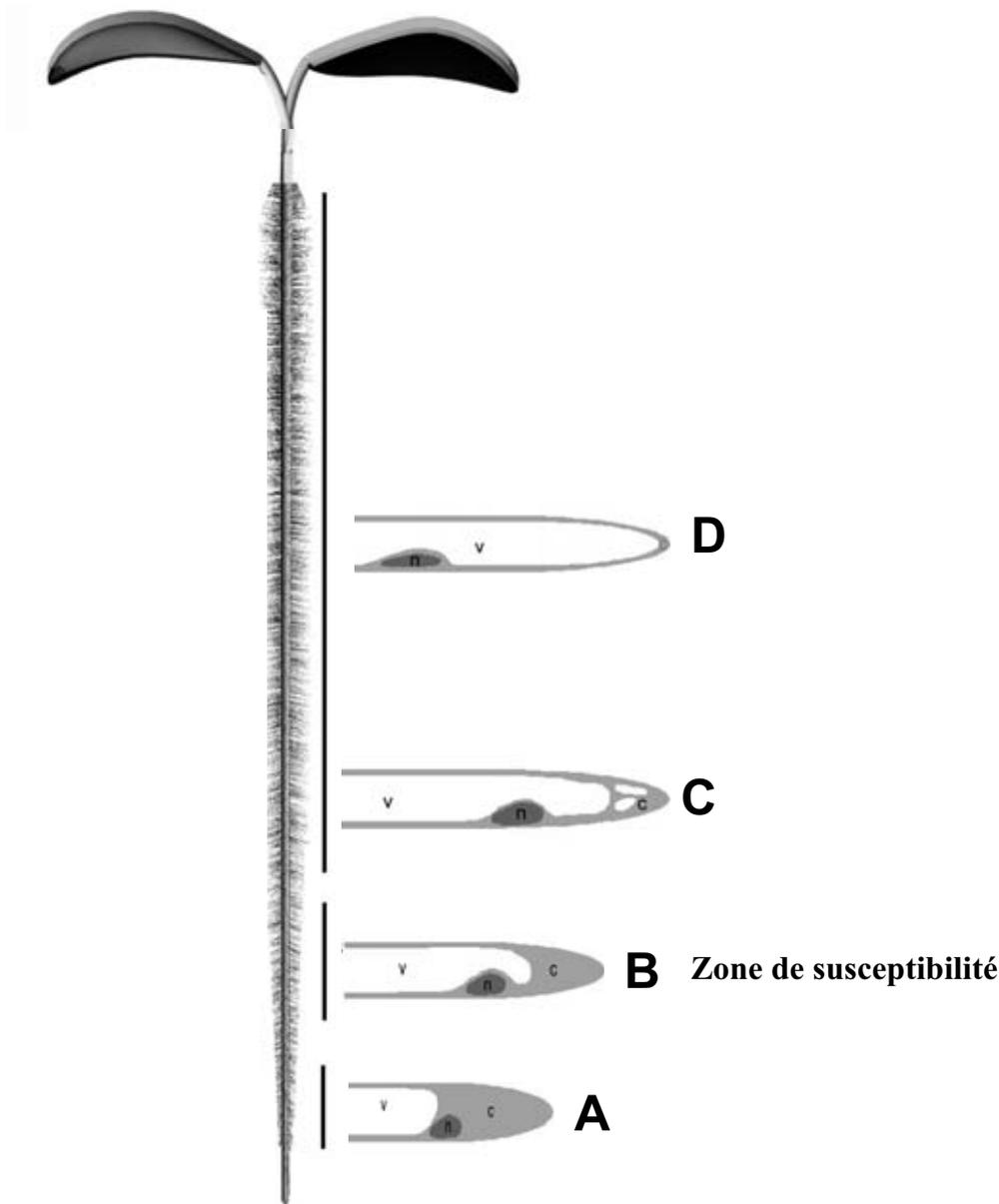


Figure 5. Zone de susceptibilité racinaire en liaison avec architecture cellulaire des poils absorbant

(A) Poil absorbant en croissance active. La région sub-apicale du poil est remplie par le cytoplasme (c) et le noyau (n) est à la base de cette zone. Le reste de la cellule est occupé par la vacuole (v) et le cytoplasme cortical. (B) Poil absorbant en début de terminaison de croissance. La vacuole englobe le noyau. La zone cytoplasmique sub-apicale est réduite. (C) Poil absorbant en phase terminale de croissance. La vacuole occupe presque tout l'espace sub-apical. (D) Poil absorbant mature. La vacuole occupe tout l'espace et reste entourée par une fine couche de cytoplasme. Les poils absorbants les plus susceptibles d'être infectés sont les poils absorbant en début de terminaison de croissance. Ils définissent la zone de susceptibilité.

Adapté de Gage et *al.*, 2004 et Esseling et *al.*, 2004.

Le méristème des nodules indéterminés reste actif pendant toute la vie du nodule. Cela confère à ce dernier une forme allongée et cylindrique, contrairement au nodule déterminé, pour lequel la formation d'un méristème non persistant lui donne une forme sphérique (**Figure 3**). Le nodule indéterminé est divisé en quatre zones, établies d'après la structure des bactéries qu'elles renferment (Vasse et al., 1990) (**Figure 4**). La zone I est constituée du méristème nodulaire et ne contient pas de bactéries. Dans la zone II, zone d'infection des cellules par les bactéries, les cordons d'infection ramifiés libèrent les bactéries dans les cellules végétales. Les bactéries libérées dans le cytoplasme des cellules de l'hôte se différencient en bactéroïdes et sont entourées d'une membrane péri-bactéroïdienne appelée membrane du symbiosome (Brewin, 1991). La membrane du symbiosome provient de plusieurs sources : du cordon d'infection, du réticulum endoplasmique, et de la synthèse *de novo* de membrane (Roth and Stacey, 1989) (**Figure 6**). La zone de transition II-III marque les cellules où les bactéries se différencient en bactéroïdes fixateurs d'azote. La zone III comprend les cellules contenant les bactéroïdes fixateurs au sein des symbiosomes, puis succède la zone IV de sénescence du nodule (Vasse et al., 1990).

4) La symbiose endomycorhizienne à arbuscules

En plus de la symbiose fixatrice d'azote, les deux légumineuses modèles sont capables d'établir une symbiose endomycorhizienne à arbuscules (AM). Nous verrons plus loin que l'établissement de cette symbiose partage certains déterminants moléculaires avec la symbiose rhizobium-légumineuse.

La symbiose AM, aussi appelée mycorrhization est une endosymbiose racinaire s'établissant entre les plantes et les champignons appartenant au phylum des Gloméromycètes. La découverte de plantes mycorrhizées fossiles a permis de dater l'apparition de cette symbiose à plus de 400 millions d'années, au début du Dévonien (Remy et al., 1994). Il est estimé qu'entre 70 et 90 % des espèces de plantes terrestres sont capables d'établir ce type d'association symbiotique, incluant des angiospermes, des gymnospermes, des ptéridophytes et quelques bryophytes. Dans le cas des bryophytes, les termes mycorrhizoïdes ou mycothalles sont plutôt utilisés, ces plantes ne possédant pas à proprement parler de racines (Hata et al., 2010). La mycorrhization constitue la plus ancienne et la plus répandue des endosymbioses racinaires et aurait accompagné les plantes vasculaires dans la colonisation terrestre (Harrison, 2005; Hata et al., 2010). Si les légumineuses

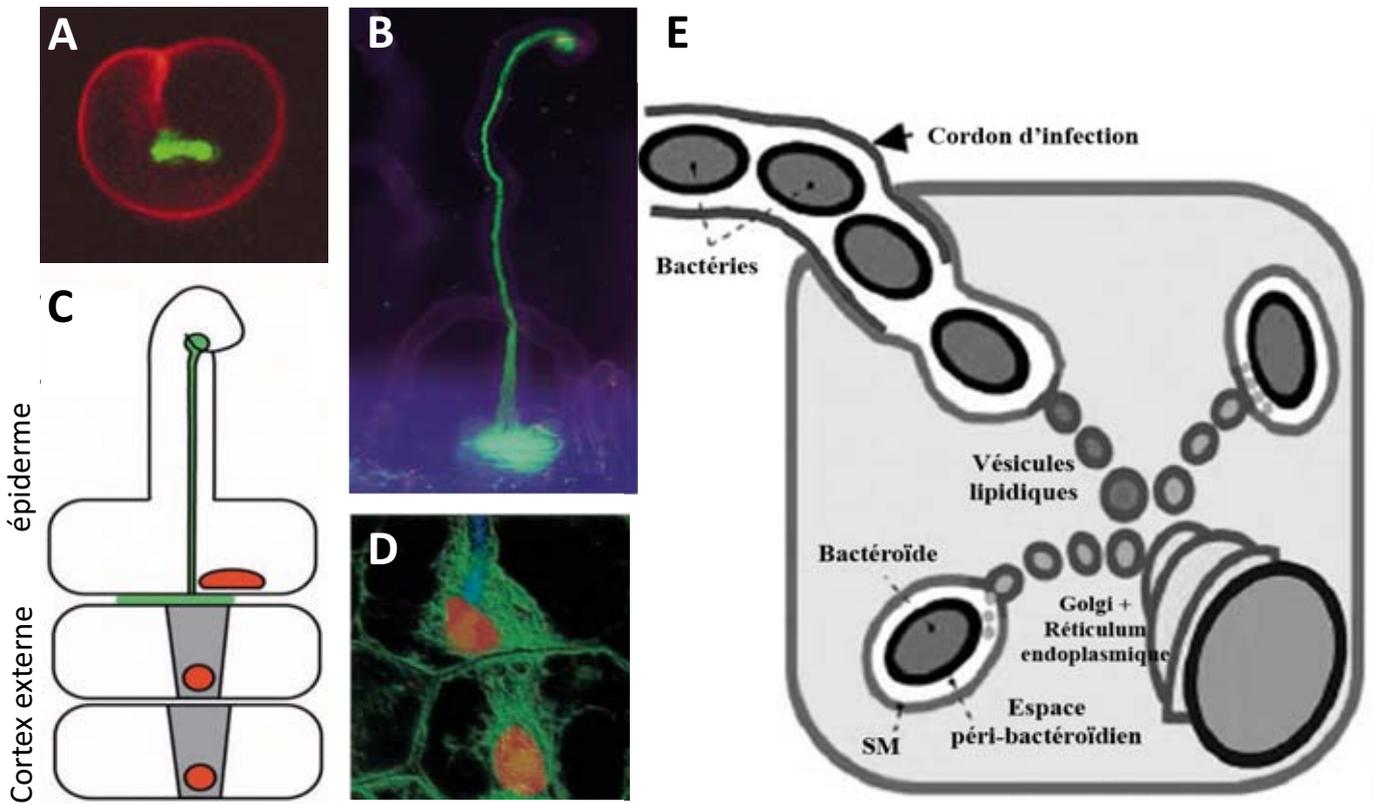


Figure 6. Détails des évènements d'infection durant la formation d'un nodule

(A) Courbure complète en croise de berger emprisonnant une microcolonie bactérienne exprimant la GFP. (B) Cordon d'infection atteignant la base du poil absorbant. (C) Schéma de la formation des structures de pré-infection (grisés) dans les cellules du cortex. (D) Réorganisation du cytosquelette des cellules du cortex externe et formation des structures de pré-infection. Le cordon d'infection (bleu) suit le cordon de pré-infection formé par le cytosquelette (vert). (E) Schéma de l'endocytose des bactéries dans les cellules en cours d'infection d'un nodule mature (Zone II). SM : symbiosome. (F) Formation du symbiosome autour d'un bactéroïde par fusion de vésicules issues du golgi de la cellule infectée.

(A, B, D) Microscopie confocale.

D'après Gage 2004 ; Timmers et *al.*, 1999 ; Patriarca et *al.*, 2004 ; Geurts et *al.*, 2005

peuvent établir cette symbiose, les Brassicacées dont la plante modèle *Arabidopsis thaliana* n'en sont en revanche pas capables.

Cette interaction débute par la perception de strigolactones, molécules végétales exudées par les racines. Ces strigolactones sont capables d'induire un branchement des hyphes du champignon, ce qui aurait pour fonction de faciliter le contact entre les hyphes et la racine (Besserer et al., 2006). Une fois au contact de la racine, le champignon forme des hyphopodia et pénètre dans l'épiderme et les tissus internes. L'hôte, de manière similaire à ce qui est observé pour l'infection bactérienne, développe des structures de pré-infection (Genre et al., 2005; Genre et al., 2008). Enfin, le champignon colonise les cellules du cortex interne de la plante au sein desquelles il développe une structure en forme d'arbuscule, augmentant ainsi la surface d'échange entre les partenaires. Cette structure reste entourée par la membrane plasmique de la cellule végétale différenciée en symbiosome (**Figure 7**).

L'hôte végétal ainsi mycorrhizé est connecté au réseau dense et étendu formé par les hyphes fongiques dans le sol. Ce réseau peut atteindre jusqu'à cent mètres d'hyphes par centimètre cube de sol, augmentant sa capacité à capter l'eau et les nutriments. Les plantes mycorrhizées montrent une résistance accrue au stress hydrique et sont capables de se développer sur des sols pauvres en nutriments, et notamment en phosphate (Parniske, 2008). A cela il faut ajouter que les plantes mycorrhizées présentent aussi une résistance systémique accrue aux pathogènes (Liu et al., 2007). En échange des nutriments apportés, la plante peut fournir au champignon jusqu'à 20% du produit de sa photosynthèse (Harrison, 2005).

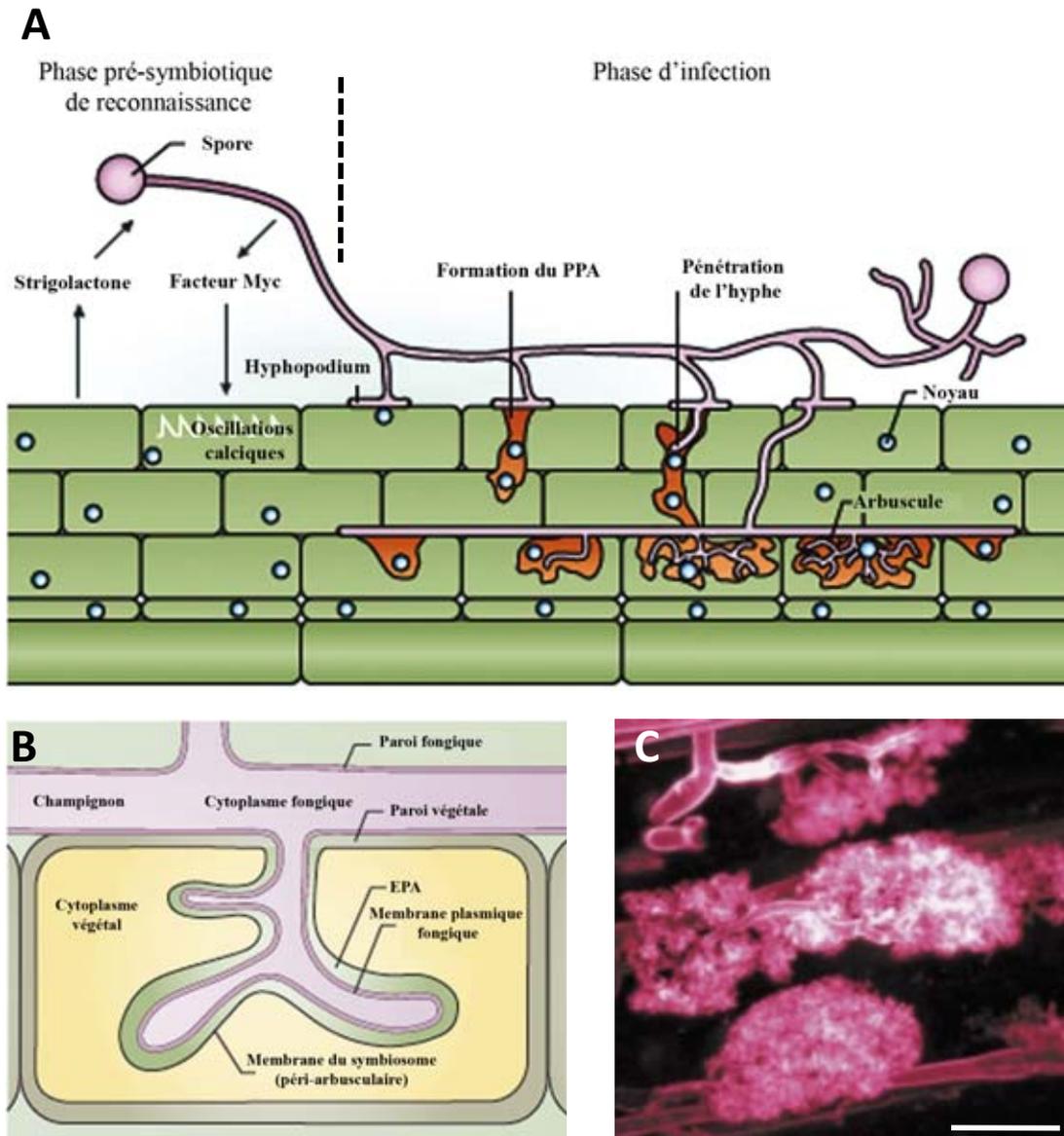


Figure 7. Établissement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules

(A) Phase pré-symbiotique de reconnaissance et phase d'infection. Les strigolactones exsudés par l'hôte sont reconnus par le champignon et induisent un branchement des hyphes. Le champignon produit des facteurs diffusibles (Myc) perçus par l'hôte. Le champignon pénètre grâce à la formation d'hyphopodia, aidés par les structures de pré-pénétration du végétal (PPA). L'hyphe rejoint les cellules du cortex au sein desquelles il forme des arbuscules. (B) Schéma d'un arbuscule entouré par la membrane plasmique végétale différenciée en symbiosome. EPA : Espace Péri-Arbusculaire. (C) Arbuscules formés par *Glomus coronatum* dans les cellules corticales d'une racine de poireau (*Allium porrum*) et révélés par microscopie confocale. Échelle : 25 μ m. D'après Parniske 2008 et Smith et al., 2002

II) Les bases moléculaires de l'interaction rhizobium-légumineuse

Dans les étapes précoces de la symbiose rhizobium-légumineuse, d'importantes modifications ont lieu sur les racines des plantes hôtes, à la surface (Had) comme dans les tissus corticaux (primordium nodulaire). Ces phénomènes requièrent une coordination de l'expression de nombreux gènes chez les deux partenaires et la spécificité d'interactions entre l'hôte et le symbiote est déjà évidente dès ces premières étapes (Long, 1989; Denarie et al., 1996). Deux questions se posent alors : (i) Qu'est-ce qui provoque ces changements observés chez l'hôte? (ii) Comment expliquer la spécificité d'interaction de cette symbiose ?

1) Les flavonoïdes

Parmi les molécules exsudées par les racines des légumineuses, les flavonoïdes participent au dialogue moléculaire qui s'établit entre l'hôte et les bactéries. Les flavonoïdes sont des molécules issues de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Leur synthèse a lieu dans la plupart des organes des plantes et ont des rôles variés comme par exemple la pigmentation des fleurs (anthocyanines), la défense en réponse aux pathogènes (phytoalexines), la germination du tube pollinique, ou la signalisation symbiotique. Molécules composées de trois cycles aromatiques, il en a été découvert plus de 4000. Elles sont classées suivant l'arrangement des cercles aromatiques qui les composent et des substitutions qu'ils portent. Les principales classes de flavonoïdes sont les Chalcone, Flavanone, Flava-3-ol, Flavone, Isoflavone, Flavonol et Anthocyanine (Taylor and Grotewold, 2005).

Dans l'interaction rhizobium-légumineuse, les flavonoïdes induisent l'expression des gènes bactériens *nod*, nécessaires à la production de molécules symbiotiques essentielles à la nodulation : les facteurs Nod (NFs). Il a été démontré que la lutéoline, une flavone, est l'inducteur le plus efficace de la transcription des gènes *nod* chez *S. meliloti* parmi 18 flavonoïdes testés. Une activité inhibitrice pour la transcription des gènes *nod* a été démontrée pour l'umbelliférone de la classe des coumarines chez la même bactérie (Peters et al., 1986; Peters and Long, 1988). La preuve définitive de l'implication des flavonoïdes dans la nodulation a été apportée par des expériences de sous-régulation des gènes isoflavone synthase (IFS) ou chalcone synthase (CHS), nécessaires à la biosynthèse des flavonoïdes chez *M. truncatula* et chez *Glycine max*. Ces plantes dérégulées dans l'expression de ces gènes par ARN interférent ne produisent plus de flavonoïdes

inducteurs des rhizobia utilisées et montrent un phénotype altéré de nodulation (Subramanian et al., 2006; Wasson et al., 2006). Mais de manière inattendue, les étapes précoces d'infection n'ont pas montré de différence entre plantes contrôle et plantes RNAi. Cela suggère que les flavonoïdes ont une action positive sur les rhizobia plus importante pendant ou après l'infection que pour l'initiation l'infection (Subramanian et al., 2007).

Les protéines NodD, présentes de manière constitutive chez les rhizobia, sont des facteurs de transcription de la famille LysR indispensables à l'activation des gènes *nod* par les flavonoïdes (Mulligan and Long, 1985; Hong et al., 1987; Fisher et al., 1988). Les gènes *nod* sont organisés en opéron sous le contrôle du *cis*-élément *nodbox* et sont par conséquent régulés de manière coordonnée (Schultze and Kondorosi, 1998). L'induction des gènes *nod* chez les rhizobia varie selon la combinaison de flavonoïde inducteur et de variant naturel de NodD mis en présence (Zaat et al., 1989). Plus récemment, il a été proposé un mécanisme pour l'activation de NodD par les flavonoïdes. Ces derniers provoqueraient un changement de conformation à l'endroit de liaison des protéines NodD sur l'ADN, permettant alors l'activation de la transcription des gènes *nod* (Chen et al., 2005).

La reconnaissance spécifique entre les protéines NodD d'une espèce de rhizobia et leur flavonoïde activateur constitue donc le premier niveau de spécificité dans la symbiose rhizobium-légumineuse.

2) Les facteurs Nods

Les facteurs Nod (NFs) sont des molécules symbiotiques de nature lipo-chitooligosaccharidiques produites par les rhizobia (Lerouge et al., 1990). Ceux produits par *S. meliloti* consistent en un squelette oligomérique de chitine, constitué de quatre ou cinq résidus N-acetylglucosamines (GlcNAc) liés en $\beta(1-4)$ (**Figure 8**). Une chaîne d'acide gras polyinsaturée (majoritairement un C16 :2) est greffée par N-acylation sur l'atome d'azote du résidu glucosamine situé à l'extrémité non réductrice du squelette de chitine. Sur l'extrémité non réductrice, le résidu glucosamine est aussi O-acétylé en C6 tandis qu'à l'extrémité réductrice, il est O-sulfaté en C6. Chez les autres espèces de rhizobia, les NFs sont tous des lipo-chitooligosaccharides, principalement des tétramères et des pentamères dont les substitutions portées par le sucres réducteur et non réducteur varient selon les espèces de rhizobia étudiées (Denarie et al., 1996).

Les gènes *nod* bactériens codent pour des enzymes de la voie de biosynthèse des NFs et ils peuvent être classés en deux groupes selon qu'ils sont communs à toutes les rhizobia ou spécifiques d'une espèce donnée (**Tableau 2**) (Denarie et al., 1996). Les gènes *nodA*, *B*, *C*, aussi appelés gènes structuraux sont communs à toutes les rhizobia. Le gène *nodC* code une β -(1-4)-N-acetyl-D-glucosaminyl transférase dont le rôle est de former le tétramère ou le pentamère de chitine à partir du précurseur UDP-GlcNAc. Le sucre terminal non réducteur de l'oligomère de chitine est ensuite N-dé-acétylé par le produit du gène *nodB* et acylé à la même position par l'activité de NodA. Le produit de ces trois enzymes est une molécule lipo-chitoooligosaccharidique (**Figure 8**). Selon les souches de rhizobia, plusieurs décorations sont ajoutées par les gènes *nod* non communs. Dans le cas de *S. meliloti*, les gènes *nodL*, *nodE*, *nodF*, *nodP*, *nodQ* et *nodH* sont responsables des substitutions trouvées sur ses NFs. Une acétyl transférase, codée par le gène *nodL*, contrôle l'ajout du groupement acétyle à l'extrémité non réductrice du lipo-chitoooligosaccharide (Spaink et al., 1991). *nodE* et *nodF* codent une protéine de transport des acides gras et une β -kétocoacyl synthase respectivement, qui sont impliquées dans la biosynthèse de l'acide gras palmitoléique insaturé (C16:2). Leur absence chez les mutants bactériens amène à greffer un acide vaccénique (C18:1) sur le sucre non réducteur en remplacement de l'acide palmitoléique. Après production de l'intermédiaire réactionnel donneur de groupement sulfate par l'action des enzymes NodP et NodQ, la sulfotransférase NodH ajoute le groupement O-sulfate sur le sucre réducteur (Denarie et al., 1996) (**Figure 8**).

Les NFs sont des molécules essentielles à la nodulation et les rhizobia mutées pour les gènes *nodA*, *B*, *C* ne déclenchent plus aucune réponse chez les plantes inoculées (Denarie et al., 1992). De plus, les NFs jouent un rôle déterminant dans la spécificité d'hôte de la symbiose rhizobium-légumineuse. Par exemple, l'insertion des gènes *nod* de *S. meliloti* dans *Rhizobium tropicii* lui permet de produire un mélange de NFs parmi lesquels certains possèdent des caractéristiques propres aux NFs de *S. meliloti*. Cette bactérie modifiée peut alors former des nodules sur *Medicago sativa*, plante initialement non hôte pour *R. tropicii* (Roche et al., 1996). Le second exemple de l'importance des NFs dans la spécificité d'hôte est apporté par l'étude du spectre d'hôte du mutant *nodH* de *S. meliloti*. Le mutant *nodH* de *S. meliloti* qui produit des NFs non sulfatés perd sa capacité à induire la nodulation chez *Medicago sp.* Cette même bactérie mutante acquiert en revanche la capacité de noduler *Vicia sativa*, initialement non hôte pour *S. meliloti*. La seule sulfatation des NFs peut donc radicalement modifier le spectre d'hôte de *S. meliloti* (Roche et al., 1991).

Tableau 2. Fonction biochimiques des produits des gènes *nod* impliqués dans la synthèse des facteurs Nod

Gène <i>nod</i>	Fonction	Rhizobia
Gènes communs		
<i>Régulation de l'expression des gènes nod</i>		
<i>nodD</i>	Régulateur de type Lys-R	-
<i>Synthèse du squelette chito-oligosaccharidique</i>		
<i>nodB</i>	De-N-acetylase	-
<i>nodC</i>	GlcNAc transférase	-
<i>N-substitution coté non-réducteur</i>		
<i>nodA</i>	N-acyltransférase	-
<i>Secrétion des facteurs Nod</i>		
<i>nodI</i>	ATP-binding protein	-
<i>nodJ</i>	Protéine membranaire	-
Gènes spécifiques		
<i>O-substitution coté non-réducteur</i>		
<i>nodL</i>	Acetyl transférase	<i>S. meliloti</i>
<i>nodU</i>	Carbamoyl transférase	<i>NGR234</i> <i>R. tropicii</i> <i>A. caulinodans</i> <i>B. japonicum</i> <i>R. fredii</i>
<i>O-substitution coté réducteur</i>		
<i>nodP</i>	ATP sulfurylase	<i>S. meliloti</i> ; <i>R. tropicii</i>
<i>nodQ</i>	APS kinase	<i>S. meliloti</i> ; <i>R. tropicii</i>
<i>nodH</i>	Sulfotransférase	<i>S. meliloti</i> ; <i>R. tropicii</i>
<i>nodX</i>	Acetyl transférase	<i>R. leguminosarum</i> v.
<i>nodZ</i>	Glycosyl transférase	<i>NGR234</i> <i>B. japonicum</i>

D'après Dénarié et *al.*, 1996

3) Les réponses de l'hôte aux NFs

Les NFs sont actifs dans une gamme de concentrations allant du pico au nano molaire. Ils présentent de plus une activité biologique comparable à l'inoculation bactérienne pour une grande variété de réponses chez les plantes hôtes. Détaillées dans cette section, ces différentes réponses sont représentées chronologiquement sur la **Figure 9**.

3-1) Flux ioniques et signal calcique

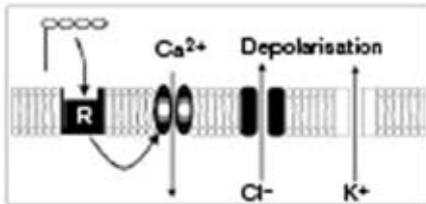
Les premières réponses physiologiques après application de NFs purifiés sur des poils absorbants de *M. sativa* sont une alcalinisation des milieux intra et extracellulaire et une dépolarisation membranaire. Ces réponses sont observées quelques secondes après application des NFs (Ehrhardt et al., 1992; Felle et al., 1996, 1998). L'utilisation de microélectrodes non invasives autour des poils absorbants et sélectives pour les ions chlorure (Cl^-), potassium (K^+) et calcium (Ca^{2+}) a permis de reconstituer chronologiquement les événements provoquant ce changement de polarité membranaire. Felle et al. (1998) ont proposé qu'après perception des NFs, des canaux calciques sont activés provoquant un influx calcique. Cet influx calcique a été confirmé ultérieurement par l'utilisation de microélectrodes invasives (Felle et al., 1999). Cette entrée de calcium précède de quelques millisecondes un efflux d'ions Cl^- dans le milieu extracellulaire qui provoque une dépolarisation membranaire. L'efflux d'ions K^+ mesuré après l'efflux de Cl^- dans le milieu extracellulaire, contrebalance cette dépolarisation et contribuerait à re-polariser la membrane plasmique (Felle et al., 1998). Chez *M. sativa*, l'absence du groupement O-sulfate sur le dernier sucre réducteur des NFs n'induit plus cette dépolarisation membranaire (Felle et al., 1995).

La seconde réponse observée est une oscillation calcique. Elle intervient une dizaine de minutes après application de NFs et dure en moyenne une demi-heure. Chez *M. sativa*, cette réponse se caractérise par des oscillations de la concentration d'ions Ca^{2+} dans le cytosol des poils absorbants avec une périodicité d'environ 60 secondes. Cette oscillation calcique est localisée dans le cytoplasme, autour du noyau. Ces oscillations se font de manière autonome cellule à cellule (Ehrhardt et al., 1996). En plus des oscillations calciques cytoplasmiques, l'usage d'une sonde fluorescente adressée au noyau a permis de démontrer que ce dernier est lui aussi le siège d'oscillations calciques après perception des NFs (Sieberer et al., 2009). Une concentration de

Facteurs Nod

secondes

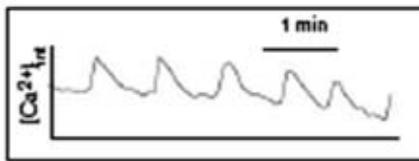
(1) Flux ioniques et dépolarisation membranaire



(2) Accumulation de calcium dans la zone apicale du poil absorbant

minutes

(3) Oscillations calciques



(4) Réorganisation du cytosquelette

heures

(5) Déformation des poils absorbants

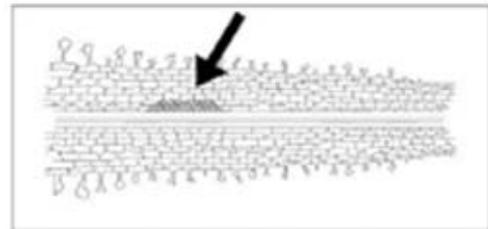


(6) Induction des nodulines précoces

(7) Réactivation du cycle cellulaire

jours

(8) Divisions cellulaires corticales



(9) Formation du nodule

Figure 9. Ordre chronologique des réponses observées chez une légumineuse après traitement aux facteurs Nod

Les flèches grises indiquent une relation temporelle entre les réponses observées.
D'après Downie et Walker, 1999.

l'ordre de 10^{-9} M de NFs de *S. meliloti* purifiés induit une oscillation calcique non distinguable de celle élicitée par les bactéries chez *M. truncatula* (Wais et al., 2000; Wais et al., 2002). Les NFs de *S. meliloti* dont les décorations sur le sucre non réducteur sont altérées (mutants *nodL* ou *nodFL*) sont toujours capables d'éliciter des oscillations calciques, contrairement au NFs sans groupement O-sulfate sur le sucre réducteur (Wais et al., 2002).

De manière intrigante, il a été montré que l'influx calcique initial nécessaire à la dépolarisation membranaire requiert une concentration en NFs au moins dix fois supérieure (10 nM) à celle requise pour déclencher les oscillations calciques (1nM) (Shaw and Long, 2003). Cette donnée n'est pas encore expliquée.

3-2) Déformation des poils absorbants

Des concentrations faibles de NFs, inférieures au nanomolaire, sont capables de provoquer des déformations morphologiques des poils absorbants. Chez *V. sativa*, 5 à 10 minutes de traitement avec des NFs purifiés de *R. leguminosarum biovar viciae* aboutissent à des déformations de type « Has » après un délai d'environ 1 heure. Seuls les poils absorbant terminant leur croissance montrent cette réponse (**Figure 5**). Une reprise de la croissance de ces poils absorbants est aussi observée dans 80% des cas 3 heures après traitement (Heidstra et al., 1994). Chez *M. truncatula*, une application localisée de NFs sur les poils absorbants redirige leur croissance. Ainsi, une application sur leur partie apicale de manière orientée permet d'obtenir une courbure partielle des poils absorbants jusqu'à 180° alors qu'une application entre 30 et 60 μm sous l'extrémité du poil provoque l'apparition d'un branchement (Hab) (Esseling et al., 2003) (**Figure 10**). Suite à l'application de NFs, une réorganisation du cytosquelette d'actine est aussi observée. Cette dernière pourrait être à l'origine des déformations du poil, le cytosquelette d'actine étant connu pour jouer un rôle dans la croissance polarisée des poils absorbants (Sieberer et al., 2005b; Sieberer et al., 2005a). Il faut cependant noter que la courbure complète du poil absorbant à 360° requiert la présence de la bactérie. Une production de NFs maintenue et localisée à l'endroit de son attachement permettrait une redirection continue de la croissance du poil jusqu'à former une crosse de berger (Esseling and Emons, 2004).

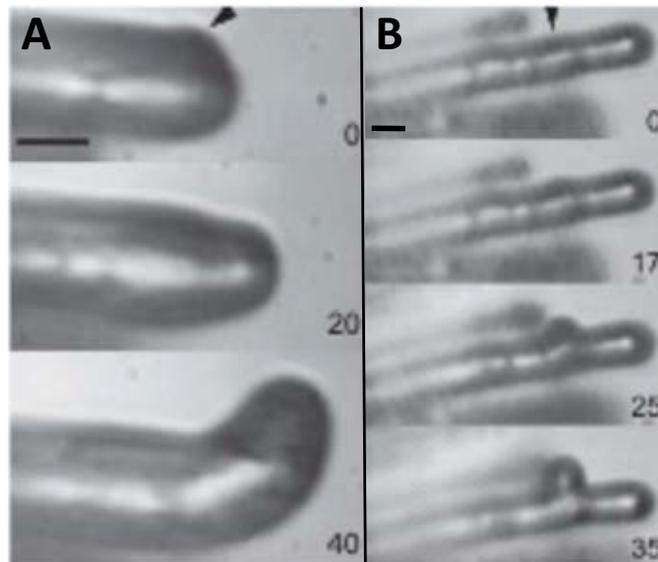


Figure 10. Réponses des poils absorbants de *M. truncatula* après application localisée de NFs

(A) Redirection observée 40 minutes après application de NFs (flèche noire) sur la partie apicale du poil absorbant. (B) Formation d'un branchement observée 35 minutes après application de NFs (flèche noire) 60 μm sous la partie apicale du poil absorbant.

Echelle : 10 μm

D'après Esseling et *al.*, 2004

3-3) Induction de gènes

Les NFs peuvent induire à eux seuls la transcription d'un grand nombre de gènes normalement transcrits durant les premières étapes de la nodulation. Ces gènes induits de manière précoce sont appelés gènes ENODs, diminutif de Early Nodulins (Scheres et al., 1990; Journet et al., 2001b). On les distingue des nodulines tardives, exprimées durant l'endocytose des rhizobia ou la phase de fixation de l'azote. Chez *M. truncatula*, la protéine pariétale riche en proline *ENOD11* est exprimée dans les racines durant les étapes de pré-infection et d'infection du nodule (Journet et al., 2001b; Boisson-Dernier et al., 2005). Il a aussi été montré que ce gène est régulé par des *cis*-éléments différents selon que son expression est activée par les NFs dans les cellules de l'épiderme ou dans les cellules corticales après infection bactérienne (Boisson-Dernier et al., 2005). De la même manière chez *M. sativa*, le gène *ENOD12* est exprimé dans les cellules de l'épiderme après traitement avec des NFs purifiées de *S. meliloti* dès 10^{-12} M (Journet et al., 1994). Les NFs peuvent aussi induire des modifications transcriptionnelles localisées dans les seules cellules du cortex. Chez *M. varia*, l'étude du promoteur du gène *ENOD20* a montré que ce gène est induit dans les cellules corticales 24 heures après traitement aux NFs (Vernoud et al., 1999). Toutes ces réponses transcriptionnelles sont dépendantes de la présence du groupement sulfate sur le sucre réducteur des NFs (Journet et al., 1994; Vernoud et al., 1999). Un grand nombre de gènes induits de manière précoce par les NFs ou les bactéries codent pour des protéines pariétales (ex. *ENOD11* et *ENOD12*), soulignant indirectement l'importance des modifications de la paroi cellulaire dans les premières étapes d'infection et durant le développement nodulaire (Schultze and Kondorosi, 1998).

3-4) Réponses cytologiques

Dans certains systèmes symbiotiques, dont *M. truncatula* est exclue, les NFs sont capables à eux seuls d'induire la division des cellules corticales ainsi que la formation de cordon de pré-infection (van Brussel et al., 1992). Chez *M. sativa* par exemple, la formation de structures nodulaires vides de bactéries peut être provoquée par de faibles concentrations de NFs synthétiques équivalents aux NFs majoritaires de *S. meliloti*. Cette réponse dépend entièrement de la présence du groupement O-sulfate sur le sucre réducteur et partiellement des décorations

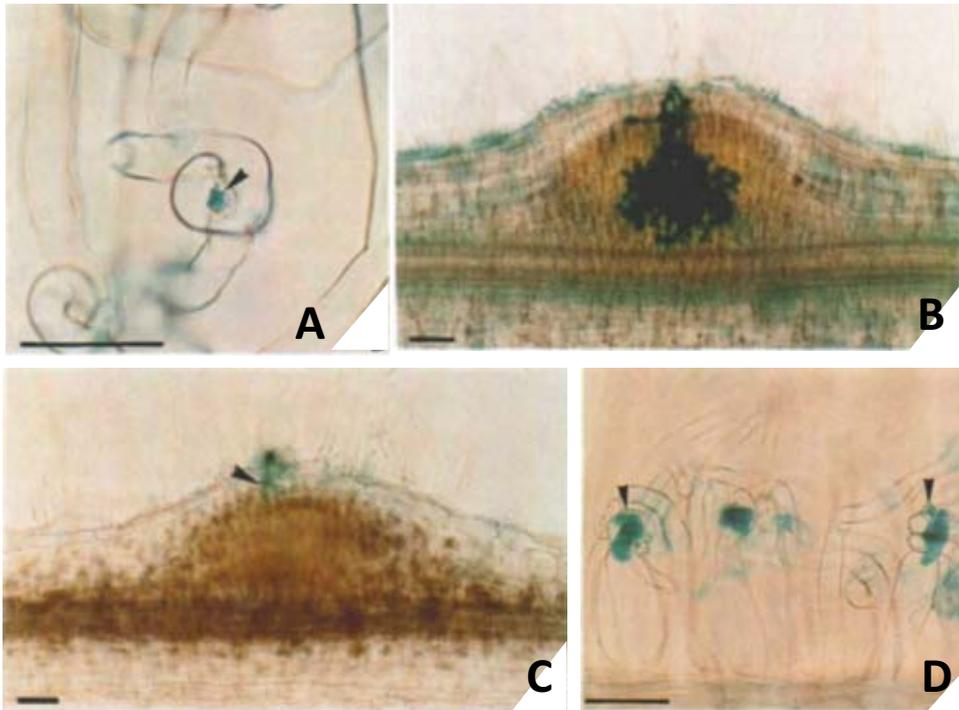


Figure 11. Propriétés symbiotiques précoces des mutants *nodL*, *nodFnodE* et *nodFnodL* de *S. meliloti*

(A, B) *S. meliloti nodL* / *M. sativa*. (A) Formation d'une crosse de berger et (B) développement et infection d'un nodule. Si la fréquence de formation des nodules est altérée, leur formation est normale. (C) *S. meliloti nodFnodE* / *M. sativa*. L'infection formée ne progresse pas dans les tissus internes. Le développement du primordium nodulaire n'est pas affecté. (D) *S. meliloti nodFnodL* / *M. truncatula*. Les crosses de berger sont formées mais la microcolonie ne parvient pas à initier la croissance du cordon d'infection.

D'après Ardourel et *al.*, 1994.

présentes sur le sucre non réducteur (Ardourel et al., 1994; Demont-Caulet et al., 1999). De manière intéressante, l'utilisation de *S. meliloti* mutants produisant des NFs altérés a permis de démontrer l'importance des décorations portées sur le sucre non réducteur pour initier spécifiquement l'étape d'infection (**Figure 11**). Des expériences d'inoculation de *Medicago sp.* avec *S. meliloti* mutée pour les gènes *nodL* ou *nodFnodE*, produisant des NFs sans groupement acétate ou avec un acide gras modifié, peuvent noduler *Medicago* avec une efficacité faible se traduisant par un délai d'apparition des nodules. Le double mutant *nodFnodL*, produisant des NFs modifiés sur les deux groupements du sucre non réducteur, ne forme presque aucun nodule (Ardourel et al., 1994). Ces défauts de nodulation pour ces mutants s'expliquent par leur incapacité à initier la croissance des cordons d'infection après la formation de la crosse de berger (Ardourel et al., 1994).

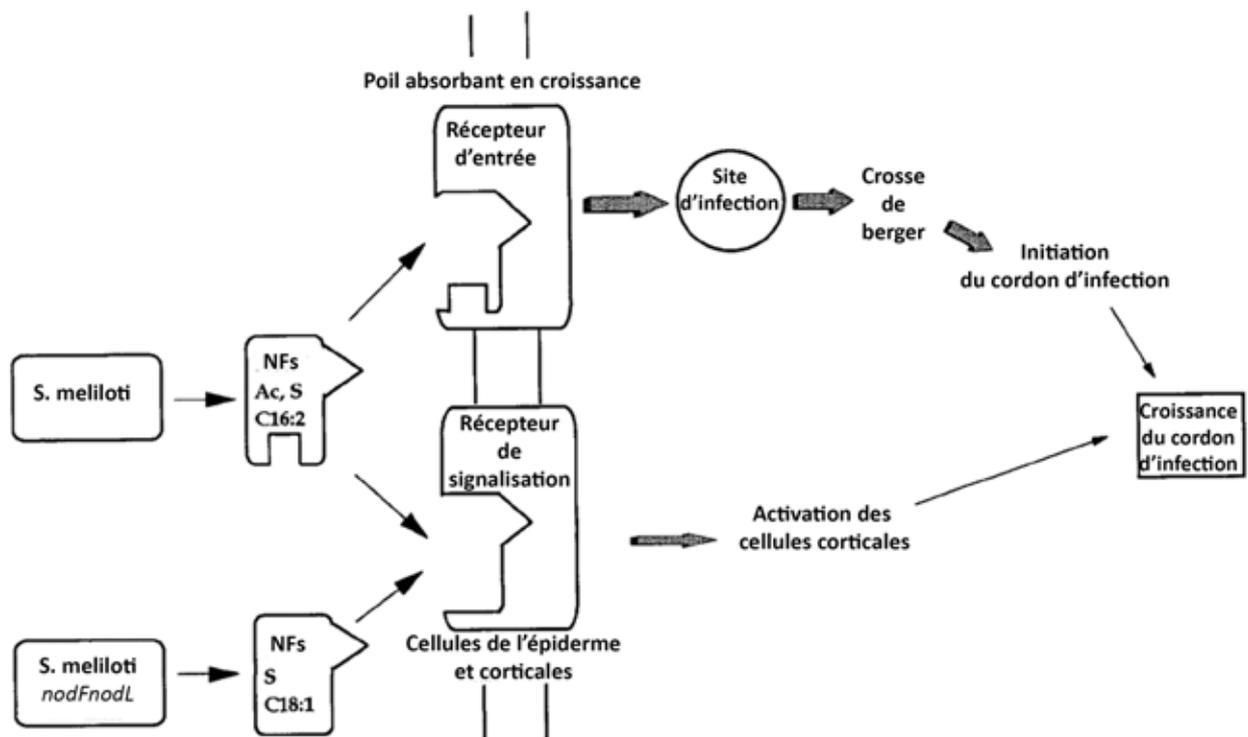


Figure 12. Modèle du rôle des différents NFs de *S. meliloti* et de leur récepteurs putatifs dans la formation des cordons d'infection chez *M. sativa*

Au moins deux types de récepteurs seraient impliqués dans la reconnaissance des NFs. Le récepteur d'entrée, menant à l'initiation du cordon d'infection, est sélectif pour les NFs portant les groupement acétate (Ac) et l'acide gras C16:2. Le récepteur de signalisation est moins sélectifs quant aux décorations portées par le sucre terminal non réducteur de NFs et jouerait un rôle dans l'activation des divisions corticales et la croissance du cordon d'infection.

D'après Ardourel et al., 1994.

III) Perception et transduction du signal facteur Nods chez *M. truncatula*

Capables d'éliciter un grand nombre de réponse chez les légumineuses hôtes à des concentrations très faibles, il a été montré que les NFs peuvent lier la paroi des cellules, augmentant ainsi leur concentration de manière localisée. Il est par conséquent difficile d'estimer la concentration réelle en NFs requise à la surface des cellules de l'épiderme pour éliciter les différentes réponses. La faible dose requise en NFs et la rapidité avec laquelle une partie des réponses s'effectue amène cependant à penser que les NFs sont perçus de manière directe à la surface des cellules, sans doute par des récepteurs localisés à la membrane plasmique (Cullimore et al., 2001).

Chez les légumineuses du genre *Medicago*, il apparaît que les réponses aux NFs sont toutes dépendantes de la présence du groupement O-sulfate sur le sucre réducteur des NFs produits par *S. meliloti*. L'initiation de l'infection par la bactérie est une réponse dépendante des décorations portées à la fois sur le sucre réducteur et non réducteur (acétate et acide gras). Le processus d'infection est donc plus exigeant quant à la structure des NFs (Ardourel et al., 1994). Pour expliquer ces observations, Ardourel et al. (1994) ont proposé un modèle de perception des NFs composé de deux types de récepteurs (**Figure 12**). Le premier récepteur, indispensable à toutes les réponses, percevrait le groupement sulfate du sucre réducteur. Le second, indispensable à l'infection et à la formation du nodule, percevrait les décorations portées du côté du sucre non réducteur. Ces deux types de perception seront par la suite désignées comme voie de signalisation et voie d'entrée, respectivement.

De grandes avancées dans la compréhension des mécanismes de perception des NFs ont été réalisées grâce aux études génétiques menées chez *L. japonicus* et la plante modèle du L.I.P.M. *M. truncatula*. Des criblages de mutants de *M. truncatula* basés sur l'absence de nodulation en présence de la bactérie *S. meliloti* (phénotype Nod⁻) ont permis l'identification de nombreux gènes régulant positivement la symbiose (Catoira et al., 2000). Ces mutants présentent des différences dans leurs premières réponses aux NFs, dont l'induction d'une fusion promoteur pENOD11::GUS (Journet et al., 2001b) et les oscillations calciques (Wais et al., 2000). Cela a permis de déterminer la position relative des protéines correspondantes dans la voie de signalisation NFs.

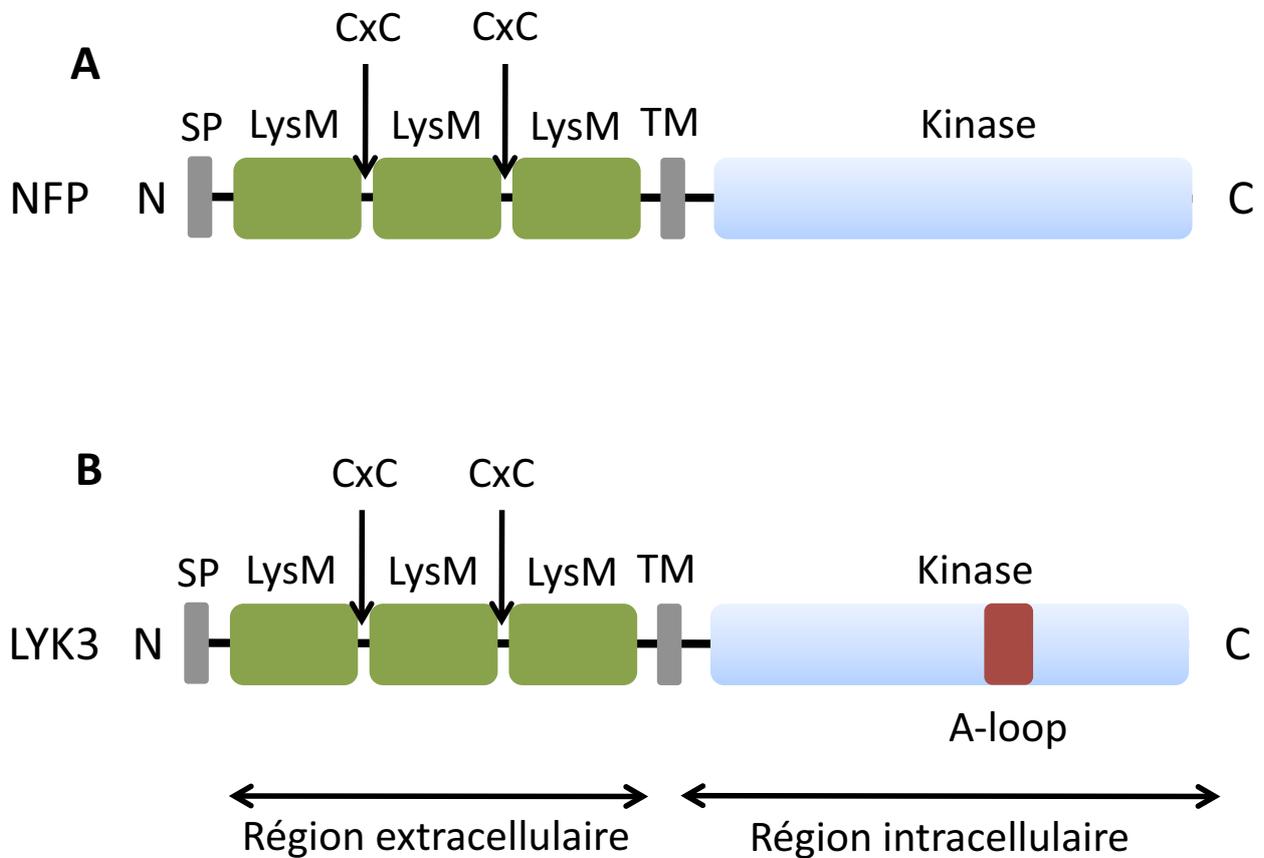


Figure 13. Organisation en domaines des récepteurs kinase NFP et LYK3 de *M. truncatula*

(A) NFP (595AA) et (B) LYK3 (620AA) sont composés d'un peptide signal SP suivi de trois répétitions lysin-motif (LysM) entrecoupées par deux motifs riches en cystéine (CxC), d'un domaine transmembranaire (TM) et d'un domaine kinase. Le domaine kinase de NFP ne possède pas de boucle d'activation (A-Loop).

D'après Arrighi et al., 2006 ; Limpens et al., 2003

1) La perception des NFs

1-1) *NFP*, le récepteur de signalisation

Chez *M. truncatula*, le mutant *nfp* (*nod factor perception*) ne présente plus aucune réponse suite à l'application de NFs. L'influx calcique, la dépolarisation membranaire, les oscillations calciques et les déformations des poils absorbants ne sont plus observés, de même que l'induction du gène *ENOD11* (Amor et al., 2003). Un phénotype similaire, bloqué pour les réponses induites par les NFs, est observé chez les mutants *Ljnf5* et *Ljnf1* (*nod factor receptor*) de *L. japonicus*. Le mutant *Ljnf1* de *L. japonicus* présente toutefois une réponse atténuée dans la modification du pH extracellulaire après application de NFs (Madsen et al., 2003; Radutoiu et al., 2003).

Les gènes correspondants codent tous pour des récepteurs sérine/thréonine kinase de la famille des LysM-RLKs, avec trois motifs lysin (LysM) dans leur domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et une région intracellulaire contenant un domaine kinase (Madsen et al., 2003; Radutoiu et al., 2003; Arrighi et al., 2006). Les récepteurs NFP et LjNFR5 possèdent chacun un domaine kinase dépourvu de boucle d'activation (**Figure 13**). Il a été montré pour NFP que ce domaine kinase altéré ne possède pas d'activité kinase *in vitro* (Arrighi et al., 2006). Chez *L. japonicus*, l'existence du couple de récepteurs LjNFR5/LjNFR1 tous deux indispensables à la majorité des premières réponses suggère qu'ils agissent en complexe pour la perception directe des NFs. LjNFR1 pourrait ainsi pallier la déficience putative d'activité kinase de LjNFR5. Par analogie chez *M. truncatula*, cela pourrait indiquer que NFP fonctionne en interaction avec au moins un autre LysM-RLK encore non identifié (Smit et al., 2007). Indispensable à toutes les réponses aux NFs, le LysM-RLK NFP de *M. truncatula* jouerait ainsi le rôle de récepteur putatif dans la voie de signalisation NFs décrite par Ardourel et al. (1994).

1-2) *LYK3*, le récepteur d'entrée

Chez le pois (*P. sativum*), l'allèle *SYM2* joue un rôle particulier dans la nodulation. Cet allèle est présent sous deux formes suivant les écotypes de pois étudiés. Chez le pois cultivé « Rondo », *SYM2* est présent sous la forme *SYM2^C* tandis que chez l'écotype de pois sauvage « Afghanistan », cet allèle est présent sous la forme *SYM2^A*. Ces deux formes alléliques de *SYM2*

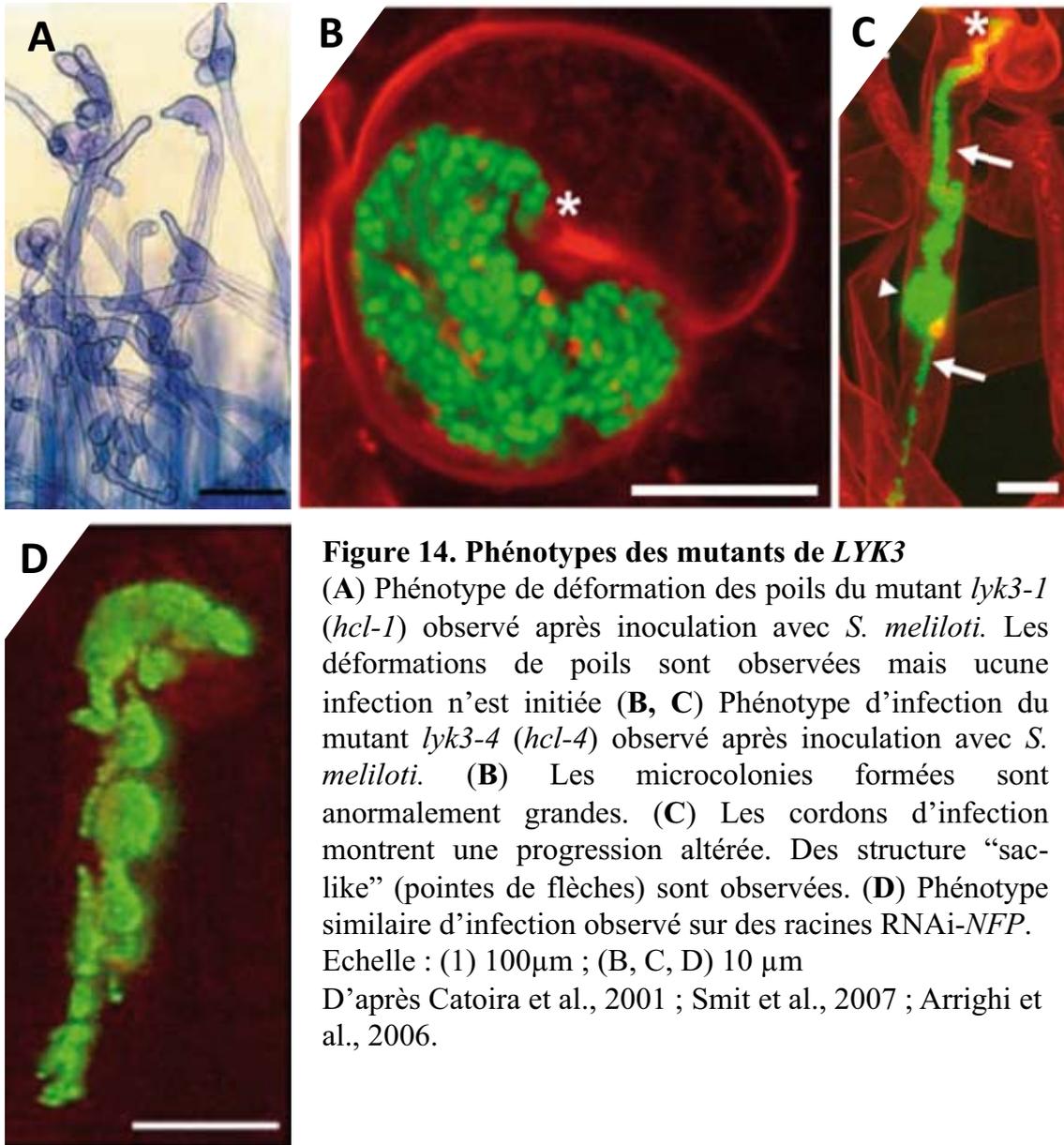


Figure 14. Phénotypes des mutants de *LYK3*

(A) Phénotype de déformation des poils du mutant *lyk3-1* (*hcl-1*) observé après inoculation avec *S. meliloti*. Les déformations de poils sont observées mais aucune infection n'est initiée (B, C) Phénotype d'infection du mutant *lyk3-4* (*hcl-4*) observé après inoculation avec *S. meliloti*. (B) Les microcolonies formées sont anormalement grandes. (C) Les cordons d'infection montrent une progression altérée. Des structures "sac-like" (pointes de flèches) sont observées. (D) Phénotype similaire d'infection observé sur des racines RNAi-*NFP*.
 Echelle : (1) 100µm ; (B, C, D) 10 µm
 D'après Catoira et al., 2001 ; Smit et al., 2007 ; Arrighi et al., 2006.

sont impliquées dans la reconnaissance spécifique d'une décoration des NFs produit par *R. leguminosarum biovar viciae*.

Dans la variété cultivée de pois « Rondo », la présence de l'allèle *SYM2^C* permet indifféremment la nodulation en présence de bactérie produisant des NFs acétylés ou non acétylés sur le sucre réducteur. En revanche, chez la même variété « Rondo » homozygote pour l'allèle *SYM2^A* obtenu par introgression, la nodulation n'est observée qu'en présence d'une souche de bactérie produisant des NFs acétylés sur le sucre réducteur. En présence de bactéries produisant des NFs non acétylés, la croissance des cordons d'infection est bloquée (Geurts et al., 1997). Cette acétylation des NFs chez la bactérie est le résultat de l'activité de l'acetyl-transferase *NodX* (Firmin et al., 1993). Si toutefois un très faible nombre nodules peuvent quand même être formés chez le pois homozygote pour l'allèle *SYM2^A* en présence de la bactérie produisant des NFs non acétylés, aucun nodule n'est en revanche formé si les NFs sont en plus modifiés pour l'acide gras du coté non réducteur (C18 :4 modifié en C18 :1) (Geurts, non publié). Cette donnée suggère un effet cumulatif des deux décorations dans la perception de NFs par le produit du gène *SYM2^A*.

L'étude de la région synténique de *SYM2* du pois chez *M. truncatula* a permis l'identification d'un groupe de 7 gènes codant des LysM-RLKs, avec trois motifs lysin dans leurs domaines extracellulaires. Parmi ces LysM-RLKs nommés de LYK1 à LYK7, seuls LYK3, LYK6 et LYK7 sont exprimés dans les racines de *M. truncatula* (Limpens et al., 2003). Des expériences d'extinction sélective de *LYK3*, *LYK6* et *LYK7* par ARN interférent ont démontré un rôle symbiotique particulier pour le gène *LYK3*, présentant des homologues avec ce qui est observé pour l'allèle *SYM2* chez le pois. L'extinction du gène *LYK3* chez *M. truncatula* ne produit aucun phénotype de nodulation marqué en présence de *S. meliloti* sauvage. En revanche, aucun nodule n'est formé après inoculation avec la souche mutante de *S. meliloti nodFE*, produisant des NFs avec un acide gras modifié (C18 :1) (Limpens et al., 2003). Dans ce dernier cas, les déformations « Hac » des poils sont présentes mais les cordons d'infection formés sont abortifs (Limpens et al., 2003). Cela indique que chez *M. truncatula*, la protéine LYK3 (**Figure 13**) perçoit les modifications du sucre terminal non réducteur des NFs.

L'étude du phénotype de différents mutants de *LYK3* a abouti à des conclusions similaires. Le mutant *hcl-1* (*root hair curling 1*) de *M. truncatula* présente des réponses précoces de types sauvages après inoculation bactérienne mais la formation de la crosse de berger est altérée. Un début de divisions corticales est observé chez *hcl-1* (Catoira et al., 2001) (**Figure 14**). Il a été montré que la protéine avec la mutation ponctuelle de *hcl-1* dans le domaine kinase de LYK3 n'a aucune activité kinase *in vitro*, suggérant l'importance de cette activité kinase pour le rôle

symbiotique de LYK3 (Klaus et al., soumis pour publication). En analysant un autre mutant de *LYK3*, Smit et al. (2007) ont montré qu'il existe une réponse dose dépendante pour le rôle de ce gène dans l'infection. Chez le mutant *hcl-4*, il est estimé que seulement 8% d'ARNm de *LYK3* sont correctement épissés, induisant une quantité de protéine supposément plus faible que chez les plantes sauvages (Smit et al., 2007). Ce mutant est toujours capable de noduler en présence de *S. meliloti*, mais avec une efficacité de 8% par rapport aux plantes sauvages (Figure 14). En revanche, la nodulation est quasi absente (0,2% du sauvage) ou complètement absente en présence de bactéries mutantes *nodFE* ou *nodL* respectivement. Cela confirme que LYK3 perçoit les décorations spécifiques des NFs sur le sucre non réducteur des NFs de *S. meliloti*. Le LysM-RLK LYK3 de *M. truncatula* jouerait donc le rôle de récepteur de la voie d'entrée décrite par Ardourel et al. (1994).

Il est à noter que l'extinction par ARN interférent du gène *NFP* chez *M. truncatula* produit un phénotype similaire dans l'infection, suggérant que NFP est aussi impliqué dans la voie d'entrée (Arrighi et al., 2006) (**Figure 14**).

1-3) *LysM-RLKs et perception des NFs*

Des résultats présentés précédemment, il apparaît que les réponses induites par les NFs chez les deux légumineuses modèles dépendent de récepteurs LysM-RLKs. Il a par ailleurs été montré que l'introduction chez *M. truncatula* du couple de récepteurs LjNFR5/LjNFR1 de *L. japonicus* par transformation permet à *M. truncatula* de former des nodules non fonctionnels en présence de *M. loti*, symbiote de *L. japonicus*. Cette formation de nodules dépend de la production de NFs par *M. loti* (Radutoiu et al., 2007). Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle les LysM-RLKs sont impliqués dans la perception des NFs.

Plusieurs études sur protéines contenant des motifs LysM suggèrent indirectement un rôle des LysM-RLKs dans la liaison des NFs. Par exemple, chez la bactérie *Lactococcus lactis*, l'autolysine AcmA peut s'associer au peptidoglycane (PG) de différentes bactéries Gram+ par sa région C-terminale (Steen et al., 2003). AcmA possède une activité N-acetylglucosamidase et sa partie C-terminale contient trois répétitions du domaine LysM, un nombre requis pour une activité enzymatique optimale (Steen et al., 2005). Il est proposé que AcmA lie directement le PG par ses domaines LysM, permettant la lyse ce dernier grâce à son activité N-acetylglucosamidase.

Chez les plantes, l'étude de la voie de perception de la chitine a mis en évidence les rôles d'une protéine membranaire contenant des domaines LysM et d'un récepteur LysM-RLK. Chez le riz, la protéine CeBIP contenant trois répétitions LysM extracellulaires peut lier des fragments de chitine (GlcNac)₈ *in vitro* et *in vivo* (Kaku et al., 2006; Shinya et al., 2009). CeBIP est nécessaire à la production précoce d'espèce réactives de l'oxygène (ROS) et aux modification transcriptomiques plus tardives observées chez les cellules de riz en culture après application de (GlcNac)₈. Il est cependant probable que CeBIP ne joue pas son rôle de perception seul, faisant partie de la famille des RLPs (Receptor Like Protein) et composé seulement d'un domaine extracellulaire lié par ancre GPI à la membrane plasmique (Kaku et al., 2006). Chez *A. thaliana*, le LysM-RLK CERK1 est impliqué dans la perception de la chitine (GlcNac). CERK1 possède une organisation en domaine similaire à LYK3, avec trois domaines LysM extracellulaires et une région cytosolique présentant un domaine kinase actif. La liaison de la chitine par CERK1 a été démontrée *in vitro* et cette liaison dépend de la présence des trois motifs LysM (Miya et al., 2007; Petutschnig et al., 2010).

Le PG, constitué d'un polymère formé par l'alternance de N-acetylglucosamines et d'acides N-acetylmuramic, et la chitine sont des molécules structurellement proches des NFs contenant des polymères de GlcNac. Le fait que des protéines contenant des LysM lient directement ces composés suggère que les lysM-RLKs symbiotiques peuvent lier les NFs. La liaison directe des NFs par les LysM-RLKs symbiotiques reste cependant toujours à démontrer.

1-4) La famille des LysM-RLKs de M. truncatula

Une analyse de la partie séquencée du génome de *M. truncatula* a mis en évidence l'existence d'au moins 17 LysM-RLKs, incluant *NFP* et *LYK3*. L'expression de ces gènes a été confirmée pour 16 d'entre eux et 7 ont un profil d'expression racinaire. Pour comparaison, *A. thaliana* et *O. sativa* contiennent cinq et six LysM-RLKs respectivement (Arrighi et al., 2006). Cela suggère que l'expansion de la famille des LysM-RLKs chez la légumineuse *M. truncatula* est en lien avec sa capacité à noduler (Arrighi et al., 2006). Une analyse phylogénétique des domaines kinases des LysM-RLKs de *M. truncatula*, de *L. japonicus*, d'*A. thaliana* et de *O. sativa* a permis de les classer dans trois sous-familles. La sous-famille I comprend les LysM-RLKs ayant entre 10 et 12 exons. *LYK3* et *LjNFR1* font partie de cette sous-famille et sont des orthologues probables. Les sous-familles II et III comprennent des LysM-RLK ayant 1 et 2 exons respectivement. Les

LysM-RLKs issus de ces deux dernières sous-familles ont été renommé LYR pour LYK-related. Les orthologues probables *NFP* et *LjNFR5* font partie de la sous-famille II (Arrighi et al., 2006).

2) Transduction du signal NFs

2-1) Les gènes DMI, communs aux deux endosymbioses racinaires

Les trois mutants *dmi1*, *dmi2* et *dmi3* de *M. truncatula* « does not make infection » sont incapable de noduler et aucune structure d'infection n'est observée chez les trois mutants. Après application de NFs, les déformations des poils absorbant sont aberrantes (Has marqué), la nodulines précoce *ENOD11* n'est plus induite. En revanche, l'influx calcique est toujours observé. DMI1, DMI2 et DMI3 fonctionnent donc en aval de NFP (Catoira et al., 2000; Shaw and Long, 2003). Une étude ultérieure a permis de montrer que les oscillations calciques ne sont plus présentes chez les mutants *dmi1* et *dmi2*, contrairement au mutant *dmi3* qui n'est pas affecté dans cette réponse. DMI1 et DMI2, contrairement à DMI3, sont donc requis pour générer les oscillations calciques (Wais et al., 2000). Les trois mutants *dmi* sont affectés dans la mycorrhization. Les voies de signalisation des deux endosymbioses partagent donc ces trois gènes, suggérant une origine commune aux deux endosymbioses (Catoira et al., 2000). De manière similaire, les oscillations calciques déclenchées pendant la symbiose AM dépendent des gènes DMI1 et DMI2 mais pas de DMI3 (Kosuta et al., 2008).

2-1-1) *DMI1*

Le gène *DMI1* code une protéine contenant quatre traverses membranaires et qui présente une homologie avec des canaux potassiques d'archaebactéries (Ane et al., 2004) (**Figure 15**). Chez *M. truncatula*, l'expression d'une fusion DMI1-GFP active est localisée autour du noyau, à la membrane péri-nucléaire (Riely et al., 2007) (**Figure 15**). Il a été proposé que DMI1 pourrait réguler l'activité de canaux calciques à l'origine des oscillations calciques (Peiter, 2007). La nature des ions transportés par la protéine canal DMI1 reste cependant inconnue. Chez *L. japonicus*, les gènes *LjCASTROR* et *LjPOLLUX*, sont tous les deux nécessaires à la génération des oscillations calciques. Ils codent deux canaux cationiques putatifs localisés à la membrane péri-

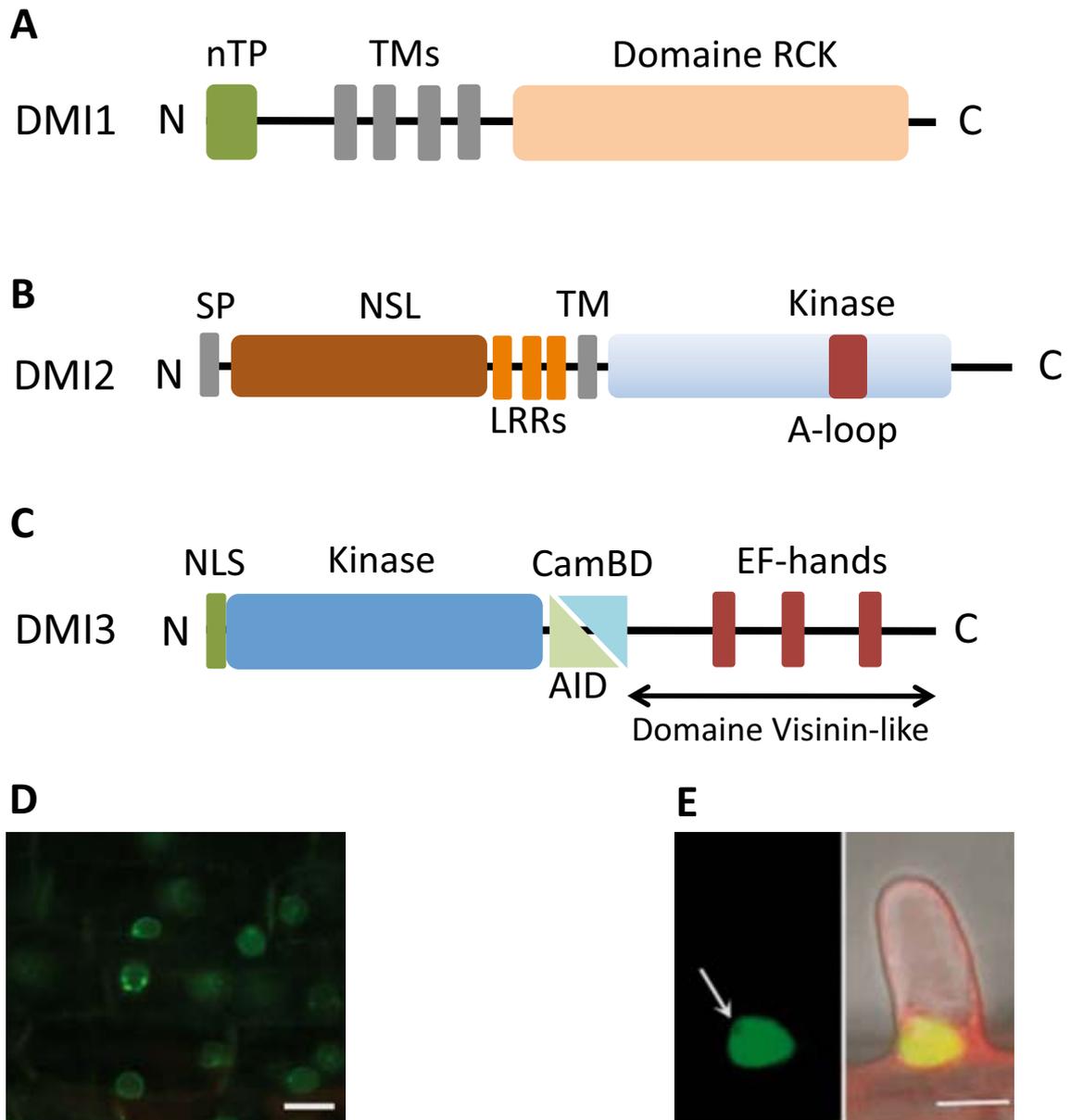


Figure 15 Organisation en domaines des protéines DMI1, DMI2 et DMI3 de *M. truncatula* et localisation subcellulaire

(A) DMI1 (883 AA) est composé d'un peptide de localisation nucléaire nTP suivi de quatre domaines transmembranaires (TMs), d'un domaine RCK qui présente une homologie avec un canal potassique de *Methanobacterium thermoautotrophicum*. (B) DMI2 (925AA) est composé d'un peptide signal (SP) suivi du domaine NSL de fonction inconnue et de trois Leucine Rich Repeats, d'un domaine transmembranaire (TM) et d'un domaine kinase fonctionnel. A-loop : Boucle d'activation. (C) DMI3 (523 AA) est composé d'un peptide de localisation nucléaire (NLS) suivi d'un domaine kinase. Le domaine de liaison à la calmoduline (CamBD) est superposé au domaine auto-inhibiteur de la kinase (AID). En C-terminal, le domaine Visinin-like contient trois EF-hands, motifs pouvant lier le calcium. (D) Localisation sub-cellulaire d'une protéine de fusion DMI1-GFP. (E) Localisation sub-cellulaire d'une fusion DMI3-GFP.

D'après Ané *et al.*, 2004 ; Riely *et al.* 2007 ; Pieter *et al.*, 2007 ; Smit *et al.*, 2005 ; Endre *et al.*, 2002

nucléaire (Charpentier et al., 2008). Il est proposé que LjCASTOR et LjPOLLUX modulent le potentiel membranaire de la membrane péri-nucléaire, participant ainsi indirectement aux oscillations calciques (Charpentier et al., 2008). *LjCASTOR* et *LjPOLLUX* prennent chez *L. japonicus* la même place dans la voie de signalisation NFs que DM1.

2-1-2) DMI2

Le gène *DMI2* de *M. truncatula*, orthologue de *NORK* chez *M. sativa* et de *LjSYMRK* chez *L. japonicus*, code pour un récepteur sérine/thréonine kinase de la famille des Leucine-Rich Repeat RLKs (LRR-RLKs) (Endre et al., 2002; Stracke et al., 2002). Ce récepteur présente un large domaine conservé de fonction inconnue et trois répétitions Leucine Rich Repeat dans son domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et une région cytosolique contenant un domaine kinase (Endre et al., 2002) (**Figure 15**). L'étude de l'expression de *DMI2* par fusion promoteur::GUS a montré que ce gène est exprimé dans l'épiderme et le cortex de la racine avant inoculation. Après inoculation, *DMI2* est fortement induit dans le primordium nodulaire avant contact avec les cordons d'infection et dans la zone II d'infection du nodule mature (Bersoult et al., 2005). Jusqu'à présent, rien n'est connu sur le mécanisme par lequel DMI2 participe dans l'activation des oscillations calciques.

La recherche de partenaires de DMI2 par criblage double-hybride de levure a cependant permis l'identification de la protéine HMGR1, une 3-hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A Reductase, interagissant avec la région intracellulaire de DMI2 (Kevei et al., 2007). Cette protéine joue un rôle positif dans la nodulation, comme montré par l'absence de nodules sur des racines dérégulée pour l'expression de *HMGR1* par ARN interférent. De plus, l'inhibition de son activité enzymatique par ajout de faibles doses de lovastatin, à des concentrations sans effet notable sur la survie des bactéries ou la physiologie de la plante, réduit de moitié la nodulation chez *M. truncatula*. La protéine HMGR1 serait impliquée dans la voie de biosynthèse des mévalonates, précurseurs des cytokinines et des stéroïdes (Kevei et al., 2007).

2-1-3) DMI3

Le gène *DMI3* de *M. truncatula*, orthologue de *LjCCamK* de *L. japonicus*, code pour une protéine kinase Ca²⁺/Calmoduline dépendante organisée en trois régions. La première région N-

terminale contient un domaine kinase qui est immédiatement suivi d'un domaine auto-inhibiteur superposé à un site de liaison à la calmoduline (**Figure 15**). La partie C-terminale Visinin-like contient entre trois et quatre domaines EF-hands pouvant lier le calcium (Levy et al., 2004; Mitra et al., 2004b; Tirichine et al., 2006). Son expression, restreinte aux racines et aux nodules, est indépendante de la présence de *S. meliloti* (Levy et al., 2004). La protéine de fusion DMI3-GFP est localisée dans le noyau des cellules de *M. truncatula* indépendamment de la perception des NFs (Kalo et al., 2005; Smit et al., 2005) (**Figure 15**). Ces éléments suggèrent que DMI3 pourrait être une protéine capable d'intégrer le signal des oscillations calciques, par exemple en phosphorylant des protéines partenaires. De plus, l'activité des protéines DMI3 et LjCcamK peut à elle seule déclencher le processus d'organogenèse nodulaire. En effet, la levée de l'auto-inhibition de DMI3 ou de LjCcamK provoque sur les racines l'apparition de structures nodulaires vides en absence de bactéries (Gleason et al., 2006; Tirichine et al., 2006).

DMI3 étant essentiel à l'endosymbioses bactérienne et mycorhizienne, il a été proposé que DMI3 puisse intégrer différemment les signaux calciques induits par la symbiose bactérienne et la symbiose mycorhizienne (Levy et al., 2004). Cependant, il a été montré que l'homologue de DMI3 chez la non légumineuse *Oryza sativa* (OsCcaMK), peut compléter le mutant *dmi3* pour l'induction du gène *ENOD11* et la formation du nodule (Godfroy et al., 2006). Le fait qu'une protéine non sélectionnée pendant l'évolution pour jouer un rôle spécifique dans la nodulation puisse compléter DMI3 suggère qu'il est peu probable que les oscillations calciques soient décodées de manières spécifiques. Cette dernière donnée suggère plutôt l'existence de voies de signalisation parallèles et propres à chaque symbiose. Ces voies parallèles permettraient de moduler spécifiquement les réponses à apporter aux oscillations calciques (Godfroy et al., 2006).

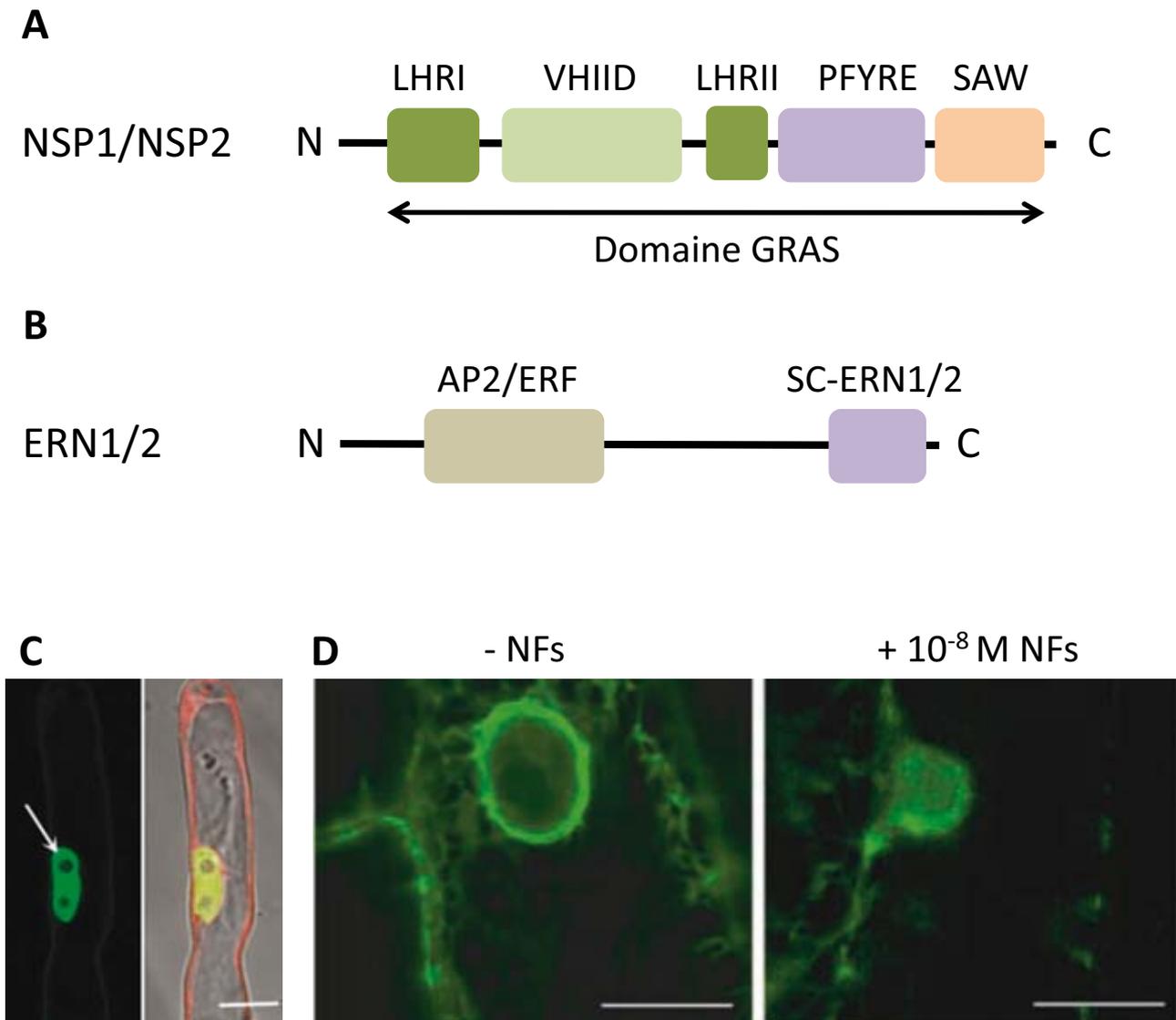


Figure 16. Organisation en domaines des facteurs de transcription NSP1, NSP2 et ERN1 de *M. truncatula* et localisation sub-cellulaire

(A) NSP1 et NSP2 (554 et 508 AA respectivement) sont composés d'un domaine GRAS comprenant deux Leucine Heptad Region (LHRI et LHRII), et des sous domaines VHIID, PFYRE et SAW. (B) ERN1 et ERN2 (268 et 313 AA respectivement) sont composés d'un domaine AP2/ERF de liaison à l'ADN. Une séquence en C-terminal conservée entre ERN1 et ERN2 et de fonction inconnue est représentée (SC-ERN1/2). (C) Localisation nucléaire et indépendante de la perception NFs de la fusion GFP-NSP1. (D) Localisation péri-nucléaire de la fusion NSP2-GFP avant traitement aux NFs et relocalisation nucléaire après traitement aux NFs.

Echelle 10 μ m

D'après Smit et *al.*, 2005 ; Kalo et *al.*, 2005 ; Andriankaja et *al.*, 2007.

2-2) Les facteurs de transcriptions

2-2-1) *NSP1 et NSP2*

Les mutants *nsp1* et *nsp2* de *M. truncatula* (*nodulation signaling pathway*) présentent des déformations des poils absorbant de type sauvage en présence de bactéries, tandis que les observations de cette même réponse aux NFs purifiés de *S. meliloti* vont d'un type sauvage pour *nsp1* à une réponse réduite pour *nsp2*. Toujours suite à l'application de NFs, l'induction du gène marqueur *ENOD11* est réduite d'un facteur 100 chez *nsp1* et n'est plus présente chez *nsp2*. Aucune formation de cordon d'infection ni division des cellules corticales n'est observée chez *nsp1* et *nsp2* alors que les oscillations calciques sont toujours présentes chez les deux mutants. Enfin, les gènes *NSP1* et *NSP2* ne sont pas requis pour la symbiose AM (Catoira et al., 2000; Wais et al., 2000; Oldroyd and Long, 2003).

L'utilisation d'une forme auto active de DMI3 (DMI3¹⁻³¹¹), a permis de placer le rôle du gène *NSP2* en aval de DMI3. En effet, des racines exprimant cette variante de DMI3, ne forment plus de nodules spontanés dans un fond génétique *nsp2* (Gleason et al., 2006). Il est probable que *NSP1* joue son rôle au même niveau que *NSP2*, en aval de DMI3 (Gleason et al., 2006). Les deux protéines *NSP* pourraient par exemple être des substrats pour la protéine DMI3 activée par les oscillations calciques, contrôlant ainsi la transcription de gènes symbiotiques tels que le marqueur *ENOD11* (Kalo et al., 2005).

Les gènes *NSP1* et *NSP2* codent tous les deux des facteurs de transcription putatifs de la famille GRAS. Le domaine GRAS est composé de deux domaines riche en leucine (LRHI et LHRII) et de trois domaines conservés, VHIID, PFYRE et SAW (Kalo et al., 2005; Smit et al., 2005) (Figure 16). *NSP1* et *NSP2* n'ont qu'une faible homologie de séquence en dehors des domaines conservés, suggérant des rôles similaires mais non redondants dans la voie de signalisation NF (Kalo et al., 2005). *NSP1* est exprimée et localisée dans le noyau indépendamment de l'application de NFs, à la différence de *NSP2* aussi exprimée constitutivement mais relocalisée de l'enveloppe nucléaire au noyau après traitement aux NFs (Kalo et al., 2005; Smit et al., 2005) (**Figure 16**). Il a récemment été montré *in vitro* que la protéine *NSP1* lie directement un *cis*-élément du promoteur de *ENOD11*. La protéine *NSP2* est requise pour cette activité de *NSP1 in vivo* et l'association *NSP1-NSP2* avec le promoteur

ENOD11 in vivo est augmentée après traitement aux NFs (Hirsch et al., 2009). Cela renforce l'hypothèse d'un rôle direct de NSP1 et NSP2 dans la transcription de gènes symbiotiques.

2-2-2) *ERN1*

Les mutants *bit1-1* et *bit1-2* (*branching infection threads*) sont deux allèles d'un même locus chez *M. truncatula*. Ces mutants présentent des déformations des poils absorbants similaires aux plantes sauvages en présence de bactéries. De manière occasionnelle, des cordons d'infection peuvent être initiés mais ne progressent jamais au delà des cellules de l'épiderme. Les mutants *bit1* ne montrent plus d'induction du gène *ENOD11*. Les divisions corticales sont complètement absentes pour l'un des allèles mais peuvent occasionnellement être observées 60 jours après inoculation pour le second (Middleton et al., 2007).

BIT1 code un facteur de transcription de la famille des ERFs, (Ethylene Response Factor) nommé ERN pour « ERF Required for Nodulation ». ERN contient un domaine AP2 conservé dont la fonction est de lier l'ADN (Middleton et al., 2007) (**Figure 16**). L'absence de nodules spontanés dans un fond génétique *bit1* après transformation avec une forme auto-active de DMI3 positionne l'activité de ERN en aval de DMI3. Le gène *ERN* est induit après application de NFs, et cette induction dépend des deux gènes *NSP*. Cette dernière donnée suggère donc que ERN se place en aval de NSP1 et NSP2 dans la voie de signalisation NFs (Middleton et al., 2007).

Dans une seconde étude menée indépendamment, il a été montré que trois protéines ERNs (ERN1, ERN2 et ERN3) sont capables de lier l'élément *cis*-régulateur *NF-box* du promoteur du gène *ENOD11*, responsable de l'expression de ce dernier dans les cellules de l'épiderme après traitement aux NFs (Boisson-Dernier et al., 2005; Andriankaja et al., 2007). ERN1, codé par le gène *BIT1*, et ERN2 régulent positivement l'expression de *ENOD11* en système hétérologue alors que ERN3 joue un rôle inhibiteur (Andriankaja et al., 2007).

2-2-3) *NIN*

Le mutant *nin* de *M. truncatula* (*nodule inception*) présente des déformations de poils absorbant exagérées de type « Hac » en présence de bactéries mais les cordons d'infection sont rarement formés (Marsh et al., 2007). Les rares événements d'infection s'arrêtent au niveau des cellules de l'épiderme. Aucune division des cellules corticales n'est observée. Les oscillations

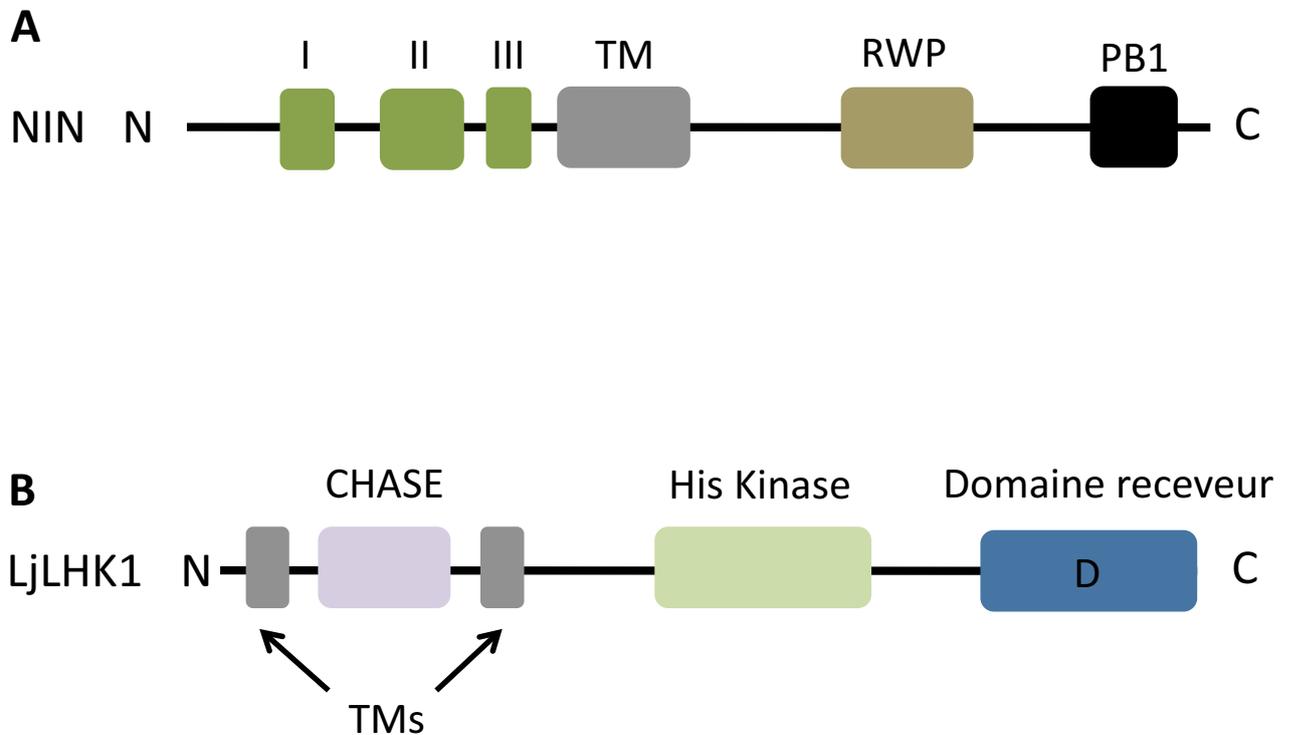


Figure 17. Organisation en domaines de NIN de *M. truncatula* et du récepteur aux cytokinines LHK1 de *L. japonicus*

(A) NIN (933 AA) est composé de trois domaines N-terminaux de fonctions inconnues, d'un domaine transmembranaire, d'un domaine RWP de liaison à l'ADN et d'un domaine PB1 d'interaction protéine-protéine. (B) LjLHK1 (993 AA) est composé d'un domaine extracellulaire de liaison aux cytokinines CHASE encadré par deux domaines transmembranaires (TM). Sa partie cytosolique comprend un domaine histidine kinase et un domaine C-terminal receveur de type D.

D'après Marsh et *al.*, 2007 ; Murray et *al.*, 2007 ;

calciques sont toujours présentes. L'expression du gène *ENOD11* dans l'épiderme est maintenue jusqu'à 96 h après application de NFs, au delà de ce qui est observé chez les plantes sauvages. Cela suggère un rôle négatif pour *NIN* dans le contrôle de l'expression d'*ENOD11* (Marsh et al., 2007).

La formation de nodules spontanés est abolie chez *nin* en présence de la forme auto-active de DMI3, ce qui permet de placer le rôle de *NIN* en aval de *DMI3*. Le gène *NIN* est induit en présence de bactéries, et cette induction dépend des gènes *NFP*, *DMI* et *NSP*, ce qui place son rôle en aval des gènes *NSP* (Marsh et al., 2007). *NIN* joue donc un rôle ambivalent dans la symbiose en tant que régulateur positif de l'organogénèse nodulaire et de l'infection mais aussi en tant que régulateur négatif de l'expression spatio-temporelle de *ENOD11*.

NIN code pour une protéine organisée en six domaines (**Figure 17**). Les trois premiers domaines (I-II-III) sont de fonction inconnue. Ils sont suivis d'un domaine transmembranaire (IV), d'un domaine RWPxRK (V) et d'un domaine PB1 (VI). Le domaine RWPxRK est prédit pour avoir une fonction de liaison à l'ADN, et le domaine PB1 pourrait être un domaine d'interaction protéine-protéine. La présence d'un domaine transmembranaire et d'un domaine pouvant lier l'ADN chez *NIN* ressemble à ce qui est décrit chez la drosophile pour les régulateurs Notch, facteurs de transcription localisés à la membrane plasmique et activés par protéolyse après la perception de leur ligand (Schauser et al., 1999; Marsh et al., 2007).

L. japonicus possède aussi un gène *NIN* jouant un rôle similaire à ce qui est observé chez *M. truncatula* (Schauser et al., 1999; Marsh et al., 2007).

2-3) Cytokinines et organogénèse nodulaire

Chez *L. japonicus*, le mutant *hit1* (*hyperinfected*) présente des déformations de poils absorbants normales, l'infection est correctement initiée en présence de *M. loti* et les cordons progressent jusque dans le cortex. Ces données indiquent que le gène *HIT1* n'est pas indispensable à l'infection. En revanche, les divisions corticales chez *hit1* sont bloquées suggérant que *HIT1* joue un rôle dans l'organogénèse nodulaire (Murray et al., 2007). De manière indépendante, d'autres travaux se sont intéressés au mutant *snf2* (*spontaneous nodule formation*) pour le même locus et formant des nodules spontanés chez *L. japonicus* (Tirichine et al., 2007). *hit1* et *snf2* sont deux mutations d'un même gène codant un récepteur histidine kinase, LjLHK1. LjLHK1 est composé de deux traverses membranaires encadrant un domaine CHASE de liaison aux

cytokinines et d'un domaine histidine kinase cytosolique accompagné d'un domaine receveur D (**Figure 17**). La mutation perte de fonction *hit1* est due à un site d'épissage modifié tandis que la mutation gain de fonction *snf2* se traduit par une substitution simple dans le domaine CHASE de LjLHK1, conférant au récepteur un état activé indépendant de la perception des cytokinines (Murray et al., 2007; Tirichine et al., 2007). Après transformation de racines de *L. japonicus* par *A. rhizogenes* avec l'allèle *snf2*, la formation de nodules spontanés est toujours observée dans les fonds génétiques mutants *Ljnfr5*, *Ljnfr1*, *Ljsymrk*, *Ljccamk* mais pas dans les fonds génétiques *Ljnsp2* et *Ljnin*. La formation de nodules spontanée par *snf2* dépend donc de *LjNIN* et de *LjNSP2* mais place le rôle de *LjLHK1* en aval de *LjCCamK* (Tirichine et al., 2007)

Chez *M. truncatula*, l'extinction par ARN interférent du gène *CRE1* codant un récepteur des cytokinines altère la nodulation. Ainsi, les infections sont initiées mais sont stoppées dans le poil ou à la base de l'épiderme. Aucune infection n'atteint les cellules corticales. L'expression des gènes *ENOD11*, *ENOD12* et *NIN* est aussi bloquée dans les racines après inoculation bactérienne (Gonzalez-Rizzo et al., 2006). A la différence de *LjLHK1*, *CRE1* pourrait donc être impliqué dans le processus d'infection du poil absorbant (Gonzalez-Rizzo et al., 2006). Il est cependant tentant d'attribuer des rôles similaires à *CRE1* et *LjLHK1* chez les deux légumineuses.

L'initiation des divisions corticales de manière coordonnée à la progression de l'infection dans l'épiderme laisse penser qu'il existe un signal entre l'épiderme et le cortex. L'étude de LjLHK1 chez *L. japonicus* a montré qu'un récepteur aux cytokinines est impliqué dans l'organogénèse nodulaire, de manière dépendante de deux autres acteurs symbiotiques *LjNIN* et *LjNSP2*. Les cytokinines pourraient remplir la fonction de signal relai entre l'épiderme et les cellules du cortex, coordonnant ainsi les processus d'infection et d'organogénèse.

3) Gènes requis pour l'infection

3-1) IPD3

La protéine IPD3 (Interacting Protein of DMI3) a été identifiée comme un partenaire de DMI3 par criblage double-hybride de levure (Messinese et al., 2007). IPD3, constituée principalement d'hélices α et de régions coiled-coil, est localisée dans le noyau des cellules racinaires de *M. truncatula*, et son interaction avec DMI3 a été confirmée par BiFC (Bimolecular Fluorescent Complementation) en système d'expression transitoire chez *Nicotiana benthamiana*.

Aucun phénotype de nodulation n'a pu être mis en évidence après la sous-régulation du gène *IPD3* par *ARN* interférent (Messinese et al., 2007). En revanche chez *L. japonicus*, l'orthologue de *IPD3* nommé *LjCYCLOPS*, joue un rôle positif dans la symbiose bactérienne et aussi mycorhizienne (Yano et al., 2008). Chez le mutant *Ljyclops*, les infections bactériennes sont bloquées après la formation de la crosse de berger et l'organogénèse des nodules ne dépasse pas le stade du primordium nodulaire. L'utilisation d'une forme auto-active de LjCCamK, capable de produire des nodules spontanés en absence de bactérie chez *L. japonicus*, a cependant montré que *LjCYCLOPS* n'est pas nécessaire pour l'organogénèse nodulaire. Cela suggère que l'arrêt du développement nodulaire est une conséquence indirecte des infections abortives (Yano et al., 2008). Il a été montré que comme *IPD3* pour *DMI3*, *CYCLOPS* est un partenaire du domaine kinase de LjCCamK. Il a de plus été montré que *CYCLOPS* est un substrat de LjCCamK *in vitro* (Yano et al., 2008).

3-2) *LIN* et *LjCERBERUS*

Les mutants *lin* de *M. truncatula* (*lumpy infection*) et *cerberus* de *L. japonicus* présentent des phénotypes similaires de formation d'un primordium nodulaire mais un arrêt dans la formation des cordons d'infection est observé pour les deux mutants. Les primordium nodulaires formés ne sont pas infectés et aucune fixation d'azote n'est effectuée chez ces deux mutants (Kuppusamy et al., 2004; Yano et al., 2009). L'induction du gène *ENOD40*, marqueur des étapes précoces de la symbiose chez *M. truncatula*, n'est pas affectée chez *lin*. Cependant une différence est observée en comparaison des plantes sauvages pour les marqueurs plus tardifs *ENOD2* et *ENOD8* (Kuppusamy et al., 2004). Une observation similaire est faite avec des marqueurs précoces ou tardifs chez *L. japonicus* (Yano et al., 2009). Le défaut d'induction des marqueurs tardifs pourrait résulter du fait que les primordium nodulaire ne se développent pas parce que non infectés.

L'expression de *LIN* chez un mutant *cerberus* de *L. japonicus* restaure la nodulation chez ce dernier, indiquant que ces gènes ont une fonction similaire dans les deux organismes modèles (Kiss et al., 2009). Chez *L. japonicus*, l'utilisation d'une forme auto-active de LjCCamK dans un fond génétique mutant *cerberus* a montré que *CERBERUS* n'est pas requis pour l'organogénèse nodulaire. L'induction de gènes précoces n'étant pas affectée non plus, cela suggère que *CERBERUS* joue un rôle dans l'infection. Un rôle similaire est proposé chez *M. truncatula* pour *LIN* (Kiss et al., 2009; Yano et al., 2009).



Figure 18. Organisation en domaines de LIN de *M. truncatula*

(A) LIN (1488 AA) est composé d'un domaine U-Box, d'une région armadillo-like et de trois répétitions WD40. Le domaine U-Box contient une activité E3 ubiquitine ligase putative. Les domaines armadillo-like et WD40 sont des domaines d'interaction protéine-protéine.

D'après Kiss et *al.*, 2009

Le clonage des deux gènes chez *M. truncatula* et *L. japonicus* a mené à l'identification de deux E3 ubiquitine ligase de la famille des U-Box contenant un domaine U-Box en leur centre et au moins trois répétitions WD40 dans leur partie C-terminale (**Figure 18**). Le domaine U-Box possède une activité E3 ubiquitine ligase putative et les répétitions WD40 sont des domaines d'interaction protéine-protéine (Kiss et al., 2009; Yano et al., 2009). Chez LIN, un domaine d'interaction protéine-protéine de type ARMADILLO-like est détecté entre le domaine U-Box et les répétitions WD-40 (Kiss et al., 2009). Aucun mécanisme moléculaire impliquant ces deux protéines dans la symbiose n'est pour l'instant connu.

4) Interférences entre organogénèse nodulaire et infection : vers un modèle génétique

Les gènes décrits précédemment peuvent être groupés en deux classes distinctes : (i) celle dont les mutants ne présentent plus de divisions cellulaires et (ii) celle dont les mutants sont affectés uniquement dans l'infection. La première classe comprend les gènes *NFP* (*LjNFR5*), *DMI2* (*LjSYMRK*), *DMI1* (*LjCASTOR*, *LjPOLLUX*), *DMI3* (*LjCCamK*) *NSP1/2* (*LjNSP1/2*), *NIN* (*LjNIN*), et *CRE1* (*LjLHK1*). Il apparaît de plus que parmi cette première classe de mutants, en plus de l'absence d'organogénèse, aucun événement d'infection dépassant la courbure du poil absorbant n'est observé, à l'exception notable du mutant *hit1* de *LjLHK1* chez *L. japonicus*. Dans la seconde classe de gènes dont les mutants sont bloqués dans l'infection, les mutant du gène *LIN* (*LjCERBERUS*) et *LjCYCLOPS* présentent une organogénèse stoppée. La dissection des rôles directs et indirects des produits de ces gènes dans les processus d'organogénèse et d'infection est donc rendu virtuellement impossible (Madsen et al., 2010).

Une étude menée chez *L. japonicus* est toutefois parvenue à disséquer les rôles de certains de ces gènes dans l'organogénèse et l'infection. Ainsi, comme présenté précédemment pour les gènes *NSP*, *CERBERUS* et *CYCLOPS*, les auteurs ont introduits plusieurs mutations chez les mutants de nodulation spontanée *snf1* et *snf2*. La formation de nodules et leur infection le cas échéant ont ensuite été déterminées (Madsen et al., 2010). Il a ainsi été montré dans un fond génétique *snf1* (*LjCcamK* auto-actif) que les gènes *LjSYMRK*, *LjCASTOR* et *LjPOLLUX* ne sont pas indispensables à l'infection des nodules spontanées. Le phénotype d'infection observé chez les mutants simples de ces trois gènes est donc une conséquence indirecte de l'arrêt du processus d'organogénèse (Madsen et al., 2010).

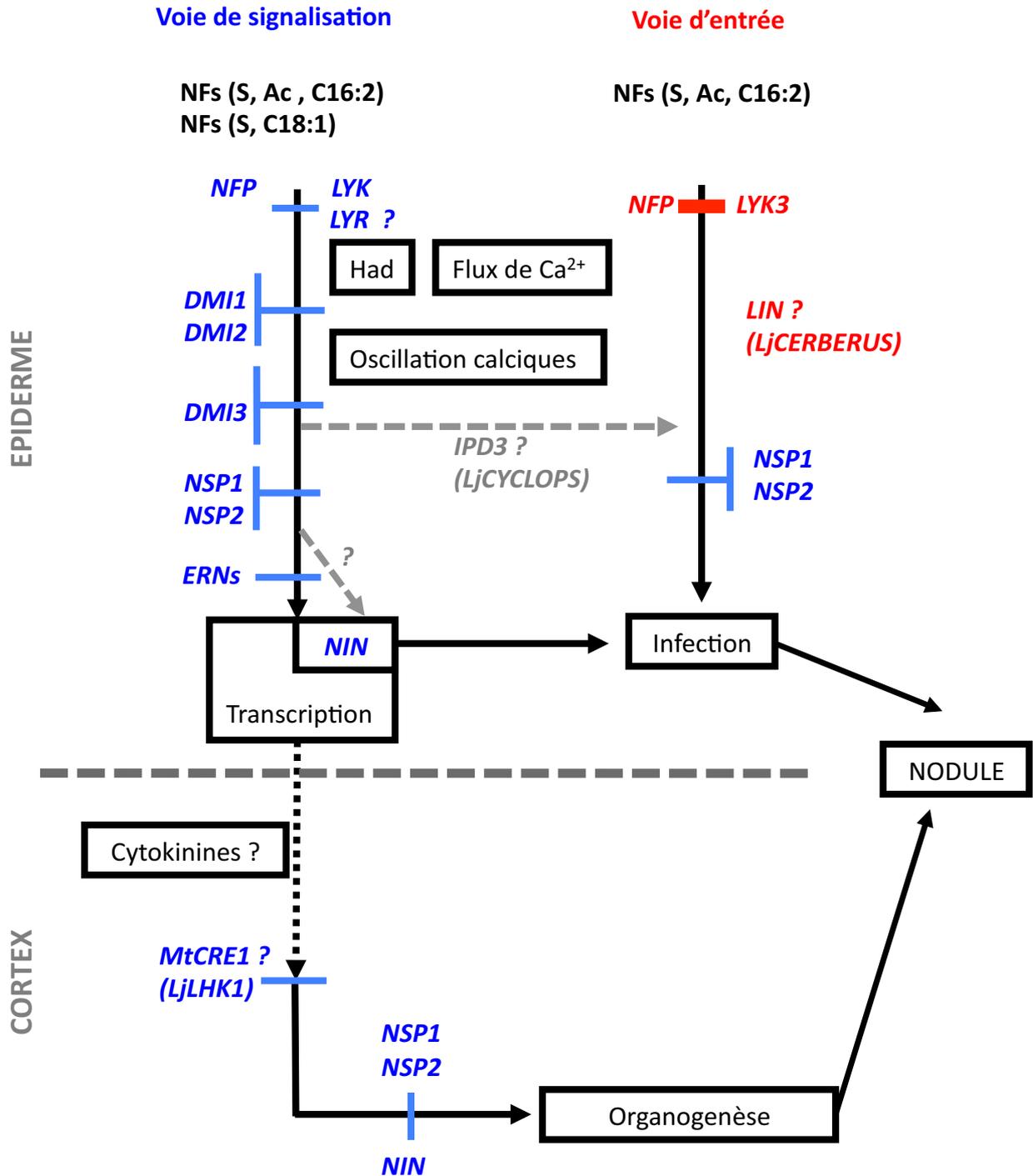


Figure 19. Modèle génétique des voies de signalisation impliquées dans la nodulation chez *M. truncatula*

Deux voies parallèles de réponses aux NFs sont représentées. L'une de signalisation menant à l'organogenèse dépend en premier lieu de NFP. La voie d'entrée dépend de LYK3 et de NFP.

Adapté de Smit et al., 2007 ; Madsen et al., 2010

De manière similaire, en générant des doubles mutants avec le mutant *snf2* (LjLHK1 auto actif), la même étude a démontré l'existence d'une interférence (cross-talk) entre la voie d'organogenèse et la voie d'infection située au niveau du gène LjCCamK (DMI3). En effet, les double mutants *Ljsymrk/snf2* et *Ljccamk/snf2* produisent des nodules spontanés mais qui restent non infectés (Madsen et al., 2010). Ces résultats indiquent donc que la forme activée de LjCcamK joue aussi un rôle dans le contrôle de l'infection, LjSYMRK participant à l'activation de LjCcamK. Ce contrôle sur l'infection par LjCcamK pourrait impliquer *LjCYCLOPS*, le double mutant *Ljcylops/snf1* produisant exclusivement des nodules non infectés (Madsen et al., 2010).

En se basant sur les travaux effectués sur les deux légumineuses modèles *M. truncatula* et *L. japonicus*, un modèle intégrant la voie de signalisation NFs et la voie d'entrée chez *M. truncatula* est représenté **figure 19**. La voie de signalisation dépend du LysM-RLK NFP et potentiellement d'un autre LysM-RLK, puis successivement des gènes DMI, NSP, ERN et NIN. Cette voie peu sélective quant à la structure des NFs mène à l'organogenèse nodulaire, et passerait par le relai d'un récepteur aux cytokinines dans le cortex. En parallèle, la voie d'entrée menant à l'infection et sélective quant à la structure des NFs est dépendante de NFP et de LYK3.

Tableau 3. Caractéristiques des trois sites de liaison aux NFs chez *Medicago sp.*

	NFBS1	NFBS2	NFBS3
Matériel	Racine	Culture cellulaire	Racine
Fraction concernée	3000g	Microsomes (MP)	3000g
Constante d'affinité	86 nM	4 nM	0,4 nM
Décorations des NFs reconnues :			
Groupement O-Acétate	Non	Oui	Non
Groupement N-Acyl	Non	Oui	Oui
Groupement O-Sulfate	Non	Non	Non
Présence chez les mutants :			
<i>nfp</i>	Présent	Présent	Présent
<i>dmi1</i>	Présent	Présent	Non détecté
<i>dmi2</i>	Présent	Présent	Non détecté
<i>dmi3</i>	Présent	Présent	Présent

D'après Bono et *al.*, 1995 ; Gressent et *al.*, 1999 ; Hogg et *al.*, 2006

IV) Etudes de la signalisation NFs par des approches biochimiques et pharmacologiques

1) Approches biochimiques

Afin d'aider à la caractérisation des complexes-récepteurs des NFs, des études biochimiques basées sur l'étude de la liaison à l'équilibre employant des NFs radioactifs ont été menées. Trois sites de liaison ont ainsi été caractérisés pour leur affinité aux NFs et leur capacité à discriminer les décorations présentes sur le sucre réducteur et non réducteur (**Tableau 3**).

Le premier, NFBS1 (Nod Factor Binding Site 1), est associé à une fraction de haute densité (3000g) obtenue à partir de racines de *M. truncatula* et présente une affinité modérée de 86 nM pour les NFs de *S. meliloti* (Bono et al., 1995). NFBS1 ne discrimine aucune substitution spécifique des NFs de *S. meliloti* (O-acétate, structure de l'acide gras et O-sulfate) et un site de même affinité existe chez la non légumineuse *Solanum esculentum* (Bono et al., 1995). Cela suggère que ce site ne joue pas de rôle spécifique à la symbiose et il pourrait être, par exemple, responsable de l'attachement des NFs à la paroi cellulaire (Cullimore et al., 2001). NFBS2, caractérisé chez des cellules en culture de *Medicago varia*, est situé au moins partiellement à la membrane plasmique. D'une affinité de 4nM pour les NFs, NFBS2 est sélectif pour les NFs avec un groupement O-acétate et distingue la longueur et l'insaturation de la chaîne grasse, deux modifications du sucre terminal non réducteur. En revanche, NFBS2 ne fait pas la distinction entre NFs sulfatés et non sulfatés (Gressent et al., 1999). Le dernier site de liaison NFBS3, caractérisé chez *M. truncatula* dans la même fraction que NFBS1, possède une affinité de 0,4 nM pour les lipo-chitooligosaccharides. Comme NFBS1, ce site ne discrimine pas les décorations spécifiques des NFs de *S. meliloti* (Hogg et al., 2006).

La caractérisation de ces trois sites de liaison chez les mutants *nfp* et les trois mutants *dmi* a montré qu'aucun de ces gènes n'est requis pour la formation de NFBS1 et NFBS2 chez *M. truncatula* (Hogg et al., 2006). En revanche, le site NFBS3 disparaît chez les mutants *dmi1* et *dmi2*, suggérant que DMI1 et DMI2 participent directement ou indirectement à la formation de NFBS3 (Hogg et al., 2006).

Le fait qu'aucun de ces sites de liaison ne soit sélectif pour les NFs sulfatés, malgré l'importance de cette modification pour l'induction des réponses symbiotiques chez *Medicago sp.*, suggère qu'il existe un ou plusieurs autres sites de liaison des NFs. Ce ou ces sites distingueraient spécifiquement cette modification.

2) Approches pharmacologiques

Des voies possibles d'activation des signaux calciques suite à l'application de NFs purifiés ont été identifiées par des approches pharmacologiques basées sur l'utilisation de mastoparan et d'inhibiteurs des phospholipases.

Le mastoparan est un peptide, agoniste des complexes hétérotrimériques de protéines G membranaires. Il a été montré que le mastoparan, comme les NFs, est capable d'induire la transcription du gène *ENOD12* et l'expression d'une fusion promoteur *pENOD11::GUS* chez *M. truncatula* ainsi que la déformation des poils chez *Vicia sativa* (Pingret et al., 1998; den Hartog et al., 2001; Charron et al., 2004).

Il a été vu précédemment que l'induction des gènes symbiotiques dépend d'oscillations calciques et ces dernières sont déclenchées dans le cytosol chez *M. truncatula* après application de mastoparan (Sun et al., 2007). Ces oscillations calciques sont toujours observées chez les mutants *nfp*, *dmi1* et *dmi2* suggérant que NFP, DMI1 et DMI2 ne sont pas indispensables à cette réponse, contrairement à ce qui est observée après application de NFs (Sun et al., 2007). En revanche, l'induction de la fusion *pENOD11::GUS* suite à l'application de mastoparan n'est plus observée chez le mutant *dmi3* indiquant que ces oscillations calciques sont décodées par DMI3 de manière similaire à une application de NFs (Charron et al., 2004). La persistance de cette réponse transcriptionnelle au mastoparan chez les mutants *nfp*, *dmi1* et *dmi2* pourraient indiquer que les protéines G sont impliquées en aval de ces trois acteurs dans la voie de transduction du signal NFs. Cependant, aucun lien direct n'est clairement établi par cette approche pharmacologique entre ces acteurs symbiotiques précoces et les protéines G. L'effet du mastoparan pourrait aussi être le résultat d'une voie de signalisation indépendante. Des travaux de recherche supplémentaires sont requis pour confirmer ou non l'implication des protéines G dans la réponse aux NFs.

Les oscillations calciques et l'induction de la fusion *pENOD11::GUS* après application de NFs ou de mastoparan sont dépendantes de l'activité des phospholipases C et D, responsables de la production des seconds messagers dont l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3). L'ajout de neomycine ou de *n*-Butanol, inhibiteur des phospholipases C et D respectivement, bloque les réponses transcriptionnelles observées après application de NFs ou de mastoparan (Pingret et al., 1998; den Hartog et al., 2001; Charron et al., 2004; Sun et al., 2007). L' IP_3 est un second messager permettant l'activation de canaux calciques. Il est donc possible que l' IP_3 participe à la

génération des oscillations calciques après perception des NFs, pouvant alors faire un lien entre l'activation de récepteurs membranaires et les réponses intracellulaires.

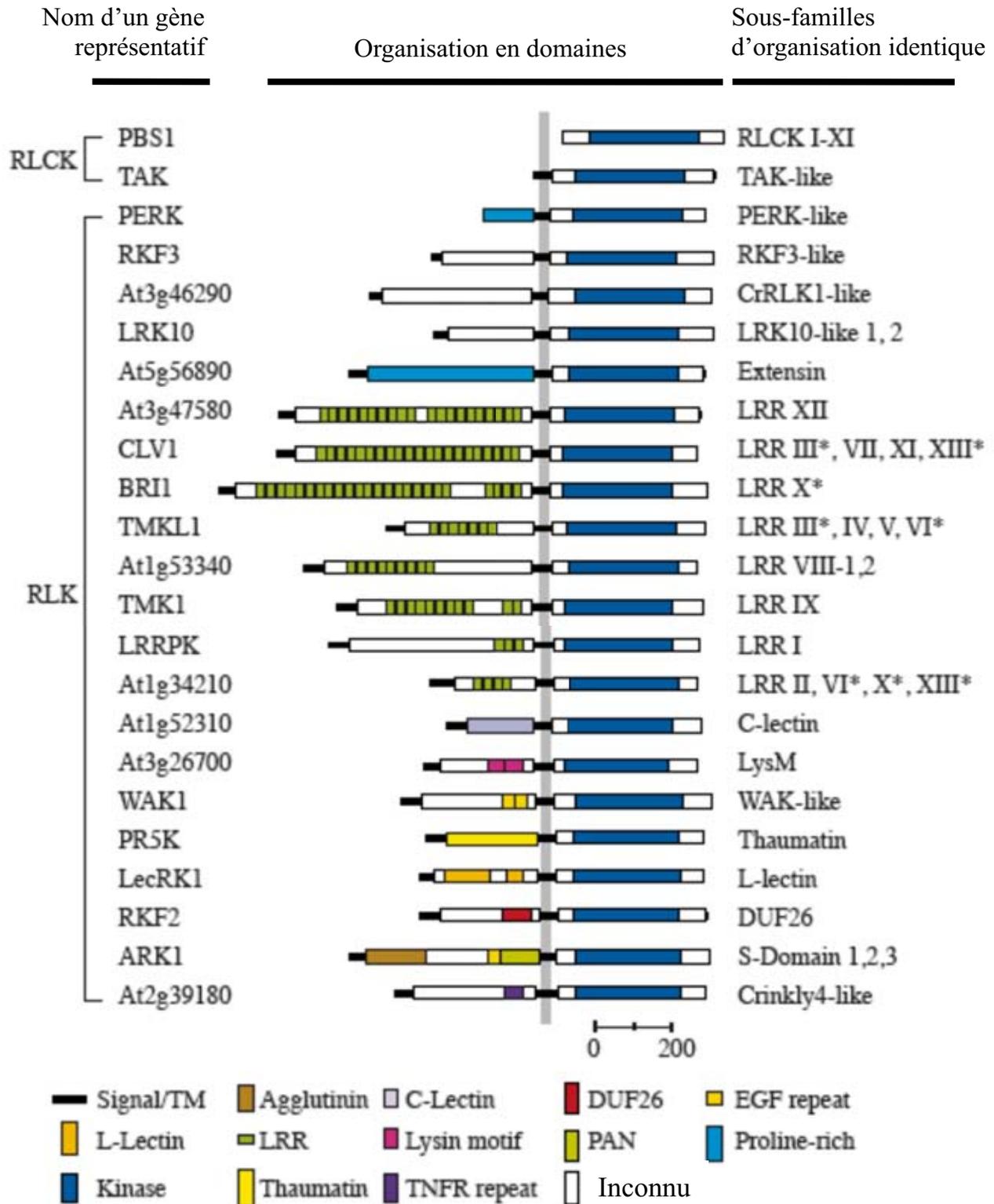


Figure 20. Sous-familles et organisation en domaines extracellulaires des RLKs d'*A. thaliana*

V) Récepteurs kinase et partenaires de signalisation

1) Diversité des RLKs et rôles biologiques

Percevoir des signaux variés grâce à des récepteurs à la surface des cellules pour induire une réponse adaptée est une propriété commune à tous les être vivants. Chez les animaux, la famille des récepteurs tyrosine kinase membranaires (RTKs) est à la base de nombreux évènements de signalisation. Chez l'homme, des RTKs mutés sont responsables de plusieurs maladies héréditaires. Cette classe de récepteurs est définie structurellement par l'enchaînement d'une région extracellulaire N-terminale pouvant percevoir un ligand, d'un segment transmembranaire et d'une région protéine kinase cytosolique C-terminale (Robertson et al., 2000). Chez les plantes, de nombreux stimuli endogènes ou exogènes peuvent être perçus par une classe de protéines membranaires de topologie similaire.

L'analyse de la séquence du génome d'*A. thaliana* a permis de dénombrer au moins 610 protéines contenant un segment transmembranaire et un domaine protéine kinase homologue à celui des RTKs animaux. Ces protéines ont été nommées RLKs pour « Receptor-Like Kinase ». Parmi elles, les récepteurs possédant une région extracellulaire représentent la majeure partie avec 417 membres. L'abréviation RLCKs (Receptor-Like Cytoplasmic Kinases) désigne les protéines de la famille dépourvues de région extracellulaire et prédites pour être solubles. Les domaines protéine kinase des RLKs se distinguent de ceux des RTKs animaux par le fait qu'ils possèdent certains motifs suggérant une activité sérine/thréonine kinase. Une analyse phylogénétique des domaines kinases de ces RLKs a permis de les diviser en 44 sous-familles, dont 32 contiennent un domaine extracellulaire (**Figure 20**) (Shiu and Bleeker, 2001a).

1-1) Diversité des domaines extracellulaires des RLKs

Les RLKs présentent un domaine kinase cytosolique homologue et se distinguent principalement par la diversité de leurs domaines extracellulaires. Chez *A. thaliana*, cette diversité des domaines extracellulaires a permis de définir 21 groupes distincts (Figure 20). De manière intéressante, les sous-familles de RLKs issues de l'analyse phylogénétique basée sur les domaines kinases ont une tendance à regrouper les RLKs arborant des domaines extracellulaires similaires.

Cela suggère que des événements anciens de recombinaisons entre les domaines kinases et les domaines extracellulaires ont mené au fondement de chaque sous-famille de RLKs (Shiu and Bleecker, 2001b, a).

Les domaines extracellulaires des RLKs peuvent contenir divers motifs. Ainsi, le motif EGF (Epidermal Growth Factor-Like Domain), seul motif retrouvé à la fois chez les récepteurs animaux et végétaux, serait impliqué dans les interactions protéine-protéine (Handford et al., 1995), tout comme le motif riche en leucine (LRR : Leucine Rich Repeat) (Kobe and Deisenhofer, 1994). D'autres motifs sont spécialisés dans la liaison de sucres et sont collectivement nommés domaines Lectines. Il existe plusieurs catégories de Lectines, comme par exemple les Lectines de légumineuses pouvant lier de nombreux disaccharides (Legume-Lectin) ou le motif Agglutinine, pouvant lier spécifiquement l' α -D-mannose (Hester et al., 1995). Enfin, comme présenté dans une section précédente, les motifs LysM jouent un rôle dans la reconnaissance du PG, de la chitine et potentiellement des NFs.

Il a ainsi été proposé que la nature du domaine extracellulaire d'un RLK pourrait aider à rétrécir le champ d'investigation sur la nature de ses ligands potentiels. Cependant, cela n'est pas une règle absolue. En effet, le récepteur LRR-RLK BRI1 d'*A. thaliana* lierait les brassinostéroïdes grâce à une région sans homologie connue (Island) et intercalée entre ses motifs LRRs (Wang et al., 2001; Kinoshita et al., 2005), alors que la présence de nombreux motifs LRRs aurait plutôt suggéré la liaison d'un peptide.

1-2) Exemples de rôles biologiques des RLKs

Le nombre important de récepteurs kinases découverts chez *A. thaliana*, et maintenant chez d'autres espèces végétales, laisse imaginer de la variété de fonctions remplies par cette classe de protéines. Différentes études menées chez *A. thaliana*, *O. sativa* ou *Brassica napus* ont révélé pour les RLKs des rôles dans le développement ou dans les interactions avec les microorganismes.

Les récepteurs CLAVATA1 (CLV1) et Brassinosteroïd insensitive 1 (BRI1) d'*A. thaliana*, et le récepteur S-Locus Receptor Kinase (SRK) chez *B. napus* sont tous les trois impliqués dans des processus essentiels au développement des plantes. Le LRR-RLK CLV1 joue un rôle primordial dans le contrôle du nombre de cellules indifférenciées de la zone centrale du méristème apical. Le mutant *clv* (*clavata*) pour ce gène accumule les cellules indifférenciées dans la zone centrale du méristème, se traduisant à terme par de multiples effets sur la morphologie de la plante

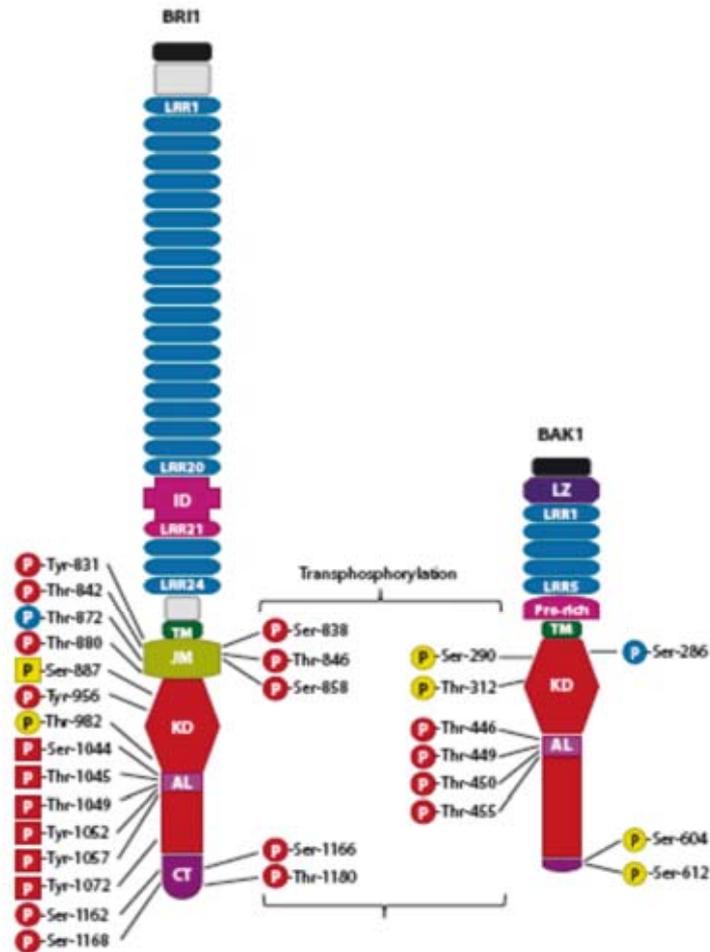


Figure 21. Structure des RLKs BRI1 et BAK1 d'*A. thaliana*

BRI1 est composé de 24 Leucine-Rich-Repeats (LRR) et d'un domaine "island" de 70 acides aminés, d'un domaine transmembranaire (TM), d'un domaine juxta-membranaire (JM), d'un domaine kinase (KD) et d'une région C-terminale (CT). BAK1 est composé de 4 leucine Zipper (LZ) et 5 LRRs, d'une région riche en proline, d'un TM, d'un JM, d'un KD et d'un CT. La boucle d'activation de kinase est désignée AL. Les sites de phosphorylation confirmés sont indiqués d'un cercle et les putatifs d'un carré. Les sites d'activation sont marqués en rouge et ceux d'inhibition en bleu. Les résidus sans effet significatif sur l'activité ou non testés expérimentalement sont marqués en jaune.

D'après Kim et al., 2010

comme des tiges fasciées, des organes floraux anormaux et une phyllotaxie perturbée (Clark et al., 1993). Les brassinostéroïdes, hormones végétales jouant un rôle important dans la croissance en promouvant l'élongation cellulaire à des concentrations de l'ordre du nanomolaire, sont perçus chez *A. thaliana* par le LRR-RLK BRI1 (Li and Chory, 1997). Enfin, le récepteur SRK, qui contient une association de plusieurs motifs extracellulaires dont un motif EGF et deux Lectin-like, est impliqué dans le phénomène d'auto-incompatibilité chez les Brassicacées (Ivanov et al., 2010).

Au delà de ces processus développementaux, les RLKs sont aussi impliqués dans les interactions entre les plantes et microorganismes. En plus des rôles symbiotiques de DMI2, NFP et LYK3 chez *M. truncatula*, les récepteurs kinase ont joué un rôle déterminant dans la réponse immune des plantes aux pathogènes. Dans le cas de la réponse immune non-hôte spécifique d'*A. thaliana*, les LRR-RLKs Flagellin sensitive 2 (FLS2) et EF-Tu Receptor (EFR) activent des voies de signalisation suite à la perception des peptides bactériens (Gomez-Gomez et al., 2001; Chinchilla et al., 2006; Zipfel et al., 2006). Chez *O. sativa*, le gène de résistance Xa21 codant un LRR-RLK est impliqué dans la réponse immune hôte-spécifique au pathogène *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* race 6 (*Xoo*) (Wang et al., 1998).

2) Mode d'action des RLKs, BRI1 et SRK en exemples

2-1) Perception et activation de la voie de signalisation des brassinostéroïdes

Le clonage de gènes mutés et responsables d'une insensibilité aux brassinostéroïdes (BRs) chez *A. thaliana* a mené à l'identification du récepteur LRR-RLK BRI1 (Li and Chory, 1997). Le domaine extracellulaire de BRI1 contient 24 LRRs et un domaine ID (Island) entre la 20^{ème} et 21^{ème} répétition LRR. La région cytoplasmique contient un domaine juxtamembranaire (JM), une kinase et une extension C-terminale (**Figure 21**) (Kim and Wang, 2010). La capacité de BRI1 à lier les BRs a été démontrée par des expériences de cross-linking utilisant une forme active de BR photo-activable et biotynilé (Kinoshita et al., 2005).

Les études chez l'animal ont montré que l'activation des RTKs implique généralement leur oligomérisation provoquée et/ou stabilisée par la liaison du ligand. Cette oligomérisation peut intervenir sous forme d'homo- ou d'hétéro-oligomère avec un autre RTK (Schlessinger, 2000). De nombreux travaux sur la caractérisation de BRI1 et de ses partenaires, souvent couplés à des

études de phosphorylation ont permis de disséquer les événements de signalisation activés suite à la perception de BRs chez *A. thaliana* (Chinchilla et al., 2009; Kim and Wang, 2010). Plusieurs partenaires de BRI1 ont été caractérisés dont la protéine riche en sérine BRI1 Kinase Inhibitor 1 (BKI1), deux isoformes de RLCKs nommés BRs Signaling Kinases (BSKs) et le LRR-RLK BRI1-Associated Kinase 1 (BAK1) (Nam and Li, 2002; Wang and Chory, 2006; Tang et al., 2008a; Tang et al., 2008b).

Ainsi, des homo-oligomères du récepteur ont été détectés *in vivo* à la membrane plasmique par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) (Rusinova et al., 2004). Il est estimé qu'environ 20% des récepteurs BRI1 sont sous cette forme d'homo-oligomères à la membrane plasmique, indépendamment de la présence de BRs (Wang et al., 2005a; Hink et al., 2008).

L'application de BRs chez *A. thaliana* provoque l'interaction entre BRI1 et BAK1 et induit une phosphorylation des deux RLCKs sur plusieurs résidus thréonine de leur domaine kinase (Wang et al., 2005b) (figure 21). Cette association BRs-dépendante entre les deux RLCKs requiert un domaine kinase de BRI1 actif mais la réciproque n'est pas vraie. Après application de BRs *in planta*, BAK1 est phosphorylé de manière dépendante de l'activité de BRI1. Il est intéressant de noter que le niveau de phosphorylation de BRI1 est en retour augmenté par l'activité kinase de BAK1, suggérant un rôle positif de BAK1 sur l'état d'activation de BRI1. Des transphosphorylations entre les domaines kinases de ces deux RLCKs sont par la suite été observées *in vitro*, suggérant que cette modulation de l'activité de BRI1 par BAK1 se fait par phosphorylation. L'utilisation du peptide synthétique BR13, substrat spécifique de BRI1 *in vitro*, a montré que l'activité kinase de BAK1 augmente le potentiel de transphosphorylation du peptide BR13 par BRI1 (Wang et al., 2008). L'interaction entre BRI1 et BAK1 est donc à la base d'une succession d'événements de phosphorylation, permettant une pleine activation du récepteur BRI1 (Wang et al., 2008).

Issu d'un criblage double-hybride de levure, BKI1 interagit spécifiquement avec le domaine cytosolique de BRI1 parmi plusieurs domaines cytosoliques de récepteurs kinases. BKI1, bien que ne possédant pas de domaine transmembranaire, est associé à la membrane plasmique chez *A. thaliana*. Cette association à la membrane plasmique est rompue après traitement avec des BRs excepté chez un mutant *bril* dépourvu activité kinase, suggérant que l'activité kinase de BRI1 est requise pour cette réponse. *In vitro*, BKI1 inhibe l'interaction entre les domaines kinases de BRI1 et BAK1. La surexpression d'une forme membranaire constitutive de BKI1 par l'introduction d'un site de myristoylation induit un phénotype proche de celui des mutants *bril*.

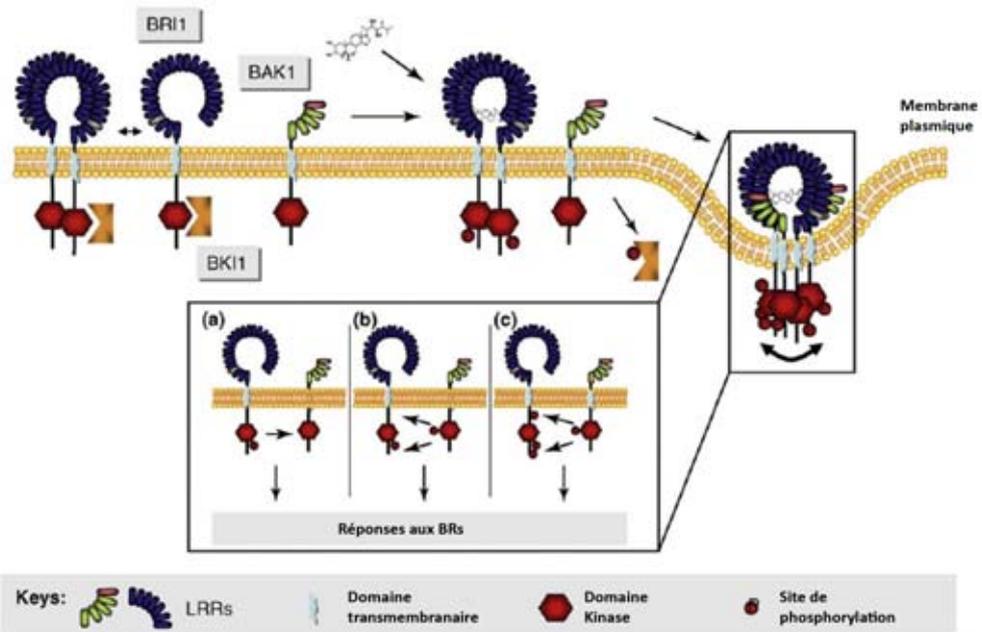


Figure 22. Modèle des premières étapes de la voie de signalisation des brassinostéroïdes chez *A. thaliana*

Le domaine kinase de BRI1 est sous l'inhibition de BKI1 avant perception des BR. Après perception des BR et dimérisation de BRI1, le partenaire BAK1 est recruté et BKI1 dissocié du complexe. Plusieurs transphosphorylations entre les RLKs partenaires mènent à la réponse aux BR.

D'après Chinchilla et al., 2009

Ces données suggèrent donc un rôle négatif de BKI1 sur BRI1, en empêchant l'interaction avec son co-récepteur BAK1 à la membrane (Wang and Chory, 2006).

Les protéines kinases BSKs d'*A. thaliana* (BSK1 et BSK2) ont été identifiées comme étant spécifiquement phosphorylées après application de BRs. Localisées à la membrane avant et après traitement aux BRs, leur phosphorylation dépend de la présence d'une forme active de BRI1 suggérant que les BSKs sont des substrats de BRI1 (Tang et al., 2008b). Les auteurs ont montré *in vitro* que le domaine kinase de BRI1 est capable de phosphoryler BSK1, contrairement à celui de BAK1 (Tang et al., 2008b). La surexpression de plusieurs isoformes de BSKs peut compléter le phénotype d'un mutant faible *bril*, suggérant un rôle positif de ces protéines dans la voie de signalisation des BRs (Tang et al., 2008b).

Ces données permettent d'établir un modèle du mode d'action pour le récepteur BRI1 chez *A. thaliana* (**Figure 22**). Présent sous forme de dimères, BRI1 s'auto-phosphoryle après perception des brassinostéroïdes. Cela induirait la dissociation de BKI1 et le recrutement de BAK1, avec lequel plusieurs transphosphorylations activatrices ont lieu. Les RLCKs BSKs seraient ensuite phosphorylés par BRI1 et serviraient, avec plusieurs autres régulateurs, de relai dans la réponse transcriptionnelle aux BRs.

2-2) Transduction du signal dans le phénomène d'auto-incompatibilité

L'incompatibilité sexuelle chez certaines plantes est observée dans le cas d'une pollinisation entre haplotypes identiques. Ainsi, le pollen d'un haplotype donnée ne peut croître sur un stigmate du même haplotype. On parle alors d'auto-incompatibilité sexuelle ou réponse SI (Self-Incompatibility). Chez les Brassicacées, le phénomène d'auto-incompatibilité implique la reconnaissance d'une protéine de surface du pollen par un récepteur membranaire des cellules du stigmate. L'haplotype de chacun est défini par les séquences polymorphiques de leurs gènes codants, tous deux localisés dans le locus S (S-locus) (Kemp and Doughty, 2003).

La protéine de surface du pollen SCR (S-locus Cystéine Rich) est un ligand pour le récepteur membranaire SRK du stigmate et cette interaction SCR/SRK n'a lieu qu'entre protéines issues d'un même haplotype (Kachroo et al., 2001; Ivanov and Gaude, 2009). Les protéines SCR et SRK sont les déterminants de l'auto-incompatibilité mâle et femelle respectivement (Schopfer et al., 1999; Takasaki et al., 2000). Le mode d'action de SRK implique sa phosphorylation entre 40 et 60 minutes après auto-pollinisation chez *Brassica oleracea* (Cabrillac et al., 2001). Les

mécanismes en aval de cette phosphorylation sont mal connus. Cependant, deux protéines partenaires de SRK régulant positivement la réponse SI ont été identifiées.

MLPK (M-Locus Protein Kinase) est une protéine kinase du groupe des RLCKs (Murase et al., 2004). Identifié chez *Brassica rapa*, les plantes homozygotes mutantes pour ce gène ne montrent plus de réponse d'auto-incompatibilité, indiquant un rôle positif de MLPK dans la réponse SI. Il existe deux isoformes de la protéine MLPK, MLPKf1 et MLPKf2, issues d'un épissage alternatif de la même séquence codante (Kakita et al., 2007). Les deux isoformes sont localisées à la membrane plasmique, MLPKf1 étant adressée par N-myristoylation et MLPKf2 par association d'un domaine hydrophobe avec la membrane plasmique. Des expériences de BiFC ont montré que les deux formes peuvent interagir avec SRK *in planta*, suggérant un rôle de MLPK dans la transduction du signal SI après activation par SRK (Kakita et al., 2007).

La seconde protéine, ARC1 (ARM Repeat Containing 1), a été identifiée par criblage double-hybride de levure contre le domaine cytosolique de SRK (Gu et al., 1998; Stone et al., 1999). ARC1 code une protéine E3 ubiquitine ligase de la famille des U-Box contenant un large domaine N-terminal de fonction inconnue, un domaine U-Box en son milieu et plusieurs motifs d'interaction protéine-protéine Armadillo (ARM) dans sa région C-terminale. Les auteurs ont montré *in vitro* que l'interaction SRK/ARC1 est dépendante de l'état phosphorylé de SRK et que le domaine kinase de ce dernier peut phosphoryler ARC1 (Gu et al., 1998). De manière intéressante, MLPK transphosphoryle ARC1 plus efficacement que SRK dans les mêmes conditions, suggérant une interaction ARC1/MLPK et par conséquent l'existence d'un complexe entre ARC1, MLPK et SRK *in planta* (Samuel et al., 2008). La sous-régulation de l'expression de ARC1 par ARN antisens inhibe partiellement la réponse d'auto-incompatibilité, indiquant un rôle positif de ARC1 dans l'auto-incompatibilité (Stone et al., 1999). Exprimée exclusivement dans le pistil chez *B. napus* (Gu et al., 1998), la protéine ARC1 montre une localisation cytosolique en système d'expression hétérologue (BY-2) (Stone et al., 2003). La co-expression de ARC1 et du domaine kinase de SRK entraîne une relocalisation de ARC1 dans des structures internes contenant des marqueurs du réticulum endoplasmique et du protéasome 26S. Cette relocalisation dépend de l'activité kinase de SRK et du domaine U-Box de ARC1 (Stone et al., 2003). En comparaison d'une allopollinisation, une plus grande quantité de protéines ubiquitinées est détectée dans le pistil après autopollinisation chez *B. napus*. Cette augmentation de la quantité de protéines ubiquitinées après autopollinisation n'est plus observée chez les plantes dont l'expression de *ARC1* est sous-régulée par ARN antisens (Stone et al., 2003). Ensemble, ces

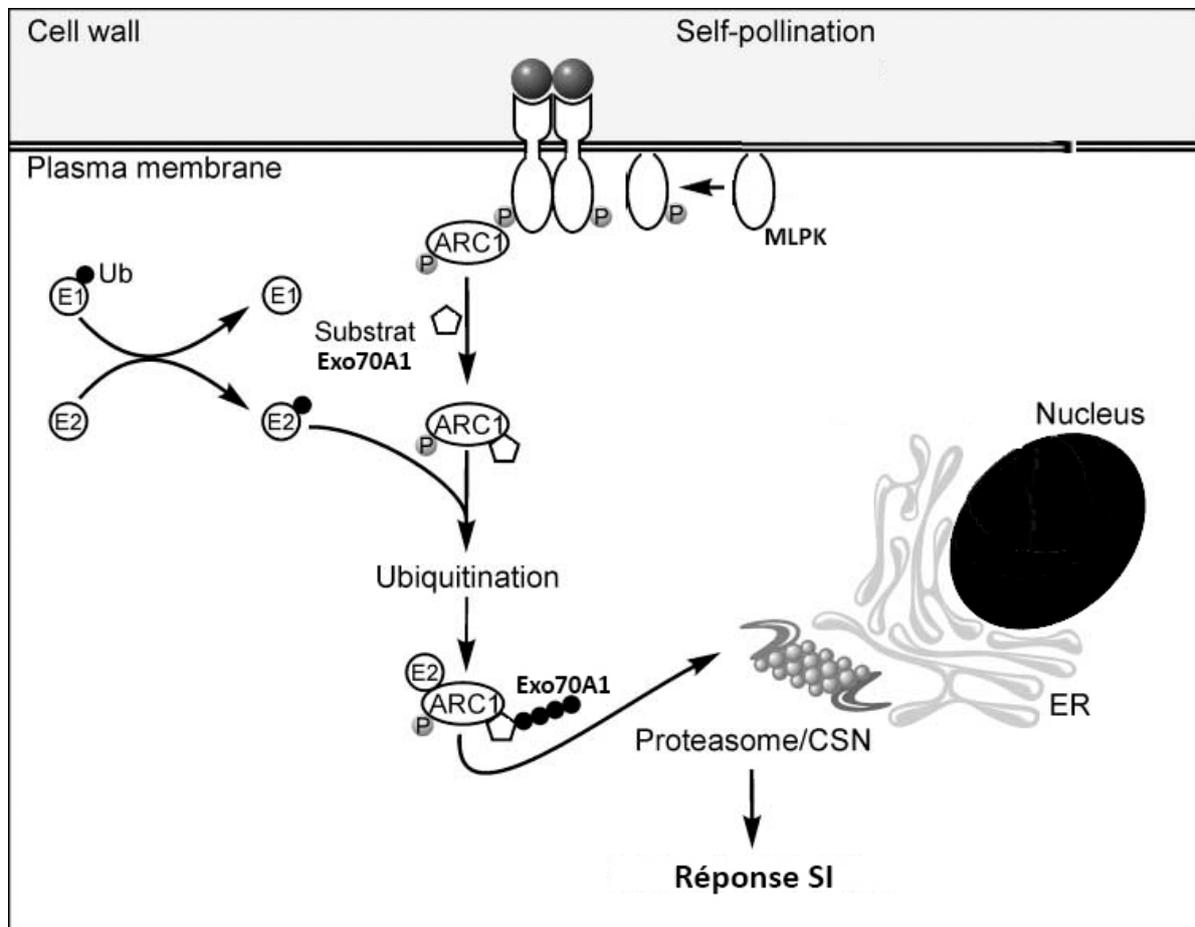


Figure 23. Modèle de la réponse d'auto-incompatibilité chez les Brassicacées

L'activation de SRK après perception de pollen incompatible se traduit par une phosphorylation du récepteur et le recrutement potentiel de MLPK. La forme phosphorylée de SRK permet le recrutement de ARC1 qui est à son tour phosphorylé par SRK et peut-être MLPK. ARC1 phosphorylé relocalise dans des structures pouvant être le protéasome, à la surface cytosolique des membranes du ER. Cette relocalisation s'accompagnerait du recrutement de Exo70A et de son ubiquitination. Cette ubiquitination serait suivie de la dégradation de Exo70A, menant à une réponse incompatible.

résultats suggèrent une activation de l'activité E3 ubiquitine ligase de ARC1 par SRK durant la réponse d'incompatibilité, entraînant alors l'ubiquitination de substrats par ARC1.

En aval dans la voie de signalisation SI, la recherche de partenaires de ARC1 par double-hybride de levure a permis l'identification la protéine Exo70A1 de *B. napus* (Samuel et al., 2009). Il a été montré que Exo70A1 est un substrat de l'activité E3 ubiquitine ligase de ARC1 *in vitro* (Samuel et al., 2009). L'extinction du gène *Exo70A1* par ARN interférent se traduit par une pollinisation réduite en condition compatible tandis que la surexpression de Exo70A1 produit l'effet inverse, en diminuant le rejet de pollen non compatible. Cela démontre un rôle positif de Exo70A1 dans la pollinisation (Samuel et al., 2009). Exo70A1 est une protéine sous-unité du complexe « Exocyst » formé de huit composantes au total (SEC3, SEC5, SEC6, SEC8, SEC10, SEC15, Exo70 et Exo84). Ce complexe est impliqué dans la fusion de vésicules à la membrane plasmique durant les phénomènes de sécrétion polarisée (Chong et al., 2010). Cette fonction dans la sécrétion permettrait d'expliquer le phénotype d'hydratation du pollen observé chez les plantes RNAi-*Exo70A1* ou surexprimant Exo70A1. En effet, l'hydratation du pollen est inhibée chez les lignées ARN interférent *Exo70A1* en condition compatible et maintenue chez les lignées surexprimant *Exo70A1* en situation incompatible (Samuel et al., 2009). Il est donc possible de spéculer que l'hydratation du pollen serait le mécanisme par lequel ce dernier est accepté ou rejeté.

Un modèle de la réponse SI est proposé **Figure 23**. Après perception de pollen incompatible, l'activation de ARC1 par SRK et MLPK induirait l'ubiquitination de Exo70A1 et sa dégradation (Cf. partie suivante). Cette dégradation de Exo70A mènerait alors au rejet du pollen incompatible par inhibition de l'hydratation.

3) Les E3 ubiquitine ligases comme partenaires de RLKs

La capacité des récepteurs kinases animaux (RTKs) à interagir avec des protéines de la classe des E3 ubiquitine ligases est connue depuis plus d'une dizaine d'année, à travers l'exemple chez l'homme du récepteur EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) et de son partenaire c-Cbl (Casitas B-lineage lymphoma) de la classe des E3 ubiquitine ligase (Swaminathan and Tsygankov, 2006). Chez les plantes, trois systèmes biologiques ont rapporté ce type d'interaction entre un RLK et une E3 ubiquitine ligase : le cas SRK/ARC1 présenté précédemment (Gu et al., 1998), le cas de NtPUB4, partenaire du récepteur Chitinase-Related RLK 1 (CHRK1) chez *Nicotiana tabacum* (Kim et al., 2003), et le cas de Xa21 Binding 3 (XB3), partenaire du RLK Xa21 chez le riz (Wang et al., 2006). Les deux premiers cas impliquent deux E3 ubiquitine ligases de la famille des protéines U-Box/ARM. Une présentation de la fonction des E3 ubiquitine ligase ainsi que les rôles physiologiques de certaines protéines U-Box/ARM est présentée dans cette partie.

3-1) L'ubiquitination

3-1-1) *Mécanisme général*

L'ubiquitination est le nom donné au processus qui permet la liaison covalente sur une protéine substrat d'un peptide de 76 résidus, l'ubiquitine (Ub). Ubiquitaire comme son nom l'indique, l'ubiquitine a été retrouvée chez tous les eucaryotes étudiés. Sa séquence protéique est invariante chez les plantes supérieures et ne présente qu'un et trois résidus substitués en comparaison des séquences de la levure et de l'homme, respectivement (Callis et al., 1995).

De même que la phosphorylation, l'ubiquitination d'une cible protéique est un processus ATP-dépendant et réversible. Ce processus se déroule en trois étapes, chacune nécessitant l'intervention d'une enzyme. Ces enzymes sont nommées E1, E2 et E3. Cette cascade de réactions débute par l'activité de l'enzyme E1 (activateur de l'ubiquitine). La E1 catalyse la formation d'un lien AMP-Ub sur la glycine terminale (G76) de l'Ub avant la formation d'un lien thiol-ester entre cette glycine terminale activée de l'Ub et un résidu cystéine contenu dans la E1. Ainsi activée, l'ubiquitine est transférée sur un résidu cystéine de l'enzyme E2 par transestérification. Enfin, cet intermédiaire E2-Ub permet le transfert de l'Ub sur un résidu lysine du substrat final par l'action

d'une E3 ubiquitine ligase dont le rôle est la reconnaissance spécifique de ce substrat (Smalle and Vierstra, 2004). Le résultat de cette cascade est donc l'ajout d'un monomère d'ubiquitine, par sa glycine C-terminale, sur une lysine du substrat (**Figure 24**). A l'inverse, la dé-ubiquitination est une fonction remplie par les enzymes DUB (Deubiquitinating enzymes).

3-1-2) Plusieurs types d'ubiquitination, plusieurs conséquences

On distingue plusieurs types d'ubiquitination, en nombre (mono-, poly-, multi-) et en qualité. La mono-ubiquitination fait référence à l'ajout d'un seul monomère d'ubiquitine sur une lysine du substrat tandis que la multi-ubiquitination fait référence à la somme de plusieurs mono-ubiquitinations d'un même substrat. La poly-ubiquitination indique l'ajout de plusieurs ubiquitines sur un seul résidu lysine du substrat par itérations de la cascade E1/E2/E3 (Smalle and Vierstra, 2004). Cependant, on distingue différents types de poly-ubiquitinations suivant la lysine utilisée sur chaque monomère de l'ubiquitine pour former le polymère d'ubiquitine. La séquence de l'ubiquitine possède sept résidus lysine susceptibles de servir à la liaison dans le polymère, augmentant le nombre de combinaisons possibles (Peng et al., 2003).

Ces différentes modifications peuvent chacune mener à des réponses spécifiques. Par exemple chez les plantes, le type de poly-ubiquitination le plus abondant est celui résultant de la liaison entre les résidus Lys48 de l'ubiquitine. Cela forme un signal de dégradation des substrats par l'adressage de ces derniers au complexe du protéasome 26S. Le protéasome 26S assure ensuite la dégradation des protéines ubiquitinées (Vierstra, 2003). Chez l'animal, il a été montré que la mono-ubiquitination peut aussi servir de signal de dégradation des substrats. Cependant dans ce cas, c'est la voie lysosome/vacuole qui est utilisée (Hicke, 2001). Bien que l'adressage des substrats pour leur dégradation soit un résultat majeur de leur ubiquitination (Smalle and Vierstra, 2004), cette modification post-traductionnelle peut aussi avoir d'autres effets. Ainsi, l'activité de facteurs de transcription peut être modifiée par leur mono-ubiquitination (Bach and Ostendorff, 2003). La poly-ubiquitination de type Lys63 des histones joue un rôle dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Enfin, la mono-ubiquitination peut intervenir dans la formation de complexes protéiques par l'adhésion de domaines protéiques pouvant lier l'ubiquitine (Schnell and Hicke, 2003).

3-1-3 Les différents types d'E3 ubiquitine ligases chez les plantes

Chez *A. thaliana*, il est estimé que plus de 1400 protéines, soit plus de 5% du génome, sont liées au processus d'ubiquitination (Smalle and Vierstra, 2004). Il est dénombré deux protéines E1 chez *A. thaliana*, dont l'une pourrait être localisée dans le noyau (Hatfield et al., 1997) et 37 isoformes de E2, réparties en 12 sous-familles. La reconnaissance du substrat est une fonction des enzymes E3. Il est donc attendu qu'elles soient présentes en grand nombre, et en effet, il en est dénombré plus de 1300 chez *A. thaliana*. Quatre types d'E3 ubiquitine ligases ont jusqu'à présent été déterminés, en fonction de leur composition en sous-unités et de leur mode d'action. Il s'agit des types HETC (Homology to E6AP C Terminus), RING/U-Box (Real Interesting New Gene), SCF (Skp1/Cullin/F-Box Complex) et APC (Anaphase Promoting Complex). La plante modèle *A. thaliana* compte 7 protéines à domaine HETC, 480 protéines à domaine RING et 64 protéines à domaine U-Box. Les domaines HETC, RING et U-Box sont souvent associés à d'autres domaines, pour la plupart suspectés d'être à l'origine de l'interaction avec les substrats. Les cas des E3 ligases des groupes SCF et APC sont plus complexes, chacun étant constitué de plusieurs sous-unités. Le complexe SCF est constitué de 4 sous-unités (RBX- Skp – Cullin – F-Box) et le complexe APC est constitué d'au moins 11 sous-unités (Smalle and Vierstra, 2004). Il est par conséquent difficile de dénombrer avec précision le nombre de complexes SCF et APC formés. Chez *A. thaliana* cependant, l'existence de plus de 700 gènes codant pour des protéines de type F-Box suggère l'existence d'un nombre au moins égal de complexes SCF différents (Gagne et al., 2002). Dans le cas des complexes APC, la plupart des sous-unités sont codées par un gène unique, suggérant en réalité l'existence d'un faible nombre de complexes différents (Smalle and Vierstra, 2004).

3-2) Protéines à domaine U-Box et fonctions des protéines UND-PUB-ARM

A l'inverse des domaines HETC ou RING, pour lesquels le nombre de protéines prédites est relativement stable entre eucaryotes, un plus grand nombre de protéines à domaine U-Box (PUB : Plant U-Box) est retrouvé chez les plantes (Patterson, 2002). Les génomes de la levure et de l'homme en contiennent 2 et 21 respectivement, alors que le génome d'*A. thaliana* en contient 64 et celui du riz 77 (Azevedo et al., 2001; Zeng et al., 2008). Cette expansion des protéines U-

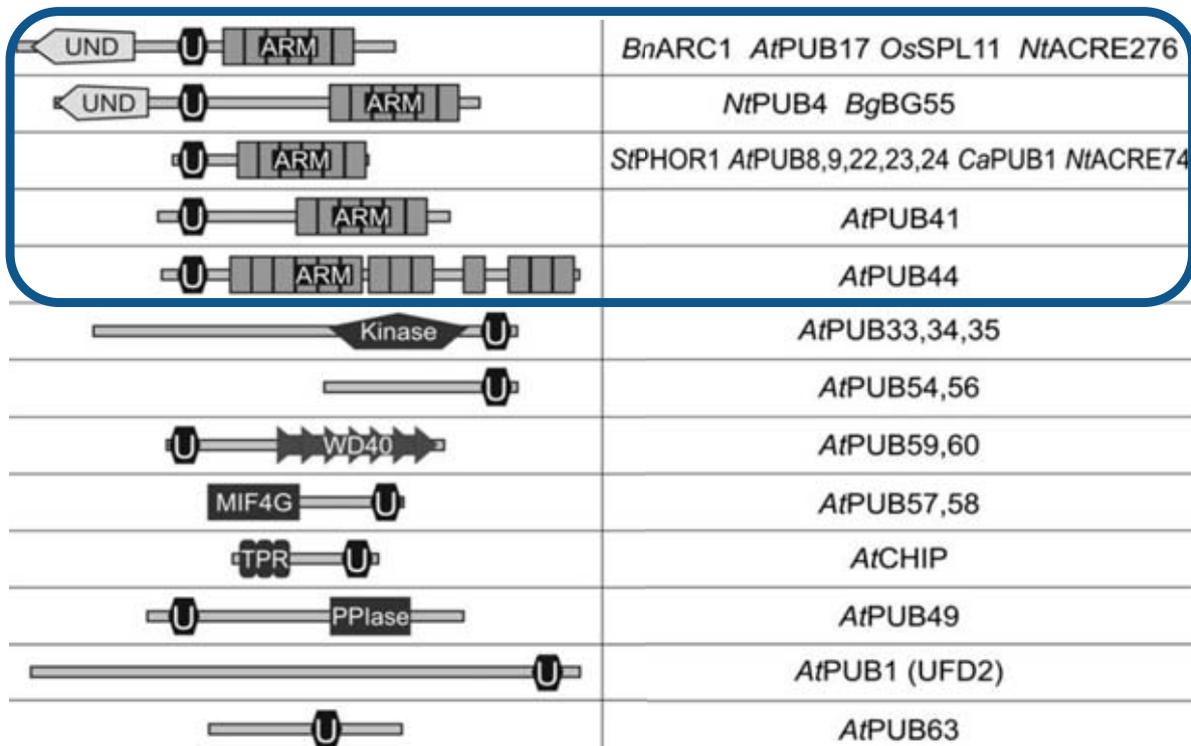


Figure 25. Variations de la composition en domaines et organisation des différentes protéines U-Box

U : U-Box ; UND : U-Box N-terminal Domain ; ARM : Répétitions Armadillo ; Kinase : Domaine Ser/Thr kinase ; WD40 : Répétitions WD40 ; MIF4G : Domaine MIF4G (de type ARM) ; TPR : Répétitions tetratricopeptide ; PPIase : peptidyl-prolyl isomerase. Le groupe défini par les protéines AtPUB54/56 est rattaché au groupe contenant un domaine kinase. Les cinq groupes entourés correspondent aux protéines PUB-ARM.

D'après Yee and Goring, 2009

Box chez les plantes pourrait refléter leur importance dans divers processus spécifiques aux végétaux (Yee and Goring, 2009).

Ces protéines U-Box peuvent être classées entre elles sur la base des domaines additionnels qu'elles contiennent, et plusieurs groupes ont ainsi été décrits (**Figure 25**) (Azevedo et al., 2001; Samuel et al., 2006; Yee and Goring, 2009). Chez *A. thaliana*, le groupe des PUBs contenant des répétitions Armadillo (ARM) dans leur partie C-terminale est le plus grand, regroupant plus de 60 % des membres. Ce groupe est appelé PUB-ARM. Les motifs ARM, long de 40 acides aminés, peuvent varier dans leur séquence primaire mais possèdent une structure secondaire conservée et constituée de trois hélices α , formant une structure tridimensionnelle prédite pour avoir un rôle dans les interactions protéine-protéine (Huber et al., 1997). Les variations présentes dans les séquences ARM pourraient alors jouer un rôle dans la reconnaissance spécifique des partenaires.

La protéine ARC1, décrite précédemment, appartient à un sous-groupe particulier des PUB-ARM, constitué de 17 membres chez *A. thaliana*. Ces protéines présentent toutes un large domaine N-terminal conservé d'environ 300 acides aminés, de fonction inconnue et appelé UND (U-Box N-terminal Domain). Ce sous-groupe est nommé UND-PUB-ARM. Une analyse phylogénétique de la famille des PUB-ARM d'*A. thaliana* a suggéré que le domaine UND des UND-PUB-ARM a été acquis au cours de l'évolution à plusieurs reprises (Mudgil, 2004) (**Figure 26**). Ce domaine, suspecté d'être celui d'interaction avec les substrats de l'activité E3 ligase, est requis pour l'interaction entre ARC1 et Exo70A1 (Samuel et al., 2009). En plus du rôle de ARC1 dans l'auto-incompatibilité chez *B. napus*, les exemples de rôles joués par les protéines UND-PUB-ARM sont peu nombreux et les trois cas décrits dans la littérature sont présentés ci-dessous.

La protéine NtPUB4 de *N. tabacum* a été découverte comme partenaire du RLK CHRK1. Cette protéine interagit avec le domaine kinase de CHRK1 dans la levure et *in vitro*. NtPUB4 est localisée à la membrane plasmique malgré l'absence de domaine transmembranaire. Aucun rôle n'est encore attribué à NtPUB4 (Kim et al., 2003).

Chez *O. sativa*, les mutants perte de fonction *spl11* (Spotted Leaf 11) présentent des lésions spontanées identiques à une réponse hypersensible de mort cellulaire (HR). Le gène *OsSPL11* code une protéine UND-PUB-ARM et est induit après infection avec des pathogènes compatibles et non compatibles (Zeng et al., 2004). De part son rôle négatif dans les mécanismes provoquant la mort cellulaire et son induction en présence de pathogènes, on peut supposer que SPL11 contrôle de manière fine les processus de mort cellulaire, protégeant ainsi la plante d'une réponse exagérée. Le dernier cas documenté est celui de la protéine de *N. tabacum* NtACRE276 et

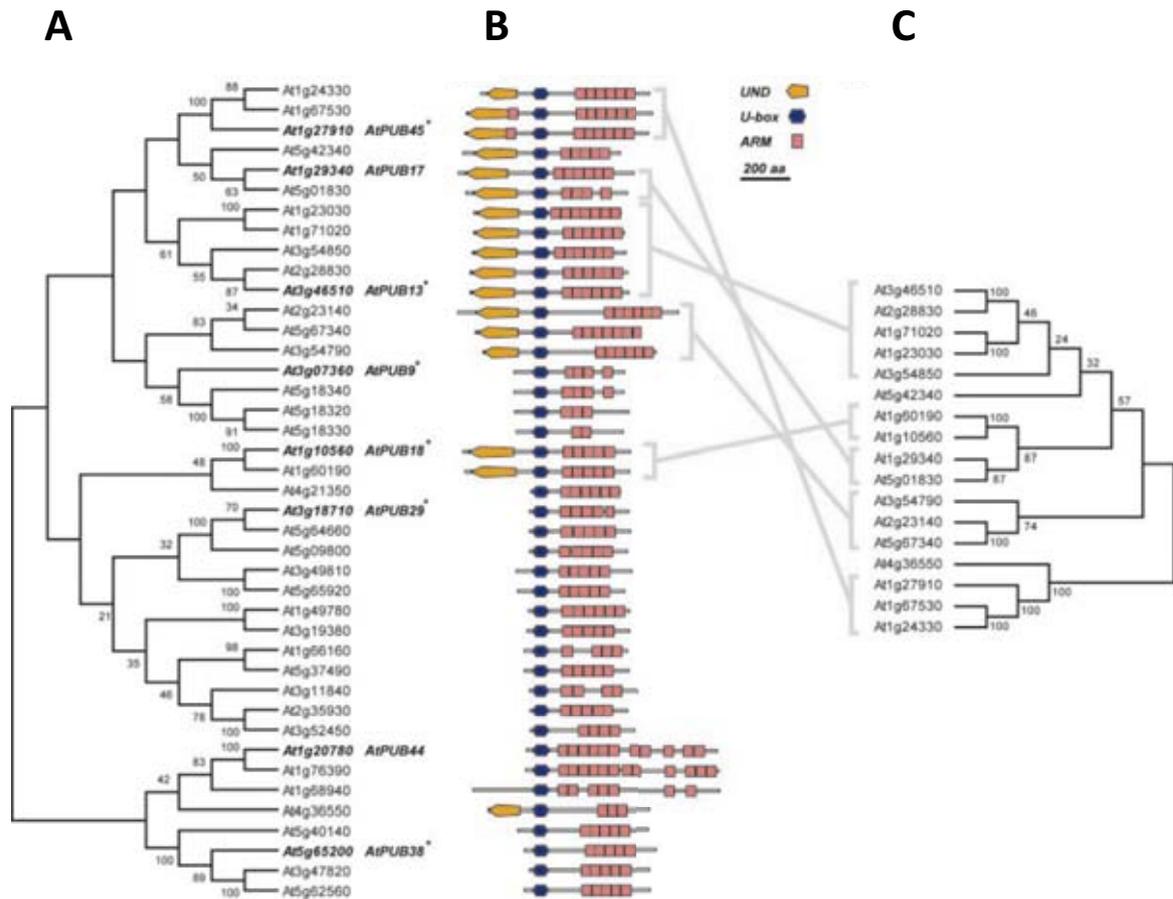


Figure 26. Relations phylogénétiques des protéines PUB-ARM d'*A. thaliana* en fonction des domaines U-Box et UND.

(A) L'analyse phylogénétique a été générée à partir des séquences des domaines U-Box des protéines PUB-ARM. Les gènes dont l'expression a été testée sont indiqués en italique et les protéines dont l'activité E3 ubiquitine ligase a été confirmée sont marquées d'un astérisque. (B) Organisation en domaines des PUB-ARM utilisées en (A). (C) L'analyse phylogénétique a été générée à partir des séquences des domaines UND des protéines PUB-ARM. Les lignes grisées indiquent les relations entre groupes issus des deux analyses phylogénétiques.

D'après Mudgil et al. 2004

de son orthologue chez *A. thaliana* AtPUB17. Le gène *NtACR276* a été identifié par approche transcriptomique comme étant induit après élicitation par le gène d'avirulence Avr9 de *C. fulvum* chez des plants de tabac transgéniques exprimant le gène de résistance Cf9 de la tomate. Cette induction perdure jusqu'à l'apparition des premiers symptômes de mort cellulaire (Yang et al., 2006). L'extinction du gène *NtACR276* par ARN interférent chez ces même plants de tabac se traduit par une perte de la réponse hypersensible suite à l'application du peptide Avr9, mais aussi après application d'une protéine du virus TMV normalement élicitrice d'une réponse hypersensible (Yang et al., 2006). L'expression de *AtPUB17*, orthologue de *NtACR276* issu d' *A. thaliana*, peut compléter les lignées ARN interférant *ACR276* pour cette réponse hypersensible et cette complémentation dépend de l'activité E3 ligase de AtPUB17 (Yang et al., 2006). Ces données suggèrent ici un rôle positif de *NtACR276* et AtPUB17 dans la réponse hypersensible, à l'inverse de ce qui est observé pour OsSPL11 chez le riz.

VI) Présentation du sujet de thèse

Les études génétiques par cribles de plantes incapables de former des nodules (Nod-) chez *L. japonicus* et *M. truncatula* ont permis le clonage de plusieurs gènes impliqués dans la voie de signalisation des facteurs Nod (NFs). Il a ainsi pu être identifié au sein de chaque espèce une paire de récepteurs kinase membranaires de la famille des LysM-RLKs indispensables à l'établissement de la symbiose fixatrice d'azote et non requis pour la symbiose AM. Une différence est cependant observée concernant les rôles de ces LysM-RLKs chez ces deux plantes modèles. Ainsi chez *L. japonicus*, *LjNFR5* et *LjNFR1* sont tous deux indispensables aux premières réponses après applications de NFs tandis que parmi la paire d'orthologues respectifs *NFP* et *LYK3* de *M. truncatula*, seul *NFP* est indispensable aux premières réponses après application de NFs. *LYK3* est cependant indispensable à la formation des cordons d'infection et son contrôle sur ce processus s'effectue de manière dépendante de la structure de NFs. Compte tenu de leur position en amont dans le modèle génétique de la perception de NFs et de la présence de motifs LysM dans leur domaine extracellulaire, *NFP* (*LjNFR5*) et *LYK3* (*LjNFR1*) constituent de bon candidats comme récepteurs des NFs. Chez *M. truncatula*, plusieurs gènes ont pu être placés dans une voie de signalisation des NFs en aval de *NFP*. A l'inverse, rien n'est encore connu sur la manière dont fonctionne la voie de signalisation des NFs en aval de *LYK3*.

L'étude de récepteurs kinases membranaires peut schématiquement être découpée en trois parties, la première s'intéressant aux mécanismes de perception du ligand, la seconde s'intéressant à la manière dont la perception du ligand est traduite en une différence d'activité du récepteur, et enfin la troisième s'intéressant aux composants de la voie de signalisation modifiés en aval. Mes travaux de recherche au sein de l'équipe de J. Cullimore et de C. Gough se sont concentrés sur la recherche de partenaires protéiques de *LYK3* pouvant constituer des composants de la signalisation dépendante de ce récepteur durant la symbiose bactérienne. A cette fin, deux systèmes double-hybride de levure ont été utilisés, le système Split-Ubiquitine et le système GAL4. Dans un premier temps, des tests d'interactions par paires ou « a priori » entre *LYK3* et des protéines connues ou suspectées de jouer un rôle dans la signalisation NFs ont été menés grâce au système Split-Ubiquitine. De plus, parce que les études génétiques ont pu manquer des gènes jouant des rôles importants dans la signalisation NFs, une seconde approche sans « a priori » consista à rechercher des partenaires de *LYK3* par criblage de banques d'ADNc de *M. truncatula* en système double-hybride Split-Ubiquitine et GAL4.

Le premier chapitre de cette thèse est une présentation de ses deux approches et des résultats obtenus. Les second et troisième chapitres sont constitués d'articles de recherche, l'un publié et l'autre révisé et accepté pour publication, respectivement. Enfin, les résultats sont discutés dans la dernière partie de la thèse.

CHAPITRE I

« Recherche de partenaires de LYK3 avec et sans a priori »

I) Les systèmes double-hybride de levure

1) Principes généraux du double-hybride de levure

Le double-hybride de levure est une technique de biologie moléculaire, mise au point par Fields et al. (1989), permettant de détecter une interaction entre deux protéines (Fields and Song, 1989). Son principe consiste à exprimer dans la levure deux protéines d'intérêt appelées appât et proie qui vont permettre l'activation de gènes rapporteurs uniquement lorsqu'elles interagissent. Les gènes rapporteurs codent pour des enzymes de la voie de biosynthèse d'un ou plusieurs acides aminés ou marqueurs d'auxotrophie, indispensables à la croissance des levures ne possédant plus de copie sauvage de ces gènes. Après interaction des protéines d'intérêt, l'activation des gènes rapporteurs permet la croissance des cellules sur un milieu dépourvu de ces marqueurs d'auxotrophie. Le gène *lacZ* codant pour la β -Galactosidase peut aussi être un rapporteur supplémentaire, permettant des tests colorimétriques ou quantitatifs. Plus récemment, le gène *AUR1-C* conférant une résistance à un antibiotique, l'aureobasidin A, est aussi employé (Clontech).

Les améliorations ultérieures du double-hybride de levure ont permis la mise au point de plusieurs systèmes dont seul le mode d'activation de la transcription des gènes rapporteurs diffère. Durant ma thèse, deux systèmes doubles hybrides ont été utilisés. Dans ces deux systèmes, les gènes rapporteurs des souches de levures sont constitués des gènes *HIS3*, *ADE2* et du gène *lacZ*. Les gènes *HIS3* et *ADE2* sont nécessaires à la synthèse d'histidine et d'adénine, respectivement. Il existe deux autres marqueurs d'auxotrophie non rapporteurs d'interactions. Les gènes *TRP1* et *LEU2*, nécessaires à la synthèse du tryptophane et de la leucine respectivement, sont mutés dans les souches de levure utilisées dans les deux systèmes. Ces marqueurs d'auxotrophie servent à sélectionner les cellules transformées avec les vecteurs d'expression des protéines appâts et proies, une copie sauvage des gènes *TRP1* ou *LEU2* étant présente sur l'un ou l'autre des vecteurs d'expression.

Pour la pratique, la transformation des levures avec les plasmides vecteurs d'expression des protéines appâts et proies est testée par croissance des levures sur milieu sans tryptophane (W) ni leucine (L). Ce milieu est noté SD-LW. Les interactions entre appâts et proies sont testées par croissance des levures sur un milieu minimum sans tryptophane, leucine et histidine (H) ou adénine (A). Ces milieux sont notés SD-LWH et SD-LWHA. L'ajout de 3-Amino-1,2,4-triazole

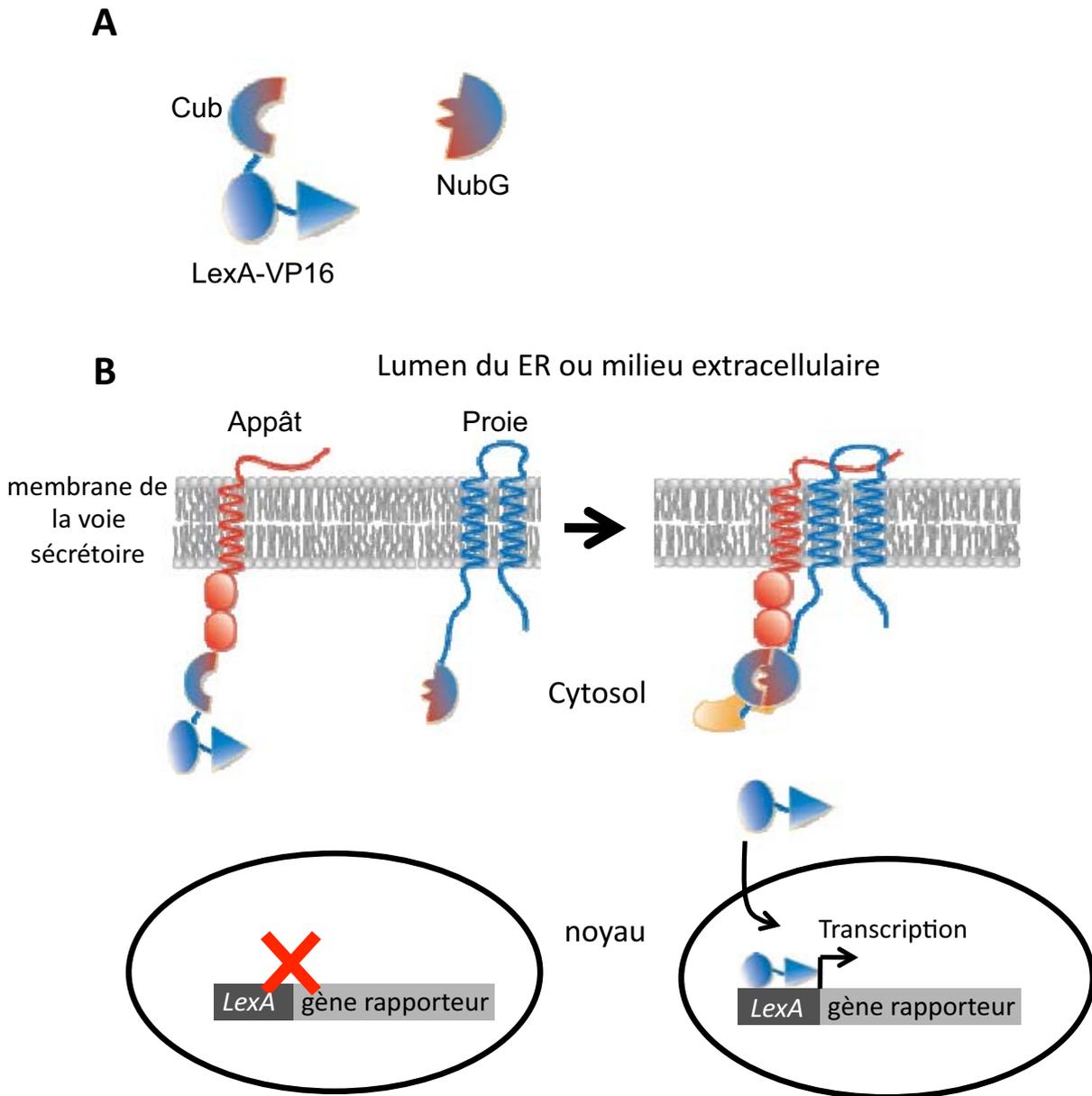


Figure 27. Principe de fonctionnement du système double hybride Split-Ubiquitine de levure.

(A) De Gauche à droite. Partie C-terminale de l'ubiquitine (AA 35-74) fusionnée au facteur de transcription chimérique LexA-VP16 et partie N-terminale de l'ubiquitine (AA 1-34) NubG. (B) Exemple d'interaction négative et positive entre un appât et une proie membranaires. A gauche : sans interaction, le facteur de transcription LexA-VP16 n'est pas clivé et les gènes rapporteurs ne sont pas transcrits. A droite : après interaction, la reconstitution de l'ubiquitine agit comme signal de clivage du facteur de transcription LexA-VP16, qui peut diffuser dans le noyau et activer la transcription de gènes rapporteurs. ER : réticulum endoplasmique.

D'après Dualsystems Biotech AG.

(3-AT), un inhibiteur du produit du gène *HIS3* (une Imidazoleglycerol-phosphate déshydrogénase), est aussi employé. L'utilisation de différentes concentrations de 3-AT sert à augmenter la sélectivité des milieux de croissance dépourvus d'histidine. Une interaction produisant une plus grande quantité de transcrite du gène *HIS3* est en effet nécessaire pour contrer l'effet du 3-AT.

2) Le système double-hybride de levure Split-Ubiquitine

2-1) Principe

Le système Dual Membrane II Split-Ubiquitine utilisé dans cette étude est distribué par la société DualSystems Biotech AG. Ce système est basé sur la reconstitution de l'ubiquitine après interaction entre les protéines appât et proie, chacune en fusion traductionnelle avec une moitié de l'ubiquitine (**Figure 27**). L'ubiquitine reconstituée est reconnue et il s'ensuit le clivage protéolytique d'un facteur de transcription chimérique LexA-VP16, lui-même en fusion traductionnelle avec la protéine appât. Une fois le facteur de transcription clivé, il peut relocaliser dans le noyau et activer la transcription des gènes rapporteurs sous la dépendance de séquences *LexA*, *cis*-activatrices de la transcription. En utilisant le clivage et la relocalisation du facteur de transcription LexA-VP16 comme mode d'activation, ce système peut dissocier le lieu de l'interaction appât/proie dans la cellule et le noyau, lieu de transcription des gènes rapporteurs. L'intérêt de ce système est qu'il permet de mettre en évidence une interaction impliquant des protéines localisées dans les membranes. Le facteur de transcription doit cependant être exposé du côté cytosolique pour pouvoir être clivé et diffuser vers le noyau (**Figure 27**).

Les protéines appâts sont en fusion traductionnelle avec la moitié C-terminale de l'ubiquitine notée Cub (acides aminés 35 à 76) suivie du facteur de transcription LexA-VP16 (**Figure 27A**). Le tandem Cub-LexAVP16 est en fusion à l'extrémité C-terminale des protéines membranaires de type I (C-terminal cytosolique) ou en fusion N-terminale des protéines membranaires de type II (N-terminal cytosolique).

Les protéines proies sont en fusion traductionnelle avec la moitié N-terminale de l'ubiquitine notée Nub (acides aminés 1 à 34) présentant une glycine (G) en position 13, au lieu d'une isoleucine (I) normalement présente chez la forme sauvage (**Figure 27A**). La forme sauvage NubI a une forte affinité pour Cub et interagit spontanément avec, alors que la forme NubG n'interagit pas spontanément avec Cub. Par conséquent l'interaction entre NubG et Cub ne peut se

faire que part le biais d'une interaction préalable entre les protéines appât et proie de fusion (Stagljar et al., 1998). Tout comme le domaine Cub, NubG est en fusion à l'extrémité C-terminale des protéines membranaires de type I et en fusion N-terminale des protéines membranaires de type II.

Le système Dual Membrane Split-Ubiquitine est fourni avec un contrôle positif et un contrôle négatif tirant partie des propriétés de NubI et NubG. Le contrôle positif est constitué de la protéine membranaire de levure ALG5 de Type I, une glucosyltransférase résidente du reticulum endoplasmique (Heesen et al, 1994), en fusion traductionnelle avec NubI. Le contrôle négatif est constitué de la même protéine ALG5 en fusion traductionnelle avec NubG. Cette paire de proies contrôles permet de s'assurer que les deux conditions suivantes sont remplies :

- ALG5-NubI : Que l'expression de la protéine appât est suffisante, permettant une croissance des cellules sur milieu sélectif lors d'une interaction constitutive entre Cub et NubI.
- ALG5-NubG : Que la protéine appât est stable et n'induit pas un re-largage du facteur de transcription LexA-VP16 en absence d'interaction. On exclut ici la possibilité d'une interaction spécifique entre ALG5 et les protéines appâts d'intérêt utilisées. D'autres protéines issues de plantes sont aussi utilisées comme contrôles négatifs en fusion avec NubG.

La souche de levure NMY32i a été utilisée dans cette étude pour les expériences effectuées en système Split-Ubiquitine.

2-2) Vecteurs d'expression et propriétés

Trois vecteurs ont été utilisés pour l'expression des protéines appâts et proies dans le système Dual Membrane Split-Ubiquitine. Tous permettent un clonage orienté des séquences codantes d'intérêt grâce à deux sites de restriction SfiI différents, Sfi1a et Sfi1b. La séquence palindromique d'ADN [GGCC-NNNNN-GGCC] reconnue par l'enzyme de restriction permet la création d'amorces PCR spécifiques au côté 5' (Sfi1a) et au côté 3' (Sfi1b) en choisissant des séquences nucléotidiques internes différentes pour Sfi1a et Sfi1b.

Les protéines appâts sont exprimées grâce au vecteur pCCW. Ce vecteur permet une fusion C-terminale du module Cub-LexA-VP16. Il contient le promoteur d'expression faible CYC1 et le

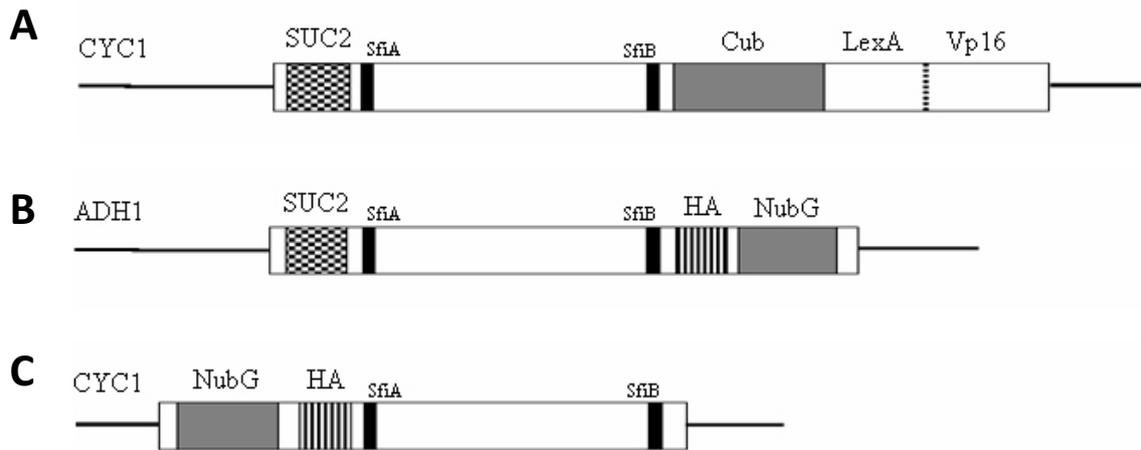


Figure 28. Représentation schématique des différents vecteurs d'expression utilisés dans le système Split-Ubiquitine

(A) Vecteur d'expression appât pCCW-SUC. Promoteur faible CYC1, séquence codant le peptide signal du gène de l'invertase de *S. cerevisiae* SUC2, sites de restriction Sfi1a et Sfi1b, séquences codant Cub et le facteur de transcription chimérique LexA-VP16. (B) Vecteur d'expression proie pDL2-SUC. Promoteur fort ADH1, séquence SUC2, sites de restriction Sfi1a et Sfi1b, séquences codant l'étiquette HA et NubG. (C) Vecteur d'expression proie pDSL. Promoteur faible CYC1, séquences codant NubG et l'étiquette HA, sites de restriction Sfi1a et Sfi1b.

gène *LEU2* comme marqueur auxotrophique de transformation (**Figure 28A**). Il contient une origine de réplication centromérique ORI, permettant un faible nombre de copies.

Les protéines proies sont exprimées grâce aux vecteurs pDL2 ou pDSL. Le vecteur pDL2 permet un clonage de NubG en C-terminal des protéines de fusion sous contrôle du promoteur d'expression fort ADH1 (**Figure 28B**). Le vecteur pDSL permet un clonage de NubG en N-terminal des protéines de fusion sous contrôle du promoteur d'expression faible CYC1 (Figure 28C). Les vecteurs pDL2 et pDSL contiennent chacun une copie du gène *TRP1* comme marqueur auxotrophique de transformation et une origine de réplication 2micron permettant un grand nombre de copies. Une étiquette HA est aussi ajoutée en fusion traductionnelle entre NubG et la protéine d'intérêt grâce à ces deux vecteurs. Elle permet une détection des protéines proies de fusion par Western-Blot.

Les versions des vecteurs pCCW et pDL2 utilisés dans cette étude permettent en plus l'ajout du peptide signal SUC issu de l'invertase de levure SUC2. Ces vecteurs sont renommés pCCW-SUC et pDL2-SUC. Le peptide signal endogène des protéines membranaires de type I est remplacé lors du clonage par ce peptide SUC dans le but d'améliorer leur expression et leur adressage dans la voie sécrétoire chez la levure.

3) Le système double-hybride de levure GAL4

3-1) Principe

Le système GAL4 MatchMaker utilisé dans cette étude est distribué par la société Clontech. Historiquement le premier mis au point, il utilise le facteur de transcription GAL4 de levure et les séquences promotrices de gènes reconnues par ce dernier. Le facteur de transcription GAL4 est constitué de deux domaines nécessaires à sa fonction. Son domaine BD lie des éléments *cis*-régulateurs de transcription dont les séquences nucléotidiques sont connues, et son domaine AD active la transcription des gènes. Les gènes rapporteurs sont placés sous le contrôle de ces éléments *cis*-régulateurs, aussi appelées dans ce cas GAL_{UAS} pour GAL Upstream Activation Sequence. Les protéines appât et proie sont en fusion traductionnelle avec le domaine BD et AD du facteur de transcription GAL4, respectivement. Lors d'une interaction entre l'appât et la proie, un facteur de transcription chimérique est ainsi reconstitué par la proximité des domaines BD et AD, permettant la transcription des gènes rapporteurs (**Figure 29**).

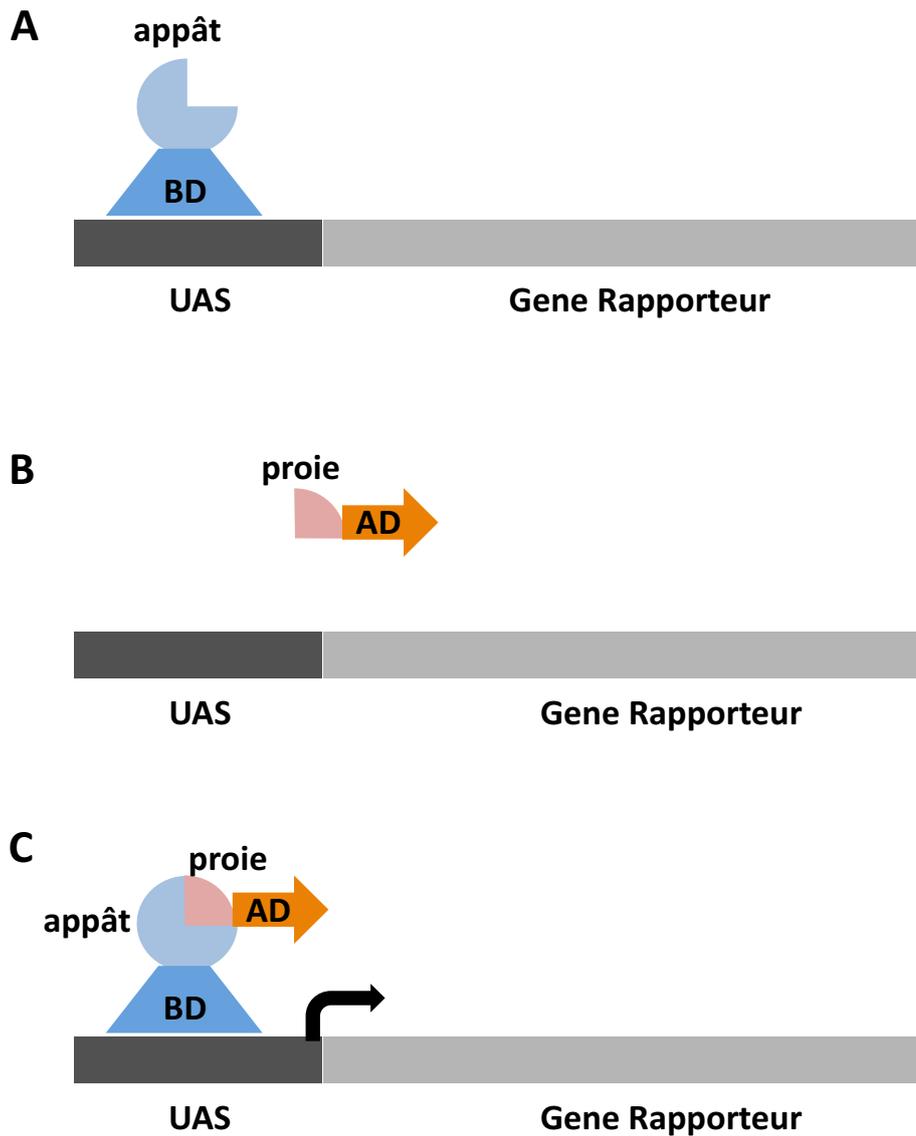


Figure 29. Principe de fonctionnement du système double hybride GAL4 de levure

(A) L'appât en fusion traductionnelle avec le domaine GAL4-BD lie la séquence promotrice UAS (Upstream Activator Sequence) en amont du gène rapporteur. (B) La proie en fusion traductionnelle avec le domaine GAL4-AD ne lie pas la séquence promotrice UAS. (C) Lors d'une interaction entre l'appât et la proie co-exprimées dans la levure, le domaine GAL4-AD peut activer la transcription de gènes rapporteurs.

Contrairement au Split-Ubiquitine, ce système ne fonctionne que si l'appât et la proie sont localisés dans le noyau des cellules de levure. Pour cette raison, le système GAL4 ne peut pas fonctionner avec des protéines possédant un ou plusieurs domaines transmembranaires. Dans ce cas, seule la région soluble des protéines est utilisée en fusion traductionnelle pour effectuer les tests d'interactions. La localisation dans le noyau des protéines de fusion solubles chez la levure est assurée par des séquences d'adressage au noyau présentes sur les domaines BD et AD.

La souche de levure AH109 a été utilisée dans cette étude pour les expériences effectuées dans le système GAL4. En plus des marqueurs d'auxotrophie décrits plus haut, cette souche ne contient plus les gènes codant le facteur de transcription GAL4 et son proche homologue GAL80, ceci afin d'éviter une activation endogène des gènes rapporteurs.

3-2) Les vecteurs d'expression

Les protéines appâts sont exprimées grâce aux vecteurs pGBKT7 et pGBGW. Ces vecteurs permettent une fusion en N-terminal du domaine BD du facteur de transcription GAL4 sur les appâts. Ils contiennent le promoteur d'expression fort ADH1 et le gène *TRP1* comme marqueur auxotrophique de transformation. Le vecteur pGBGW permet des clonages par la technologie Gateway (Laurent Deslandes, communication personnelle) alors que des clonages par restriction sont utilisés avec le vecteur pGBKT7.

Les protéines proies sont exprimées grâce aux vecteurs pGADT7. Ce vecteur permet une fusion en N-terminal du domaine AD du facteur de transcription GAL4 sur les protéines proies. Il contient le promoteur d'expression fort ADH1 et le gène *LEU2* comme marqueur auxotrophique de transformation. Le vecteur pGADT7 utilisé dans cette étude permet indifféremment les clonages par restriction ou l'utilisation de la technologie Gateway (Laurent Deslandes, communication personnelle).

II) Recherche de partenaires de LYK3 avec a priori

1) Interaction entre LYK3 et les protéines membranaires de la voie de signalisation NFs : LYK3, NFP, DMI1 et DMI2

Les études génétiques ont permis le clonage de quatre gènes jouant un rôle dans la signalisation NFs chez *M. truncatula* et codant des protéines membranaires, LYK3, NFP, DMI1 et DMI2. Une des étapes suivante consiste à déterminer comment ces protéines fonctionnent dans la voie de signalisation NFs. Leur structure membranaire amène à former l'hypothèse qu'elles pourraient faire partie d'un même complexe récepteur des NFs ou qu'elles interagissent dans le cadre de la transduction du signal NF. Il a par ailleurs été montré que les gènes *DMI1* et *DMI2* sont impliqués dans la formation d'un site de liaison NFBS3 à haute affinité pour les NFs. En utilisant le système double-hybride Split-Ubiquitin, une partie de mes travaux de recherche a consisté à rechercher des interactions entre LYK3 et DMI1, DMI2, ou NFP.

1-1) Constructions utilisées

LYK3 et BRI1, le récepteur au brassinostéroïdes d'*A. thaliana* de la famille des LRR-RLKs, ont été utilisés comme appâts pour effectuer des tests d'interaction par paire avec les protéines impliquées dans la signalisation NFs. L'appât BRI1 sert ici de contrôle appât négatif de même nature que LYK3, tous les deux appartenant à la classe des RLKs. Les deux séquences codantes ont été clonées dans le vecteur pCCW-SUC.

Le canal ionique DMI1 a été cloné en proie dans le vecteur pDSL. Les RLKs symbiotiques NFP et DMI2 ont été clonés en proies dans le vecteur pDL2-SUC. Plusieurs autres protéines ont été utilisées dans cette étude comme proies contrôles en plus de la protéine de levure ALG5 déjà décrite. Les LRR-RLKs d'*A. thaliana* BRI1 et BAK1 et le récepteur non symbiotique LR9 de *M. truncatula* de la famille des Lectin-RLKs ont été clonés en proies dans le vecteur pDL2-SUC. Enfin, la pompe à protons PMA4 de *Nicotiana glauca*, localisée à la membrane plasmique, a été clonée comme proie afin de disposer d'un contrôle de structure différente des RLKs (Lefebvre et al., 2004).

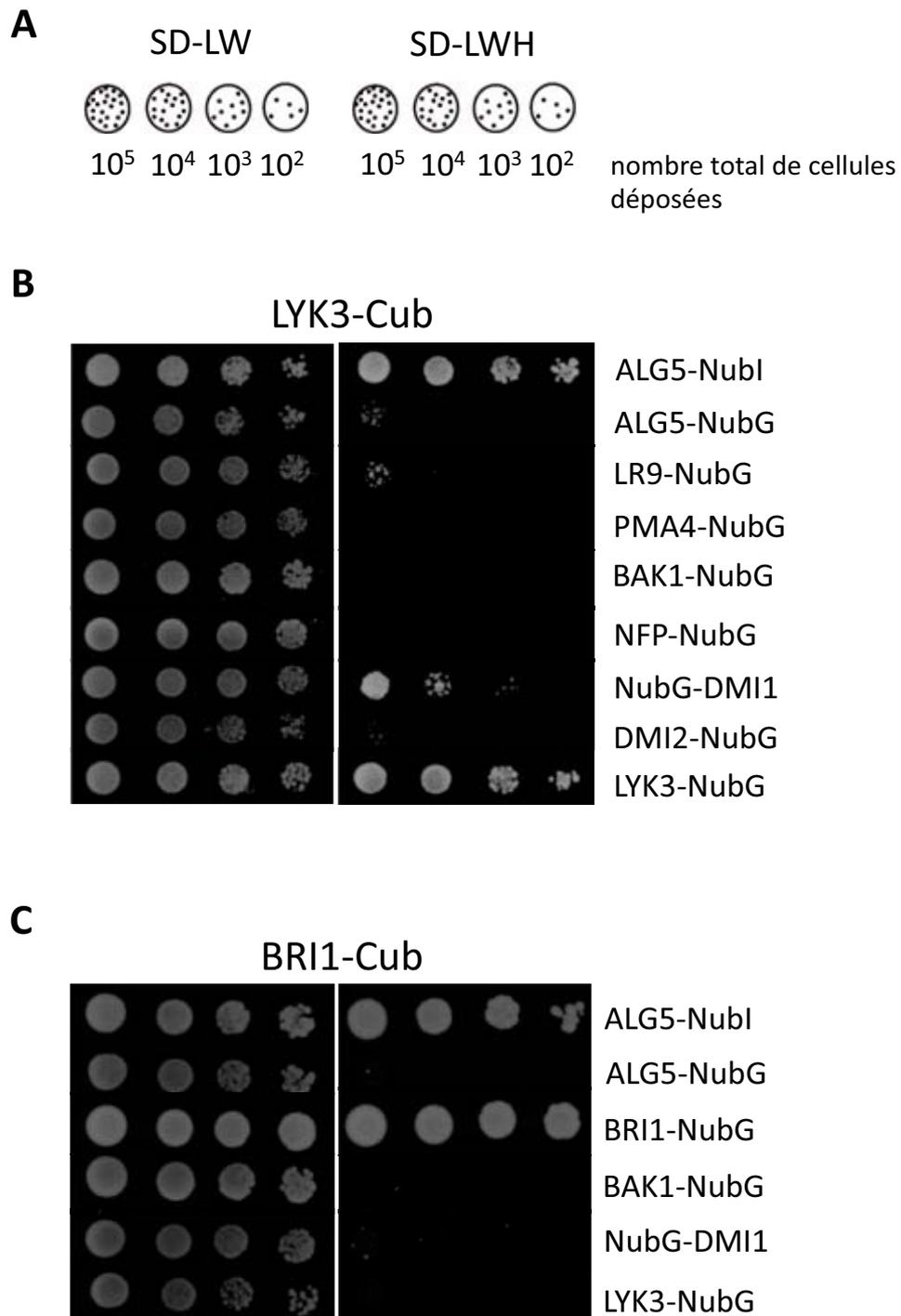


Figure 30. Tests d'interactions entre LYK3 et les protéines de la voie de signalisation NFs en système double hybride Split-Ubiquitine de levure

(A) Représentation schématique des dépôts de levure sur milieu SD-LW et SD-LWH. Une concentration décroissante de cellules est déposée de gauche à droite. (B, C) Tests de croissance des double transformants contenant LYK3 ou BRI1 comme appâts.

1-2) Tests d'interactions par paires

La souche de levure NMY32i a d'abord été transformée avec les constructions appâts seules, LYK3-Cub et BRI1-Cub. Deux clones indépendants par appât ont ensuite été utilisés pour effectuer les transformations successives avec les vecteurs d'expression des protéines proies. Les résultats représentatifs obtenus avec un des deux clones pour chaque appât sont présentés. Pour chaque combinaison appât/proie, un minimum de vingt colonies de levures co-transformées et sélectionnées sur milieu SD-LW a été utilisé en mélange pour effectuer les tests de croissance sur milieu sélectif SD-LWH. Les levures co-transformées ont été diluées en série par un facteur 10 à partir d'une $DO_{546}=1$. Une goutte de chaque dilution contenant un nombre décroissant de cellules a été déposée sur milieu SD-LW et SD-LWH. Les levures ont été mises en croissance pendant trois jours à 28°C avant les prises d'images (**Figure 30**).

Les deux protéines appâts LYK3 et BRI1 testées avec le contrôle positif ALG5-NubI montrent une croissance sur milieu sélectif SD-LWH pour toutes les dilutions testées (**Figure 30B et C**). Cela confirme leur bonne expression dans la levure. Les levures co-exprimant le contrôle négatif ALG5-NubG et BRI1 ne montrent pas de croissance sur milieu SD-LWH, confirmant que l'appât BRI1 est stable dans ce système (**Figure 30B et C**). L'appât LYK3 présente en revanche une faible croissance sur milieu sélectif avec ALG5-NubG, suggérant une légère instabilité du récepteur dans la levure. Cela reste cependant marginal puisque seule la dilution la plus concentrée est concernée (**Figure 30B**).

Une croissance sur milieu sélectif SD-LWH est observée pour les couples LYK3/LYK3 et LYK3/DMI1 (**Figure 30B**), suggérant que LYK3 peut former un homo-oligomère et un hétéro-oligomère avec DMI1 dans la levure. Aucune interaction n'est détectée entre LYK3 et NFP ou DMI2, de même qu'avec les contrôles négatifs BAK1, LR9 et PMA4.

L'homo-oligomérisation de BRI1 est rapportée par une croissance des levures exprimant le couple BRI1/BRI1 (**Figure 30C**). Aucune croissance n'est observée avec les couples BRI1/BAK1, BRI1/LYK3, et BRI1/DMI1, suggérant qu'aucune de ces protéines n'interagit avec BRI1 dans ce système.

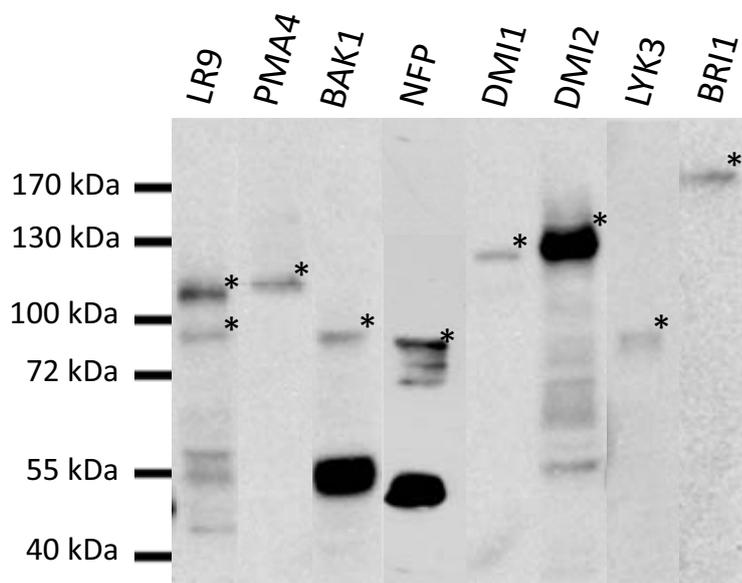


Figure 31. Analyse d'expression des protéines proies de fusion (NubG) en système Split-Ubiquitine par western blot

Les protéines proies ont été détectées avec un anticorps anti-HA et un anticorps secondaire couplé à la Horse Radish Peroxidase (HRP). Les protéines ont ensuite été révélées à l'aide du kit Amersham ECL. Une quantité équivalente de protéines totales ont été déposées sur gel. Les bandes correspondantes aux tailles des protéines entières sont marquées (*).

1-3) Expression des proies par Western Blot

L'expression des proies dans le système Split-Ubiquitine levure a été vérifiée par Western Blot dirigé contre l'épitope HA (**Figure 31**). Toutes les protéines proies utilisées ont été détectées, confirmant leur expression dans la souche de levure NMY32i. Ces résultats positifs de détection par Western Blot suggèrent donc que les absences d'interactions observées dans le système Split-Ubiquitine ne sont pas dues à des problèmes d'expression des protéines proies.

1-4) Conclusions

D'après les résultats de croissance des levures sur milieu sélectif, LYK3 est capable de former un homo-oligomère et un hétéro-oligomère avec DMI1. Ces interactions n'ont pas été détectées en utilisant l'appât contrôle BRI1. LYK3 et BRI1 étant tous les deux des RLKs, cela suggère que ces interactions sont bien dépendantes du récepteur symbiotique LYK3. L'utilisation des proies contrôle BAK1, LR9 et PMA4 avec l'appât LYK3 suggère que l'expression de protéines de plantes comme proies ne conduit pas à la détection d'interactions de type faux-positifs dans le système Split-Ubiquitine.

2) Interaction entre LYK3 et MtSYMREM1

Dans la partie du génome séquencée *M. truncatula*, dix gènes codant des remorines ont été identifiés. Parmi ces dix gènes, *MtSYMREM1* présente un profil d'expression restreint aux nodules. L'extinction du gène *MtSYMREM1* par ARN interférent et un mutant d'insertion Tnt1 présentent un phénotype altéré d'infection, assez proche de ce qui est observé pour le mutant *lyk3-4*. Il est observé une baisse du nombre de nodules formés, et les cordons d'infections qu'ils contiennent sont anormalement larges. Le re-largage des bactéries dans le nodule est affecté. Le profil d'expression symbiotique de *MtSYMREM1* et le phénotype d'infection observé chez les mutants de ce gène suggèrent que MtSYMREM1 pourrait jouer un rôle dans les mêmes étapes que LYK3, en contrôlant l'infection. Il est envisageable que LYK3 et MtSYMREM1 interagissent pour contrôler le processus d'infection pendant la nodulation. Pour le vérifier, des tests d'interactions par paire entre LYK3 et MtSYMREM1 ont été effectués en utilisant le système

Split-Ubiquitine. Cette partie du travail de ma thèse fut menée dans le cadre d'une collaboration établie par Thomas Ott au sein du laboratoire.

2-1) Constructions utilisées

En plus de la construction appât de LYK3 utilisée précédemment et décrite en (II, 1, 1-1) les récepteurs de la famille des LysM-RLKs, LYK2 et LYK4, et le récepteur MtLRR11.1 de la famille des LRR-RLKs ont été clonés dans le vecteur d'expression pCCW-SUC. Ces trois récepteurs sont issus de *M. truncatula*. LYK2 et LYK4 sont des proches homologues de LYK3 dont le rôle symbiotique est pour l'instant inconnu. MtLRR11.1 est un récepteur non symbiotique exprimé dans les racines.

Les séquences codant MtSYMREM1, MtREM1.2, une seconde remorine de *M. truncatula* phylogénétiquement éloignée de MtSYMREM1, et StREM1.3, une remorine de la pomme de terre, ont toutes été clonées en proie dans le vecteur pDSL.

2-2) Tests d'interactions par paires

La procédure de transformation et le test de croissance des levures utilisés sont similaires à ce qui a été présenté au paragraphe (II,1,1-2), avec pour différence un milieu sélectif SD-LWH additionné de 5mM de 3-AT.

Les souches exprimant les RLKs appâts LYK3-Cub, LYK2-Cub et LYK4-Cub montrent une croissance sur milieu sélectif en présence de ALG5-NubI, confirmant une l'expression des appâts (**Figure 32**). L'appât MtLRR11.1-Cub montre une croissance faible avec ALG5-NubI, suggérant une faible quantité de protéine appât produite. Les appâts LYK3, LYK4 et MtLRR11.1 ne présente pas de croissance avec la proie contrôle ALG5-NubG. Cela suggère que tous ces récepteurs sont stables dans la levure. L'appât LYK2 montre une croissance des levures avec la proie contrôle ALG5-NubG, suggérant que la protéine appât LYK2 n'est pas stable dans ce système (**Figure 32**).

Les levures exprimant les couples LYK3/MtSYMREM1 et LYK3/MtREM1.2 montrent une croissance sur milieu sélectif. Une croissance faible est observée pour les levures exprimant les couples LRR11.1/MtREM1.2 et LYK4/MtREM1.2 sur ce même milieu (**Figure 32**). Ces résultats suggèrent que MtSYMREM1 interagit spécifiquement avec LYK3 et que MtREM1.2

Tableau 4. Analyse BLASTn de 146 clones issus du criblage d'une banque d'ADNc de nodules contre le récepteur LYK3 entier dans le système Split-Ubiquitine de levure

BLAST SCORE	EST	ANNOTATION MENS	Fréquence	DMI2 positif
Blast score= 2452 Expect value= 3.9e-106	MIC00546_GC	12kD SIGNAL PEPTIDASE SUBUNIT	30	+
Blast score= 1540 Expect value= 9.1e-65	MIC91023_GC	HYPOTHETICAL (Cys rich)	12	-
Blast score= 1458 Expect value= 5.5e-61	MIC10956_GC	?	8	+
Blast score= 1272 Expect value= 7.1e-53	MIC10827.1_GC_Contig1	PUTATIVE EXTRACELLULAR DERMAL GLYCOPROTEIN	6	+
Blast score= 1650 Expect value= 7.2e-70	MIC63086_GC	HYPOTHETICAL (Cys rich)	6	-
Blast score= 2447 Expect value= 4.7e-106	MIC00521_GC	40S RIBOSOMAL PROTEIN S20	5	-
Blast score= 2841 Expect value= 4.8e-124	MIC00583_GC	LEGHEMOGLOBIN I	3	-
Blast score= 2354 Expect value= 8.2e-102	MIC00656_GC	SEC61	3	-
Blast score= 2509 Expect value= 9.2e-109	MIC91993_GC	SEC61 BETA SUBUNIT	3	-
?		CALCIUM BINDING PROTEIN	2	-
Blast score= 885 Expect value= 1.7e-35	MIC00164_GC	PROBABLE UBIQUITIN-LIKE PROTEIN SMT3	2	-
Blast score= 2240 Expect value= 1.1e-96	MIC00272_GC	CYTOCHROME B5	2	+
Blast score= 1709 Expect value= 9.2e-73	MIC00373_GC	PROBABLE ACYL-COA-BINDING PROTEIN ACBP	2	-
Blast score= 1991 Expect value= 1.9e-85	MIC00396_GC	PROBABLE F1F0-ATPASE INHIBITOR PROTEIN	2	-
Blast score= 2462 Expect value= 8.6e-107	MIC00475_GC	?	2	-
Blast score= 2656 Expect value= 1.7e-115	MIC51004_GC	?	2	-
Blast score= 1725 Expect value= 3.2e-73	MIC62253_GC	HYPOTHETICAL (Cys rich)	2	-
Blast score= 2170 Expect value= 1.9e-93	MID20786_GC	HYPOTHETICAL (Cys rich)	2	-
Blast score= 1010 Expect value= 1.1e-40	MIS00136	HYPOTHETICAL (Cys rich)	2	-
		CLONES NON REDONDANTS	50	-
		Total	146	

Les inserts ADNc de 150 clones positifs obtenus à 3 et 3.5 jours ont été amplifiés par PCR et les produits d'amplification ont été séquencés. Un total de 146 séquences a fait l'objet d'une analyse bioinformatique. Le score BLAST, l'EST le plus proche dans la banque d'ESTs MENS, l'annotation, la fréquence du clone et sa présence parmi les candidats issus du criblage contre DMI2 dans le même système Split-Ubiquitine est indiquée (+ : présent ; - : Absent).

peut interagir avec LYK3, LYK4 et MtLRR1.1. Aucune croissance n'est relevée avec StREM1.3, quelque soit le récepteur appât testé. Enfin, les croissances observées avec LYK2 en appât ne permettent pas de conclure compte tenu de la croissance observée avec le couple LYK2/ALG5-NubG.

L'expression des remorines proies n'a pas été vérifiée par Western Blot. Cependant, les interactions positives impliquant MtSYMREM1 et MtREM1.2 suggèrent que ces deux protéines sont bien exprimées dans la souche de levure NMY32i. Seule l'expression de StREM1.3 reste une inconnue puisqu'aucune croissance sur milieu sélectif avec cette remorine n'a été détectée. L'hypothèse d'un défaut d'expression concernant StREM1.3 ne peut être exclue.

2-3) Conclusions

D'après ces résultats de croissance des levures sur milieu sélectif, LYK3 est capable de former un hétéro-oligomère avec MtSYMREM1. Les RLKs MtLRR1.1 et LYK4 n'interagissent pas avec MtSYMREM1. Ces résultats suggèrent que l'interaction LYK3/MtSYMREM1 est due à la nature symbiotique des deux protéines.

La remorine MtREM1.2 interagit avec MtLRR1.1, LYK3 et LYK4. Dans le cas du couple MtLRR1.1/MtREM1.2, la faible croissance des levures observée pourrait être due à la faible expression de l'appât MtLRR1.1. Il est possible que l'interaction entre MtLRR1.1 et MtREM1.2 soit sous-estimée. MtREM1.2 semble donc posséder un spectre d'interaction avec les RLKs plus large que MtSYMREM1. LYK4 et MtLRR1.1 n'ont pas de rôle symbiotique connu, il est donc probable que les interactions entre MtREM1.2 et les RLKs n'aient pas de fonction symbiotique, mais soient à l'origine d'une fonction encore non identifiée.

L'hypothèse d'une interaction entre LYK3 et MtSYMREM1 est donc validée dans la levure par Split-Ubiquitine. Cette interaction renforce l'hypothèse d'un rôle conjoint pour ces deux protéines dans l'infection au cours de la nodulation. Ce travail a fait l'objet par la suite d'un complément en utilisant en appât les deux autres RLKs symbiotiques de *M. truncatula*, NFP et DMI2. Les résultats obtenus avec ces récepteurs et avec LYK3 ont fait l'objet d'une partie d'une publication présentée dans le deuxième chapitre de la thèse.

III) Recherche de partenaires de LYK3 sans a priori

1) Criblage d'une banque d'ADNc en système Split-Ubiquitine

L'emploi du double-hybride de levure Split-Ubiquitine a permis de mettre en évidence plusieurs interactions avec le récepteur LYK3. Ces interactions testées par présomption ou « a priori » ont validé la stratégie de recherche de partenaire en utilisant le système double-hybride Split-Ubiquitine de levure. Cela a permis dans un second temps de réaliser un crible afin de découvrir de nouvelles protéines partenaires de LYK3 potentiellement impliquées dans la nodulation.

1-1) Banque d'ADNc et appât

Une banque d'ADNc issus de nodules de cinq jours a été produite dans l'équipe par C. Seregélyes. Les ADNc ont été clonés dans le vecteur pDSL de manière orientée grâce aux sites de restriction Sfi1 (cf. § I, 2, 2-2). Pour rappel, ce plasmide permet la fusion de NubG en N-terminal des protéines. Le nombre de clones indépendants dans cette banque est estimé à 1,1 millions et la taille moyenne des inserts ADNc est d'environ 0,7 kb (C. Seregélyes, communication personnelle). Le récepteur LYK3 cloné en appât dans le plasmide pCCW-SUC (Cf. § I, 2, 2-2 et § II, 1, 1-1) a été utilisé pour cribler cette banque.

1-2) Criblage de la banque

Afin de cribler la banque d'ADNc de nodules, un protocole de transformation de levure haute efficacité de la souche de levure NMY32i et décrit par Dualsystems Biotech AG a été employé. Environ 20 µg d'ADN de la banque ont été utilisés et le nombre de clones criblés a été estimé à environ 2 millions par étalement d'une aliquote de la transformation sur milieu SD-LW. Cela représente environ deux fois le nombre de clones indépendants dans la banque. Les cellules furent mises en croissance sur milieu sélectif SD-LWH à 28°C. Deux cent clones furent récupérés

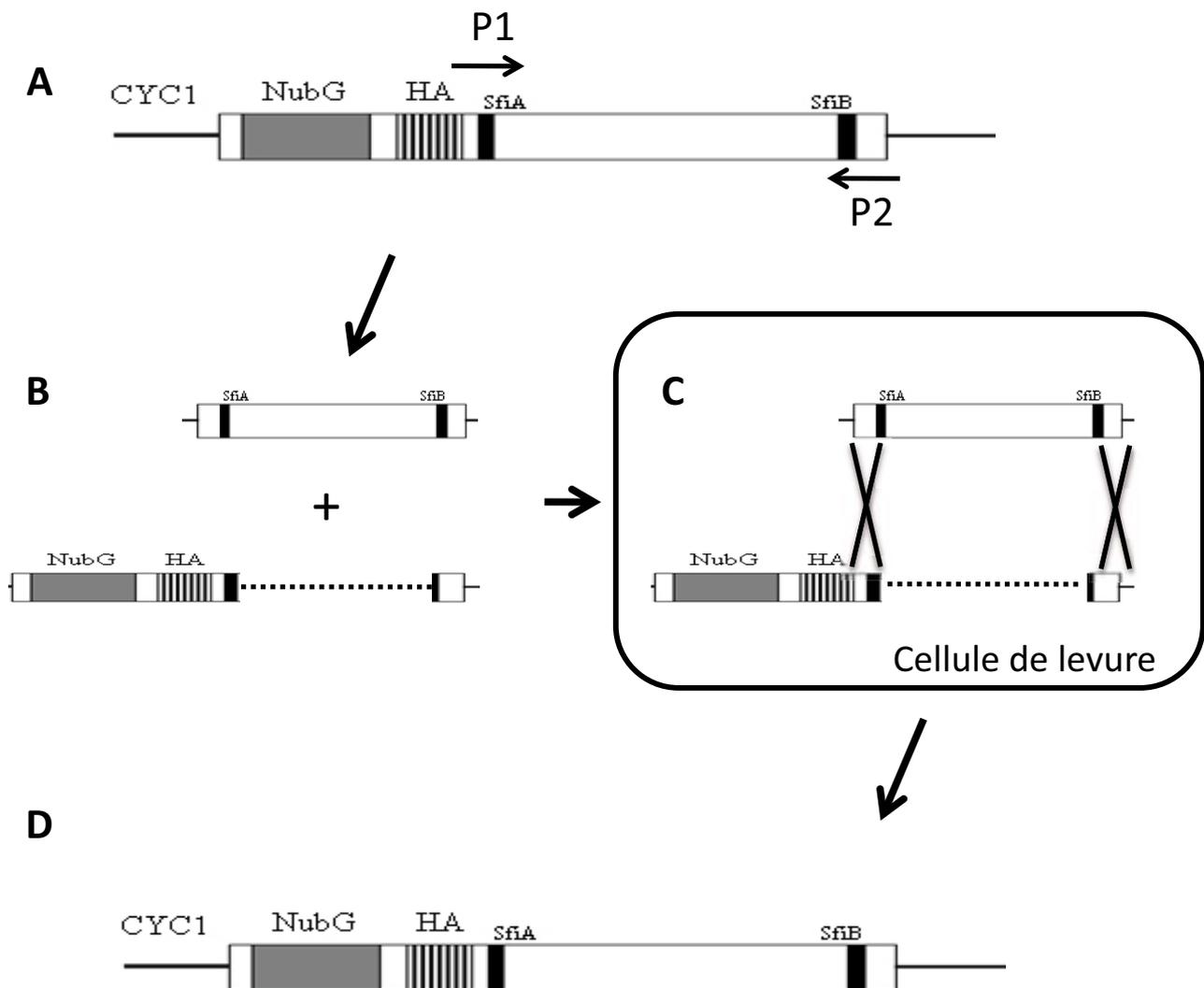


Figure 33. Principe de la recombinaison homologue dans les cellules de levure

(A) Un insert ADNc issu d'un clone positif est amplifié à l'aide d'amorce spécifiques hybridant sur le vecteur proie. (B) Cet amplicon PCR est mélangé avec une préparation de plasmide proie vide et linéarisé entre les sites d'hybridation des amorces PCR. (C) Les deux fragments d'ADN sont introduits dans la levure par transformation et recombinaison. (D) Le plasmide proie est reconstitué avec la séquence d'ADNc amplifiée par PCR.

après 3 jours de croissance et 600 clones supplémentaires à 3,5 jours. Les colonies ont été stockées dans de l'eau glycérolée à 20% et conservées à -20°C.

1-3) Identification préliminaires des candidats partenaires de LYK3

Afin d'avoir un aperçu de la nature des clones positifs récupérés et de sélectionner des clones en vue d'une caractérisation future, 66 clones et 84 clones récoltés après 3 jours et 3.5 jours de croissance respectivement ont été amplifiés par PCR à l'aide d'amorces hybridant sur les bordures du vecteur encadrant les inserts ADNc. Les 150 produits PCR obtenus ont été séquencés et une analyse bioinformatique des séquences est présentée dans le **Tableau 4**. Les clones ont été identifiés par homologie de séquence nucléotidique avec la banque d'ESTs séquencés par le laboratoire (MENS) et le score de l'algorithme BLASTn utilisé est donné. Pour chaque clone, le tableau contient le numéro d'accèsion de l'EST le plus proche, de même qu'une annotation sommaire de la protéine correspondante. La fréquence parmi les clones positifs séquencés ainsi que leur détection dans un crible effectué en parallèle dans l'équipe contre la protéine DMI2 dans le même système Split-Ubiquitine sont indiqués.

Il apparaît que 19 séquences ont été retrouvées entre 2 et 30 fois. Six candidats sont retrouvés plus de 5 fois et parmi eux, trois ont été retrouvés dans le crible DMI2. Ces candidats ne semblent donc pas spécifiques à LYK3. Ce séquençage permet de voir que de nombreuses protéines sont impliquées dans la voie sécrétoire (ex. Signal Peptidase, sous unités SEC61). Cela est attendu, considérant que la protéine appât utilisée contient le peptide signal SUC et qu'elle entre dans la voie sécrétoire. Il reste qu'une grande diversité de fonctions putatives est représentée parmi ces candidats séquencés (clones non redondants, non décrits) et le séquençage seul, si il permet de donner un aperçu des séquences positives, n'a en revanche pas permis de déterminer des clones plus prometteurs que d'autres.

1-4) Confirmation des interactions : Du 1er criblage au 2nd criblage

Compte tenu du très grand nombre de clones obtenus, il est probable qu'une grande partie soit constituée de faux-positifs. Les faux-positifs peuvent être de nature différentes, comme des protéines « collantes » ou des activateurs du gène rapporteur *HIS3*. Un second crible consistant à re-cloner les ADNc et tester les interactions avec des appâts contrôles a donc été mis en place pour

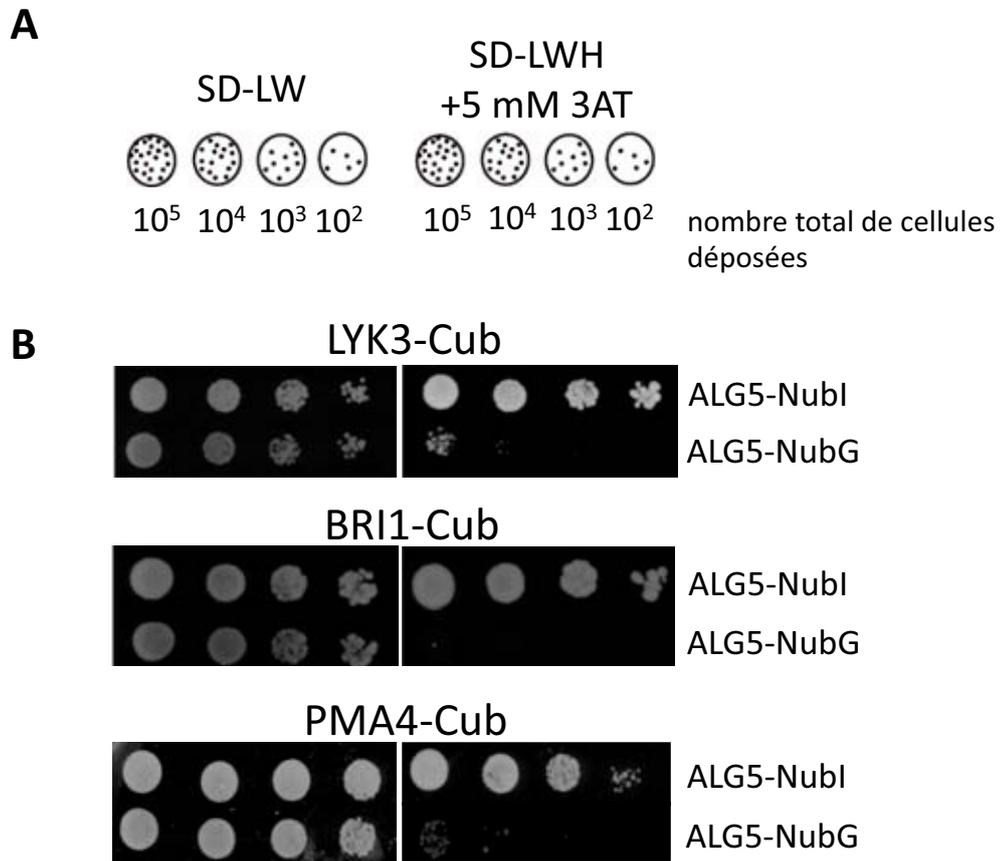


Figure 34. Comparaison des appâts LYK3, BRI1 et PMA4 dans le système double hybride Split-Ubiquitine de levure

(A) Représentation schématique des dépôts de levure sur milieu SD-LW et SD-LWH. Une concentration décroissante de cellules est déposée de gauche à droite. (B) Tests de croissance des double transformants contenant LYK3, BRI1, PMA4 comme appâts.

réduire le nombre de candidats. . Pour cela, une méthode basée sur la recombinaison homologe a été employée. Comparée à l'extraction systématique des plasmides proies de la levure, leur amplification chez *E. coli* puis la re-transformation de levure, la méthode de recombinaison homologe présente le avantage d'être plus rapide.

Les levures sont capables d'effectuer une recombinaison entre deux fragments d'ADN présentant des séquences nucléotidiques courtes et parfaitement similaires. Il est donc possible dans la levure de recombiner un fragment d'ADN amplifié par PCR avec un plasmide linéarisé par restriction si les deux séquences présentent des extrémités identiques (**Figure 33**). La méthode utilisée s'appuie donc sur la recombinaison des amplicons PCR des inserts ADNc des clones obtenus avec le plasmide pDSL linéarisé. Cette recombinaison s'effectue dans une souche de levure exprimant une protéine appât. De plus, cette méthode permet de trier les clones contenant plusieurs plasmides différents. En effet, si plusieurs bandes PCR sont obtenues après amplification, il est peu probable que les évènements de recombinaison reforment la même combinaison de plasmides proies dans les colonies de levure transformées.

Les recombinaisons homologues ont été effectuées en utilisant trois souches de levure exprimant chacune un appât différent. La première exprime l'appât LYK3 utilisé pour le criblage. La seconde exprime la protéine PMA4, cette fois clonée en appât à l'aide du vecteur appât pCCW déjà décrit. La troisième souche de levure exprime le récepteur BRI1 en appât.

L'expression des appâts LYK3, BRI1 et PMA4 dans la levure est comparée avec le contrôle positif ALG5-NubI et le contrôle négatif ALG5-NubG (**Figure 34**). La croissance observée pour le couple PMA4/ALG5-NubI sur milieu sélectif confirme une bonne expression de la protéine PMA4 en appât. Une faible croissance est observée avec le contrôle négatif ALG5-NubG, suggérant une faible instabilité de l'appât PMA4. Cette croissance est cependant abolie en présence de 5mM de 3AT (résultat non montré). Les appâts LYK3 et BRI1 se comportent comme décrit précédemment.

La stratégie utilisée est représentée schématiquement sur la **Figure 35**. Avant d'effectuer ce travail, les clones codant pour la Signal Peptidase (**Tableau 4**) et indiqués comme faux-positifs par la Dualsystems Biotech AG ont été éliminés par criblage PCR à l'aide d'amorces internes spécifiques du gène (résultats non montrés). La recombinaison des fragments PCR a été effectuée dans un premier temps chez les souches de levures exprimant l'appât LYK3 ou PMA4. Deux cas de figure sont possibles :

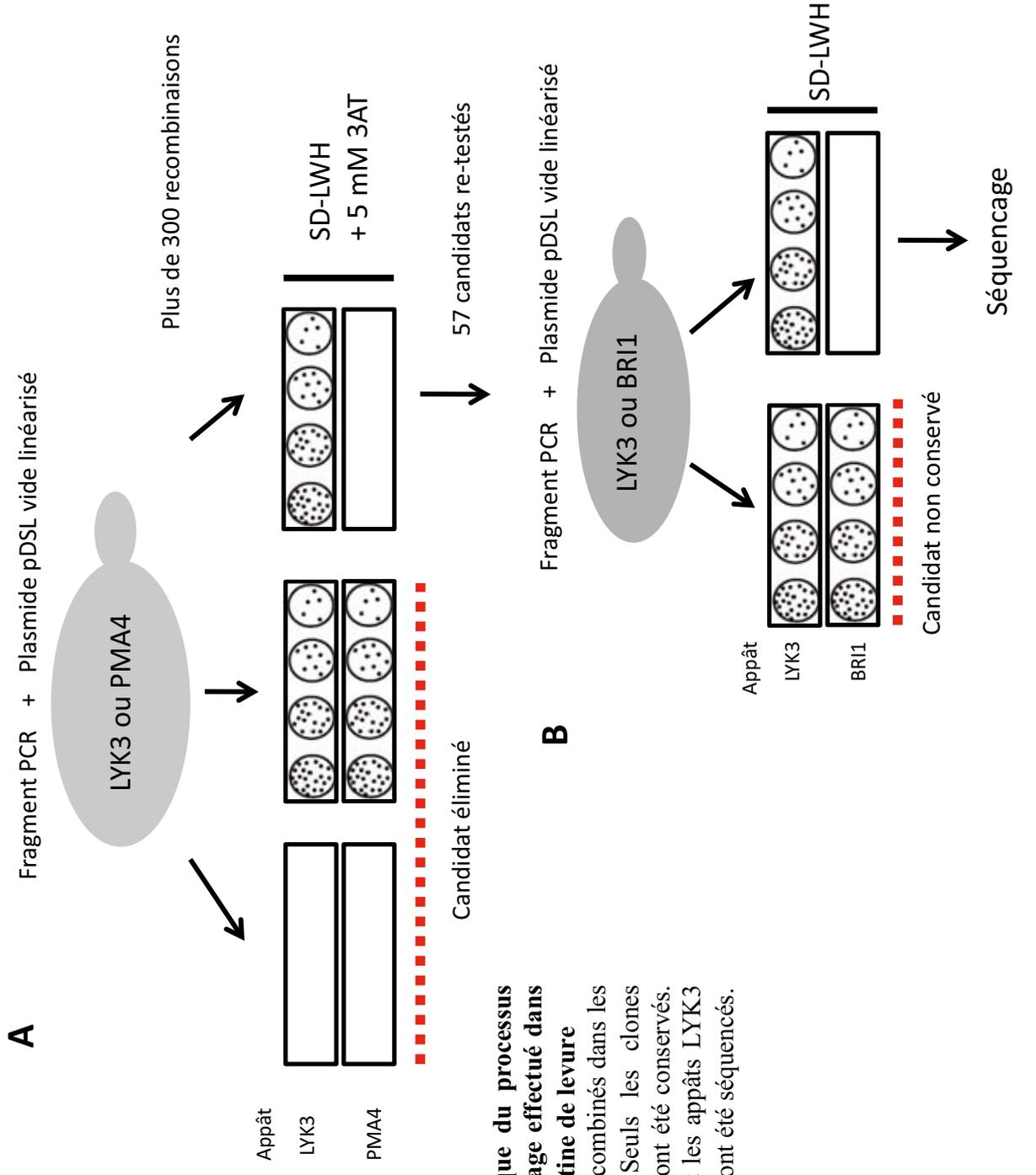
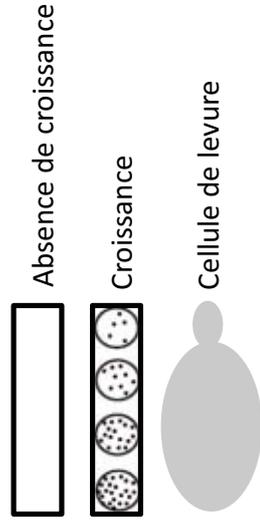


Figure 35. Représentation schématique du processus d'élimination des faux positifs du criblage effectué dans le système double hybride Split-Ubiquitine de levure

(A) Plus de 300 fragments PCR ont été recombinés dans les souches exprimant LYK3 ou PMA4. Seuls les clones interagissant spécifiquement avec LYK3 ont été conservés. (B) L'opération est répétée en comparant les appâts LYK3 et BRI1. Les clones spécifiques de LYK3 ont été séquencés.

Légende :



(i) L'interaction initiale avec LYK3 peut être perdue. Ce type de faux-positifs pourrait être dû à l'apparition de révertants *HIS3*⁺ pendant la procédure de criblage initiale (**Figure 35**).

(ii) L'interaction a lieu aussi avec PMA4. PMA4 étant une protéine membranaire de nature complètement différente de LYK3, cela suggère que ces candidats peuvent interagir avec n'importe quel appât (**Figure 35**). Seuls les fragments PCR permettant la détection d'une interaction spécifique à LYK3 après recombinaison sont conservés. Ce test a été effectué sur plus de 300 fragments PCR.

Cinquante-sept candidats furent conservés à l'issue de cette sélection. Ces 57 candidats ont fait l'objet du même traitement, en comparant cette fois la croissance des levures co-exprimant les appâts LYK3 ou BRI1 (**Figure 35**). Seuls 21 candidats étaient spécifiques de LYK3 après 3 jours de croissance sur milieu sélectif. Ces 21 candidats représentent 9 séquences uniques en phase avec NubG. Ces 9 candidats sont répertoriés dans le **Tableau 5**. Parmi ces candidats retenus, un ne montre plus d'interaction spécifique avec l'appât LYK3 en comparaison de l'appât BRI1 après quatre jours de croissance sur milieu sélectif.

1-5) Conclusion

Le crible effectué contre le récepteur symbiotique LYK3 a permis l'identification de neuf candidats spécifiques à trois jours de croissance. La fréquence avec laquelle ces candidats sont retrouvés est faible, à l'exception d'une protéine de type « Acyl-CoA Binding Protein » retrouvée douze fois, soit moins de 4% des clones testés par recombinaison homologue. Une 14-3-3 a été trouvée deux fois ainsi qu'une protéine membranaire pouvant lier le calcium. Cependant pour cette dernière, la spécificité de l'interaction pour LYK3 comparée à BRI1 est perdue après 4 jours de croissance. Les autres candidats ne sont représentés qu'une seule fois, avec cependant deux protéines proches appartenant à la famille des « Histidine Phosphotransfer Proteins » ou HPT.

Il est important de noter que le test comparatif entre BRI1 et LYK3 a éliminé des protéines candidates interagissant avec les récepteurs kinases. Un rôle dans la signalisation symbiotique pour de tels candidats est possible, l'interaction trouvée avec BRI1 suggérant une capacité pour ces derniers à interagir non spécifiquement avec la région cytosolique des RLKs. Cependant, le choix de faire ce test a été maintenu à cause du grand nombre de clones initiaux sortis du crible.

Tableau 5. Partenaires spécifiques de LYK3 issus du criblage effectué dans le système double-hybride Split-Ubiquitine de levure

MENS EST	GENE INDEX EST	ANNOTATION	FREQUENCE	Spécifique à 3 jours	Spécifique à 4 jours
MitC10022_GC	medicago TC106317	14-3-3 PROTEIN	2	OUI	OUI
MitC00050_GC	medicago TC106865	HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER isoform 1	1	OUI	OUI
MitC63157_GC	medicago TC108942	HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER isoform 2	1	OUI	OUI
MitD01232_GC	medicago TC107728	CALMODULIN	1	OUI	OUI
MitC10268_GC	medicago TC107870	SCP-2 STEROL TRANSFER FAMILY	1	OUI	OUI
MitC00059_GC	medicago TC93925	TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE CYTOSOLIC	1	OUI	OUI
MitC00001_GC	medicago TC100308	MIP FAMILY AQUAPORIN AQP1	1	OUI	OUI
MitC00373_GC	medicago TC94665	ACYL-COA-BINDING PROTEIN ACBP	12	OUI	OUI
No ESTs	No TCs	MEMBRANE EF-HAND CONTAINING PROTEIN	2	OUI	NON

21 clones de levure représentant 9 séquences uniques ont été testés successivement avec la protéine membranaire appât PMA4 et avec le récepteur BRI1. Seule une interaction avec LYK3 a été détectée. Après analyse BLASTn des séquences ADNc, les ESTs les plus proches issus de deux banques d'ESTs sont indiqués, ainsi que l'annotation de la protéine et la fréquence du candidat dans le criblage. La spécificité de l'interaction pour LYK3 en comparaison à BRI1 à trois et quatre jours de croissance sur milieu sélectif SD- LWH + 5mM 3-AT est indiquée. Seul un clone montre une interaction avec BRI1 passés quatre jours de croissance.

2) Criblage d'une banque d'ADNc en système GAL4

2-1) Banque d'ADNc

Nous avons pour ce criblage tiré parti d'une banque d'ADNc de *M. truncatula* disponible au laboratoire et construite par L. Sauviac et F. De Carvalho Niebel (Andriankaja, 2007). Brièvement, cette banque d'ADNc fut générée à partir de poils racinaires de plantules de *M. truncatula*. Ces plantules ont préalablement fait l'objet d'un traitement au NFs (10^{-8} M) pendant 2, 6 et 18 heures, avant d'appliquer un protocole de récolte des poils racinaires par fractionnement à l'azote liquide. Les tissus obtenus après différents temps de traitement ont été regroupés avant de préparer des ADNc. Les ADNc ont été clonés en fusion traductionnelle avec le domaine GAL4-AD en N-terminal dans le vecteur d'expression pGADT7 (Cf. § I, 3, 3-2). Cette banque possède environ 1 million de clones indépendants et la taille moyenne des inserts est de 1.1 kb.

2-2) Appât utilisé et test d'auto-activation

Le système GAL4 contraint à l'utilisation de protéine appât et proie solubles (cf. § I, 3, 3-1). Le récepteur membranaire LYK3 ne satisfait pas ce critère de solubilité puisqu'il contient un domaine transmembranaire. La région intracellulaire du récepteur (LYK3-IR : AA 257 à 620), comprenant la région juxta membranaire, le domaine protéine kinase et la région C-terminale a donc été clonée dans le vecteur d'expression appât pGBKT7 permettant une fusion du domaine BD du facteur de transcription GAL4 en N-terminal.

Avant de cribler la banque, il a été nécessaire de s'assurer que la construction appât n'induisait pas à elle seule la transcription des gènes rapporteurs, un problème souvent rencontré dans le système GAL4. A cette fin, la souche de levure AH109 a été transformée avec la construction appât LYK3-IR et un test de croissance de deux clones indépendants sur milieux SD-W et SD-WH a été effectué (**Figure 36**). Un clone transformé avec un vecteur pGBKT7 vide a servi de contrôle négatif. La transformation de la souche AH109 est confirmée par test de croissance sur milieu SD-W (**Figure 36**). La croissance des deux clones exprimant BD-LYK3-IR sur milieu SD-WH est importante comparée à la croissance du contrôle. Cela indique que

Tableau 6. Test d'auto-activation de *HIS3* chez la levure AH109

	SD-W	SD-WH	SD-WH + 1.25 mM 3AT	SD-WH + 2.5 mM 3AT	SD-WH + 5 mM 3AT	SD-WH + 10 mM 3AT
Contrôle	++	-	-	-	-	-
Clone 1	++	+	-	-	-	-
Clone 2	++	+	-	-	-	-

La croissance de la souche de levure AH109 transformée avec un plasmide contrôle ou pGBKT7-LYK3-IR (clones 1 et 2) a été testée sur milieux SD-W, SD-WH et SD-WH + 3AT à différentes concentrations indiquées. La croissance est notée (+) et l'absence de croissance est notée (-).

l'expression de l'appât seul peut activer la transcription du gène rapporteur *HIS3*. Pour palier ce problème, l'emploi de milieux SD-WH additionné de plusieurs concentrations de 3-AT a été utilisé. Les résultats sont récapitulés dans le **Tableau 6**. Il apparaît que des concentrations de 3-AT comprises entre 1.25 et 10 mM peuvent stopper cet effet.

2-3) Criblage de la banque

Pour le criblage, il a été décidé d'utiliser un milieu de croissance de levure sélectif contenant 10 mM de 3-AT. Cette concentration élevée a été choisie pour réduire le nombre de candidats potentiels en espérant ne conserver que les interactions les plus fortes, bien que l'activation du gène *HIS3* par l'expression seule de BD-LYK3-IR soit contenue dès 1.25 mM de 3-AT. Environ 20 µg d'ADN de la banque ont été utilisés et le nombre de clones criblés a été estimé à environ 1,5 millions par étalement d'une aliquote de la transformation sur milieu SD-LW. Cela représente 1,5 fois le nombre de clones indépendants présents dans la banque. Après trois jours de croissance à 28°C sur milieu SD-LWH +10 mM 3-AT, 38 clones positifs ont été récupérés. Huit clones positifs supplémentaires sont apparus après une journée de croissance additionnelle. Au total, 46 clones positifs ont été obtenus dans ce criblage et tous ont montré une croissance sur milieu SD-LWHA dépourvu d'histidine et d'adénine.

2-4) Identification et confirmation des protéines partenaires de LYK3

Compte tenu du faible nombre de candidats, une amplification par PCR des ADNc contenus entre les sites *Sfi*I du plasmide pGADT7 a été menée chez les 46 clones de levure positifs. Neuf d'entre eux ont montré la présence d'au moins deux produits d'amplification (résultat non montré). Ces clones ont été écartés et les 37 autres produits PCR ont été séquencés. Ce séquençage mena à l'identification de deux ORFs en phase avec le domaine AD en fusion N-terminale et codant deux protéines de *M. truncatula*. Ces deux candidats prototypes (clones #9 et #22), ont été re-testés avec les appâts LYK3-IR et p53 après extraction et ré-amplification des plasmides proies (**Figure 37**). Le couple p53/SV40 sert de contrôle positif d'interaction dans ce système GAL4. Les résultats de ces tests de croissance montrent que les deux protéines interagissent avec LYK3-IR mais pas avec la protéine p53 (**Figure 37**).

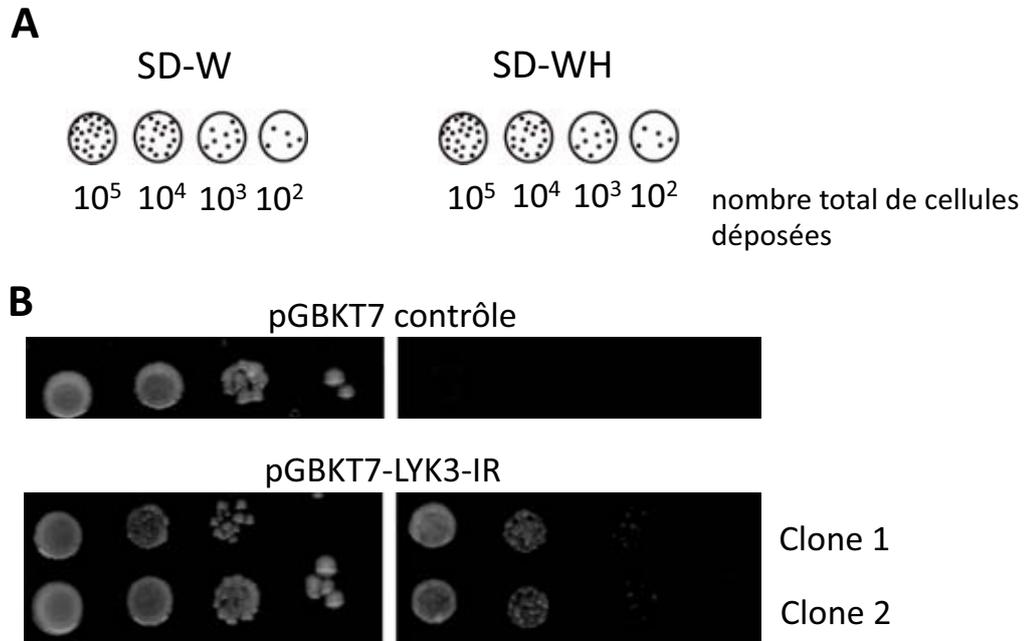


Figure 36. Test d'activation du gène rapporteur *HIS3* de la souche AH109 par l'appât LYK3-IR seul en système double hybride GAL4 de levure

La région intracellulaire de LYK3 (AA 257 - 620) a été clonée dans le vecteur appât pGBKT7. L'activation du gène rapporteur *HIS3* dans la souche de levure AH109 a été testée (A) Représentation schématique des dépôts de levure sur milieu SD-W et SD-WH. Des concentrations décroissantes de cellules ont été déposées de gauche à droite. (B) Tests de croissance d'un clone de levure transformée avec un vecteur pGBKT7 contrôle et de deux transformants indépendants (clone1 et clone 2) contenant chacun la construction pGBKT7-LYK3-IR.

Par analyse BLASTn, le premier ORF (clone #9) correspond à un EST de *M. truncatula* annoté MtC00332_GC. Le gène correspondant code pour un facteur de transcription putatif TIFY-CCT2. Ce facteur de transcription putatif représente 5 clones au total sur les 37 clones du crible. Cependant une délétion d'une paire de base en 5' du gène induisant un changement de phase fut détectée par séquençage chez les 5 clones (résultat non montré). La protéine pleine longueur avec les domaines identifiés par homologie PFAM est schématiquement représentée sur la **Figure 38A** ainsi que la position relative de la mutation détectée. Le gène codant pour ce facteur de transcription fut ré-amplifié à partir de la banque d'ESTs disponible au laboratoire et cloné dans le vecteur proie pGADT7. Un test d'interaction entre LYK3-IR et ce candidat re-cloné, nommé TIFY, fut effectué (**Figure 38C**). La croissance des levures exprimant LYK3-IR et TIFY est faible et ne concerne que la dilution la plus forte comparée à la croissance des levures co-exprimant LYK3-IR et le clone #22. Cela suggère que ce candidat interagit plus faiblement avec LYK3-IR que la protéine #22.

Par analyse BLASTn, le second ORF (clone #22), représenté par les 32 clones positifs restant, code une E3 ubiquitine ligase de la famille des U-Box et nommée MtPUB1 (Cf. Chapitre III). Deux populations de clones furent identifiées, l'une codant la protéine pleine taille (ex. clone #22) et d'autres codant une version tronquée de son domaine N-terminal. La protéine pleine longueur avec les domaines identifiés par homologie PFAM est schématiquement représentée sur la **Figure 38B**. Un test d'interaction avec LYK3-IR, après extraction puis amplification chez *E. coli* du plasmide contenu dans le clone #22, a été effectué. Cette protéine interagit avec LYK3-IR (**Figure 38C**).

2-5) Spécificité de l'interaction LYK3-IR/MtPUB1

En parallèle du criblage GAL4 effectué contre la région cytosolique de LYK3, deux autres criblages en système GAL4 avec les régions intracellulaire de DMI2 et de NFP ont été menés par C. Hervé dans l'équipe. De manière intéressante, la protéine MtPUB1 est aussi ressortie comme le partenaire majoritaire de DMI2. MtPUB1 n'a pas été identifiée dans le crible contre NFP. Les tests d'interactions entre les trois régions intracellulaires des récepteurs symbiotiques et MtPUB1 sont présentés **Figure 39**. MtPUB1 interagit dans la levure avec les régions intracellulaires de LYK3 et DMI2 clonées dans le vecteur d'expression pGBKT7, confirmant les résultats du criblage contre la région cytosolique de DMI2.

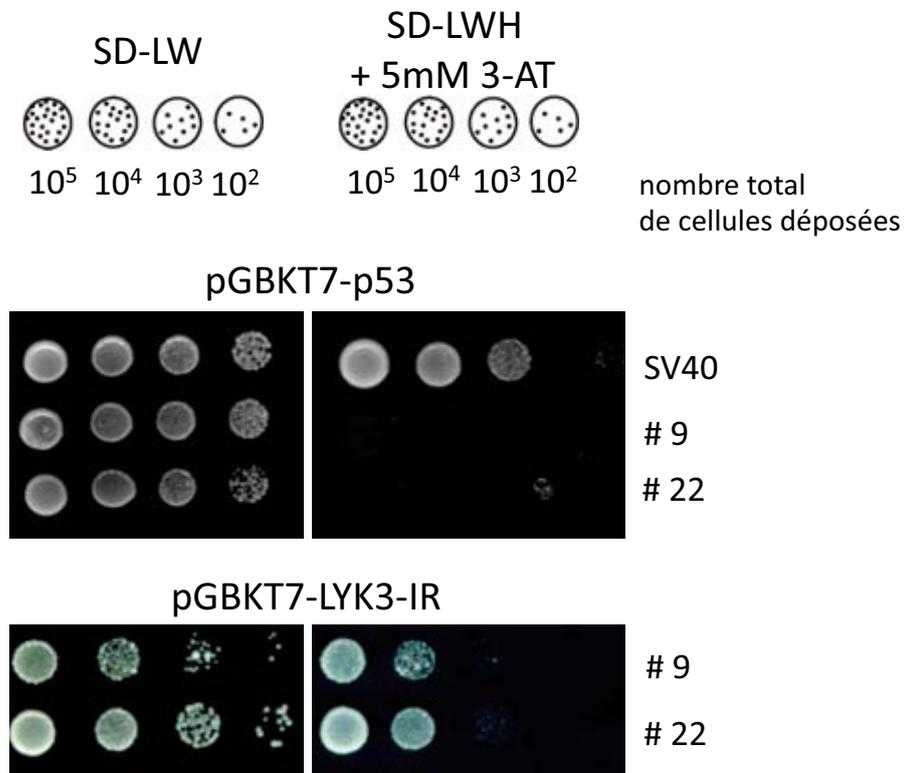


Figure 37. Résultats du criblage contre LYK3-IR en système double hybride GAL4 de levure

Des concentrations décroissantes de cellules sont déposées de gauche à droite sur milieux SD-LW et SD-LWH + 5mM 3AT. Le couple appât p53 / proie SV40 sert de contrôle d'interaction positive dans le système GAL4. Les clones #9 et #22, représentatifs des clones positifs obtenus, sont testés avec les deux appâts p53 et LYK3-IR.

Pour tester la spécificité de ces deux interactions, plusieurs domaines intracellulaires de récepteur kinases issus de plantes ont par la suite été testés comme appâts contrôles. Les domaines intracellulaires des récepteurs présentés précédemment BRI1, MtLRR1.1, LYK2 et LYK4 ont été clonés dans un vecteur appât modifié pGBGW afin de permettre l'utilisation de la technologie de clonage Gateway (Cf. Chapitre III). Pour des raisons d'homogénéité, les domaines intracellulaires des récepteurs symbiotiques LYK3 et DMI2, ainsi que celui de NFP, ont été re-clonés dans ce même vecteur pGBGW. Tous les clonages par Gateway dans le vecteur pGBGW ont pour particularité d'utiliser les séquences des régions intracellulaires des récepteurs sans leur codon stop. Cela induit l'expression de protéines contenant une extension de 18 acides aminés en C-terminal. A l'inverse, les clonages des domaines cytosoliques des récepteurs symbiotiques dans le vecteur pGBKT7 ont tous été effectués par restriction avec des séquences contenant leur codon stop original. Les résultats d'interactions entre MtPUB1 et les domaines cytosoliques de LYK3, DMI2 et NFP clonés par Gateway sont présentés **Figure 39**.

De manière surprenante, les tests d'interactions menés avec les domaines intracellulaires des récepteurs symbiotiques clonés dans le plasmide appât pGBGW indiquent que LYK3-IR interagit toujours avec MtPUB1 mais plus DMI2-IR (**Figure 39**). Quelque soit le type de clonage, aucune interaction n'a été détectée avec la région intracellulaire de NFP (**Figure 39**). Ce résultat suggère que si l'interaction LYK3/MtPUB1 est indépendante de la modification du domaine C-terminal de LYK3, l'interaction DMI2/MtPUB1 pourrait être sensible à une modification du domaine C-terminal de DMI2.

2-6) Conclusion

A l'issue du criblage contre le domaine intracellulaire de LYK3 dans le système GAL4, moins de 50 candidats ont été obtenus avec seulement deux types de clones différents. MtPUB1, une protéine de la famille des U-Box a été retrouvée 32 fois. MtPUB1 représente plus de 80% des clones positifs retrouvés et montre une spécificité d'interaction pour LYK3 parmi les LysM-RLKs utilisés. En effet ni LYK2, LYK4 ou NFP ne sont capables d'interagir avec MtPUB1 (Cf. Chapitre III). MtPUB1 est en revanche capable d'interagir avec le domaine intracellulaire du LRR-RLK symbiotique DMI2 mais pas avec ceux des LRR-RLK non symbiotique BRI1 et MtLRR1.1. Ce dernier résultat devra cependant être répété

Chapitre I en utilisant des stratégies de clonages identiques pour les trois LRR-RLKs testés.

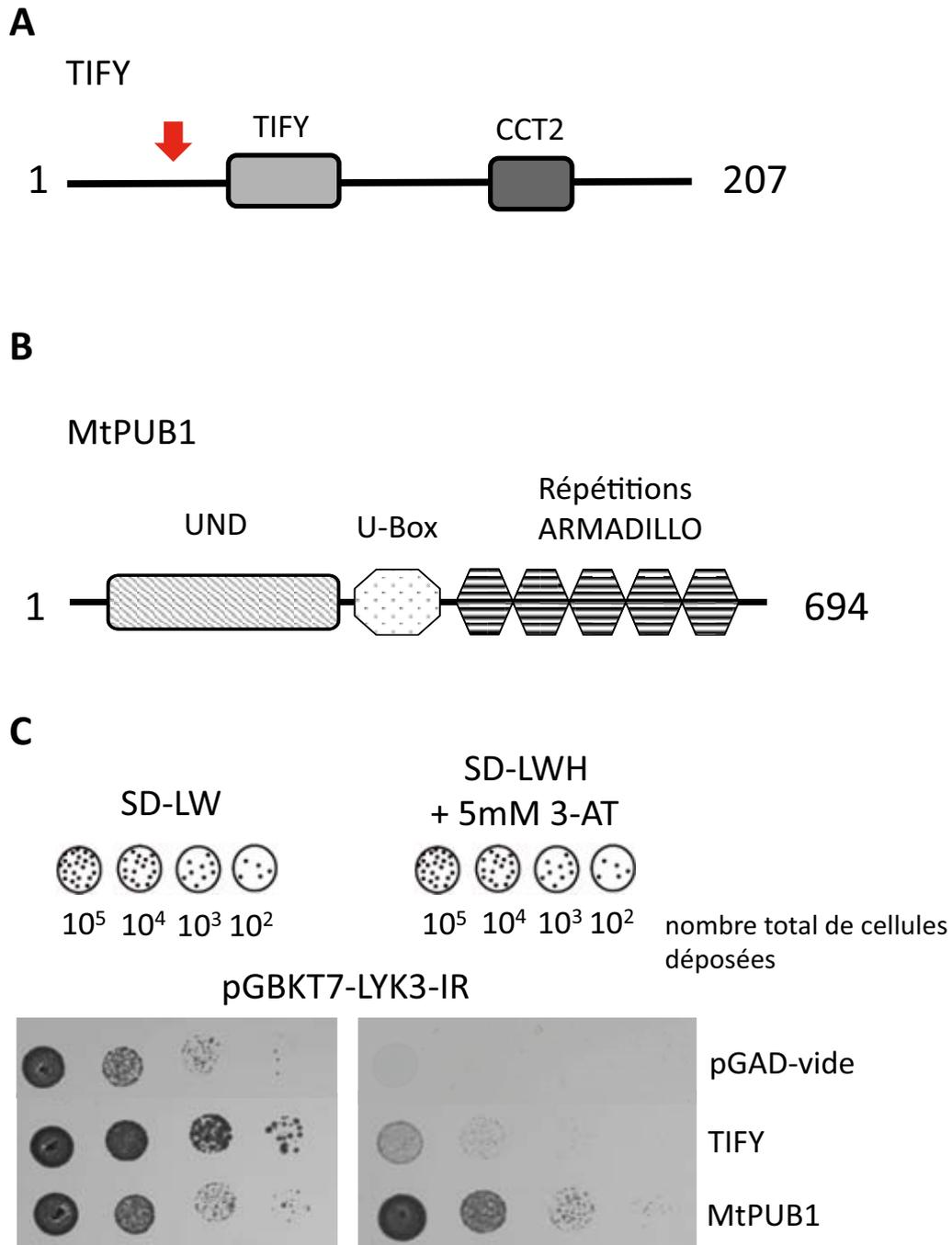


Figure 38. Confirmation des candidats du crible en système double hybride GAL4 de levure

(A) Organisation en domaines du candidat TIFY identifié dans le crible. La flèche rouge indique la position relative de la mutation hors-phase détectée. (B) Organisation en domaines du candidat MtPUB1. (C) Test d'interaction des clones positifs obtenus par criblage. Des concentrations décroissantes de cellules sont déposées de gauche à droite. La croissance des levures est testée sur SD-LW et SD-LWH + 5mM 3AT. Le plasmide proie pGADT7 vide sert de contrôle négatif. Le candidat TIFY re-cloné est comparé au second candidat identifié MtPUB1.

3) Choix du candidat pour la poursuite des travaux de recherche

Chacun des deux criblages effectués contre le récepteur symbiotique LYK3 ont permis l'identification plusieurs protéines jusque là non décrites pour jouer un rôle dans la symbiose entre *M. truncatula* et *S. meliloti*. Un choix parmi ces candidats a donc du être fait. Un critère important guidant ce choix a été la fréquence avec laquelle les candidats ont été trouvés.

Dans le système Split-Ubiquitine, le candidat le plus fréquent (ACBP) représente moins de 4% des clones initiaux alors que dans le système GAL4, MtPUB1 représente plus de 80% des clones initiaux. Un séquençage aléatoire de 10.000 ADNc effectué sur la banque utilisée dans le crible GAL4 a détecté 4 fois la séquence codante de MtPUB1, soit 0,04 % des ADNc de la banque (F. De Carvalho-Niebel, communication personnelle). L'abondance relative de MtPUB1 dans la banque d'ADNc comparée à la fréquence avec laquelle il est retrouvé dans le crible GAL4 suggère donc une interaction réelle entre les deux protéines *in vivo*. De plus, plusieurs travaux de recherche antérieurs ont mis en évidence une interaction entre un RLK et une protéine UND-PUB-ARM (Cf. Introduction). Pour ces raisons, la protéine MtPUB1 a été choisie comme candidat pour continuer mes travaux de recherche.

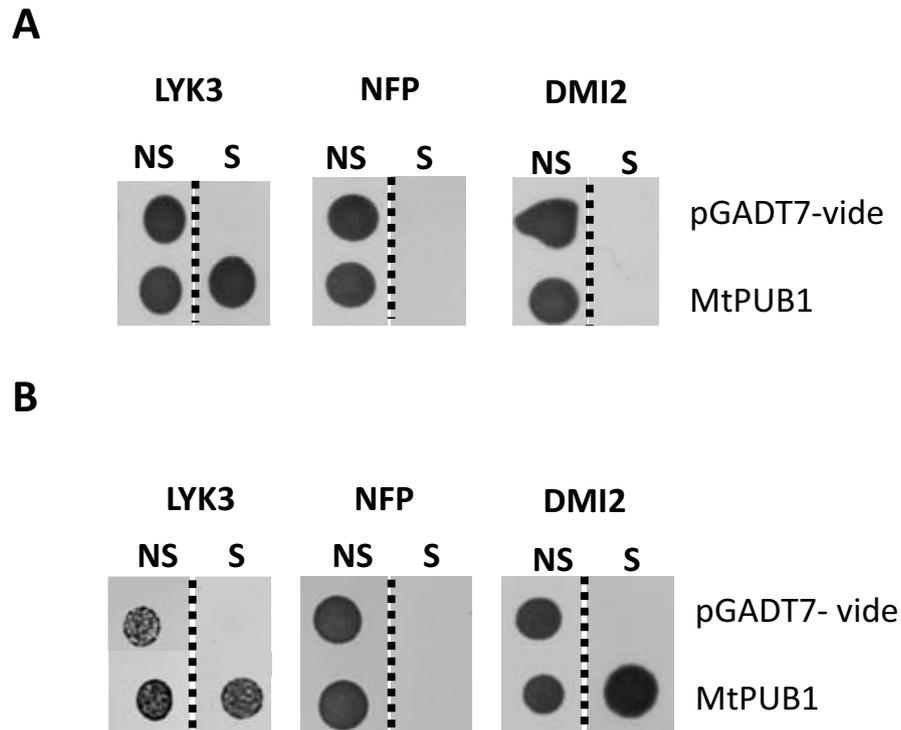


Figure 39. Spécificité d'interaction entre MtPUB1 et les domaines intracellulaires des récepteurs kinase LYK3, NFP et DMI2

Seule la croissance d'une goutte de dilution $DO_{546}=0.1$ est montrée sur milieu non sélectif NS (SD-LW) et sur milieu sélectif S (SD-LWH + 5 mM 3AT). (A) Les régions cytosoliques de LYK3, NFP et DMI2 ont été clonées en appât sans leur codon stop originel dans le plasmide pGBW. Les interactions avec le plasmide vide ou contenant la séquence de MtPUB1 sont testées (B) Les régions cytosoliques de LYK3, NFP et DMI2 ont été clonées en appât avec leur codon stop originel dans le plasmide pGBKT7. Les interactions avec le plasmide vide ou contenant la séquence de MtPUB1 sont testées.

CHAPITRE II

Article

«Une protéine de la famille des remorines interagit avec les récepteurs
kinase symbiotiques de *Medicago truncatula* et régule l'infection par
Sinorhizobium meliloti »

-

« A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates
bacterial infection »

-

Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol 107, p. 2343-2348 (2010)

Résumé de l'article

Des approches transcriptomiques effectuées précédemment ont mis en évidence un gène codant une remorin (MtREM2.2) comme étant fortement induit dans les nodules formés sur les racines de *M. truncatula* en comparaison aux racines non inoculées par le symbionte. Pour confirmer ces résultats, des études d'expressions dans différents organes de *M. truncatula* ont donc été menées sur neuf gènes codant des remorines et MtREM2.2 montra un profil d'expression unique parmi les remorines testées et restreint aux tissus nodulaires. MtREM2.2 fut par conséquent renommée MtSYMREM1. L'activation de la transcription de MtSYMREM1 suit le processus de nodulation et l'application de NFs purifiés suffit à activer la transcription du gène de manière transitoire entre 24 heures et 72 heures après traitement de racines de *M. truncatula*. La localisation subcellulaire de MtSYMREM1 a été démontrée à la membrane plasmique chez *N. benthamiana* par microscopie fluorescente à l'aide d'une fusion CFP-MtSYMREM1. Chez *M. truncatula*, MtSYMREM1 est présente à la membrane plasmique des cordons d'infection dans les nodules et à la membrane des symbiosomes, structures entourant les bactéroïdes dans la zone de fixation du nodule, comme déterminé par l'utilisation d'anticorps spécifiques couplée à une détection par fluorescence ou par microscopie électronique. Il a de plus été montré, chez *M. truncatula*, que MtSYMREM1 est enrichie dans des sous-domaines de la membrane plasmique appelés radeaux lipidiques.

Le rôle de MtSYMREM1 dans la symbiose rhizobium légumineuse a pu être déterminé en générant des plantes ARN interférent par transformation avec *Agrobacterium rhizogenes* et *Agrobacterium tumefaciens* et par la caractérisation d'un mutant d'insertion (Tnt1). La sous-régulation de *MtSYMREM1* par ARN interférant confère un défaut de croissance du cordon d'infection dans le cas de racines obtenus par transformation avec *A. rhizogenes*. A terme, cela se traduit par une augmentation du nombre de cordons d'infection et une diminution du nombre de nodules en comparaison des plantes contrôles. Le mutant (Tnt1) homozygote NF4432, chez lequel la protéine MtSYMREM1 n'est plus détectée, présente lui aussi une réduction du nombre de nodules estimée à 26% par rapport à la plante sauvage, un résultat confirmé chez une plante ARN interférent obtenue par transformation avec *A. tumefaciens*. De plus, les nodules formés chez ce mutant sont plus petits que les nodules formés chez la plante sauvage et présentent des cordons d'infections anormalement larges et ramifiés.

Considérant la localisation de MtSYMREM1 à la membrane plasmique, son profil d'expression et le phénotype d'infection des mutants, des tests d'interactions entre MtSYMREM1 et les RLKs symbiotiques NFP, LYK3 et DMI2 ont été menés. Il a été démontré que MtSYMREM1 est capable d'interagir avec les trois RLKs symbiotiques en système double hybride de levure Split-Ubiquitin et dans des expériences de BiFC menées chez *N. benthamiana*. Aucune interaction n'a été observée avec le RLK non symbiotique MtLRR1.1 de *M. truncatula* dans ces mêmes systèmes. MtSYMREM1 est aussi capable de former un homo-oligomère comme démontré en BiFC chez *N. benthamiana*. En conclusion, il est proposé que MtSYMREM1 fonctionne de pair avec les RLKs symbiotiques pendant l'interaction symbiotique, permettant ainsi l'infection.

A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection

Benoit Lefebvre^a, Ton Timmers^a, Malick Mbengue^a, Sandra Moreau^a, Christine Hervé^a, Katalin Tóth^b, Joana Bittencourt-Silvestre^b, Dörte Klaus^a, Laurent Deslandes^a, Laurence Godiard^a, Jeremy D. Murray^c, Michael K. Udvardi^c, Sylvain Raffaele^{d,1}, Sebastien Mongrand^d, Julie Cullimore^a, Pascal Gamas^a, Andreas Niebel^a, and Thomas Ott^{a,b,2}

^aLaboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes, Institut National de la Recherche Agronomique, Centre National de la Recherche Scientifique, 31326, Castanet Tolosan cedex, France; ^bInstitute of Genetics, University of Munich (LMU), 82152 Martinsried, Germany; ^cPlant Biology Division, The Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, OK 73401; and ^dLaboratoire de Biogenèse Membranaire, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 33076 Bordeaux cedex, France

Edited by Jeffery L. Dangl, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, and approved December 2, 2009 (received for review November 17, 2009)

Remorin proteins have been hypothesized to play important roles during cellular signal transduction processes. Induction of some members of this multigene family has been reported during biotic interactions. However, no roles during host-bacteria interactions have been assigned to remorin proteins until now. We used root nodule symbiosis between *Medicago truncatula* and *Sinorhizobium meliloti* to study the roles of a remorin that is specifically induced during nodulation. Here we show that this oligomeric remorin protein attaches to the host plasma membrane surrounding the bacteria and controls infection and release of rhizobia into the host cytoplasm. It interacts with the core set of symbiotic receptors that are essential for perception of bacterial signaling molecules, and thus might represent a plant-specific scaffolding protein.

nodule | receptor-like kinase | signaling | symbiosis | scaffolding protein

Root nodule symbiosis requires a complex molecular dialogue between the host and the bacteria during which the microbial symbionts remain surrounded by a host-derived plasma membrane (PM) forming an infection thread (IT) from which they are liberated at later stages into symbiosomes. Nod factors (NFs) are key signaling molecules secreted by rhizobia that are essential for triggering the first steps of infection and nodule organogenesis of legume plants, and several receptor-like kinases (RLKs) are involved in NF perception (1–6). In the model legume *Medicago truncatula*, perception of NFs produced by its rhizobial symbiont *Sinorhizobium meliloti* has been shown to be mediated by the LysM-RLK NFP (1). NFP is necessary for all NF-dependent symbiotic responses and infection. Another LysM RLK, LYK3 (3, 7), and an LRR RLK, DMI2 (2, 8), are also involved in the control of bacterial entry and invasion. Recent data strongly suggest the importance of NFP, LYK3, and DMI2 in both early (root hair responses) and later (nodule infection and bacterial release) stages of symbiotic interactions, as all three RLKs are involved in IT initiation and progression (1, 3, 8) and are expressed specifically in a nodule zone where bacteria infect the host plant (1, 8). Regulatory components such as scaffolding proteins with concordant localization have never been described.

Plant-specific remorin proteins were discovered almost two decades ago and, although they do not contain transmembrane domains, they have so far been almost exclusively detected in detergent-insoluble membrane fractions (commonly called lipid rafts) prepared from PM extracts (9). Interestingly, several members of the remorin family (10) were found to be differentially regulated during plant-microbe interactions, indicating functions during microbial infection and plant signaling processes (11–14). Indeed, a remorin protein (StREM1.3) that was shown to be associated with the PM and to be phosphorylated upon treatment of potato leaves with polygalacturonic acid (15) has been suggested to play roles in cell-to-cell signaling and plant defense (16). This group of remorins was shown to bind oligogalacturonides and other polyanionic molecules, form oligomeric

filamentous structures in vitro, and share structural similarities to viral movement proteins (15–17). Involvement of this group of remorins in controlling viral spreading in leaves has recently been demonstrated (18). Pivotal roles of remorin proteins in plant-microbe interactions are also supported by a strong induction of another protein family member in nodulated roots of the model legumes *M. truncatula* and *Lotus japonicus* (19, 20).

Roles of these plant-specific remorins remain unclear. We have chosen root nodule symbiosis as an inducible, biologically highly relevant yet dispensable system to explore the role of a remorin protein in detail. We show that a remorin is required for plant-bacteria interactions and can interact with several RLKs. Our findings imply the existence of specific signaling complexes involved in NF perception in PM subdomains.

Results and Discussion

Transcriptome studies in *M. truncatula* revealed a remorin gene (*MtREM2.2*) belonging to phylogenetic group 2 (10) to be highly induced in root nodules compared to uninoculated roots (19, 20). To verify these findings, we profiled organ-specific gene expression of all nine currently known remorins from *M. truncatula* using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and found that *MtREM2.2* has a unique transcriptional signature (Fig. S1) compared to any other remorin gene. This gene was found to be almost exclusively expressed in nodules and to be about 1000-fold induced during bacterial infection and nodule organogenesis (Fig. 1A and B). Thus we named the gene *M. truncatula* symbiotic remorin 1 (*MtSYMREM1*). Western blot analysis using *MtSYMREM1*-specific antibodies detected a 33-kDa band as described for StREM1.3 (16) and showed that protein accumulation in nodules follows its transcriptional pattern (Fig. 1C). Because infection and nodule development strictly depend on both partners, we surveyed microarray data from our laboratory where roots were inoculated with bacterial mutants that are blocked at different stages of infection or differentiation. Less induction of the *MtSYMREM1* gene was found upon inoculation of plants with a rhizobial mutant strain that is impaired in infection (*exoA*), whereas strong induction of expression was

Author contributions: B.L., T.T., S.R., S. Mongrand, J.C., P.G., A.N., and T.O. designed research; B.L., T.T., M.M., S. Moreau, C.H., K.T., J.B.-S., D.K., and T.O. performed research; L.D., L.G., J.D.M., M.K.U., S.R., and S. Mongrand contributed new reagents/analytic tools; B.L., T.T., J.C., P.G., and T.O. analyzed data; and B.L. and T.O. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Database deposition: *MtSYMREM1* (BG580614) and *MtLRR1.1* (EU849167) at GenBank.

¹Present address: Sainsbury Laboratory, John Innes Centre, Norwich, NR4 7UH, United Kingdom.

²To whom correspondence should be addressed. E-mail: thomas.ott@biologie.uni-muenchen.de.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0913320107/DCSupplemental.

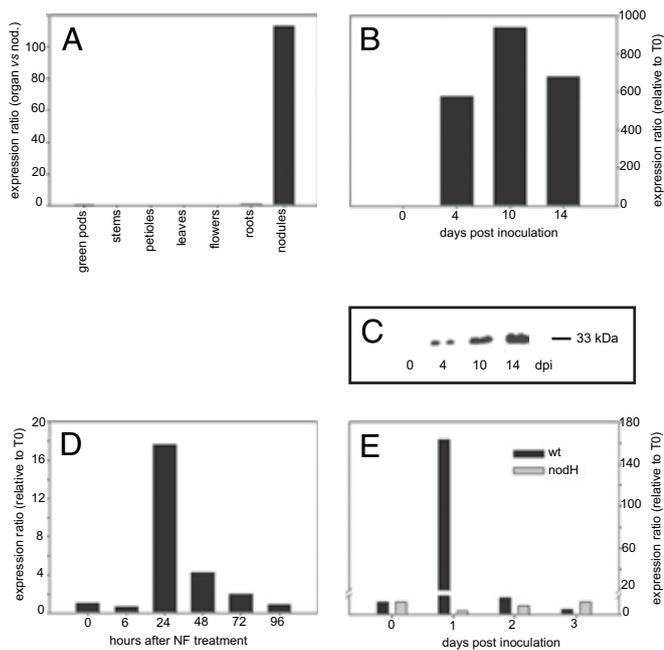


Fig. 1. *MtSYMREM1* is induced in *M. truncatula* nodules and in response to Nod factors. Expression of *MtSYMREM1* in *M. truncatula* was studied using qRT PCR (A, B, D, and E) and western blotting (C). (A) *MtSYMREM1* is almost exclusively transcribed in nodules, whereas basal expression levels were detected in most plant organs. Induction of *MtSYMREM1* can be observed 4 dpi at the gene (B) and protein (C) level. (D) Transient induction of *MtSYMREM1* upon treatment of roots with purified *S. meliloti* NFs (10^{-8} M). (E) Expression of *MtSYMREM1* upon inoculation of roots with wild-type *S. meliloti* and a mutant *nodH* strain that is affected in NF structure. Experiments were performed on three independent biological samples. Graphs show results from individual representative experiments. Plants were grown aeroponically (A and B) and in pouches (C and D).

observed with rhizobial mutants that infect the plant but which are unable to fix atmospheric nitrogen (*bacA* and *fixJ*) (Fig. S2). These data suggest roles of *MtSYMREM1* during bacterial infection. To assess a role during the very first steps of bacterial perception by the host plant, we applied purified bacterial NFs to *M. truncatula* roots and measured transcript levels in a time course experiment. A first and transient induction of *MtSYMREM1* was found within the first 24 h after NF application (Fig. 1D), confirming data from a transcriptomics approach (21). A similar pattern was found within the first day post inoculation (dpi) of roots with wild-type rhizobia, whereas no induction was found when roots were inoculated with a mutant *nodH* strain that has lost the ability to elicit initial morphological changes such as root hair curling and IT formation on *M. truncatula* roots (Fig. 1E). Such a transcriptional signature strongly suggests roles of *MtSYMREM1* during preinfection steps of the establishment of symbiosis, possibly during initiation of the ITs in the roots and throughout the lifespan of the nodules.

To assess whether *MtSYMREM1* is required for bacterial infection and release, we generated a specific RNA interference (RNAi) construct targeting the 5' nonconserved region of *MtSYMREM1* transcripts and obtained transgenic roots of *M. truncatula* by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated gene transfer. Plants were grown vertically in pouches and subsequently inoculated with *S. meliloti* carrying a β -galactosidase gene (*LacZ*) for visualization. *MtSYMREM1*-RNAi roots developed 36.5% fewer nodules at 2 weeks postinoculation (wpi) [Student's *t* test $P = 0.0001$; $n = 134$ (control) and $n = 134$ (*MtSYMREM1*-RNAi)]. Among these, 31.3% of the *MtSYMREM1*-RNAi plants did not nodulate under these conditions, whereas only 10.4% of

the empty vector were not nodulated (Fig. S3A). Some *MtSYMREM1*-RNAi plants were kept for 6 wpi and analyzed in more detail. The examination of 15 control and 26 *MtSYMREM1*-RNAi plants revealed that about 31% of all transgenic plants did not develop any nodules, whereas in 35% of plants, nodules were abnormal and remained small and white. In contrast, 93% of all roots transformed with the vector control developed nodules that were not altered in their morphology (Fig. S3B). Such a spectrum of phenotypes (no nodules, and abnormal and normal nodules) likely depends on the level of silencing in the different RNAi plants, and has also been reported in studies on the symbiotic RLKs *NFP*, *LYK3*, and *DMI2*, implying that all these genes are required throughout infection and nodule organogenesis (1, 3, 8). To examine the impact of *MtSYMREM1* on infection, rhizobia were visualized by *LacZ* staining inside host roots and nodules. RNAi roots of *A. rhizogenes*-transformed composite plants showed about 3-fold more ITs (Fig. S3C) than the control, with most of them being aborted or highly branched in outer cell layers of the root (Fig. S3D). In addition, we occasionally observed uncontrolled release of bacteria into epidermal cells (Fig. S3D). An effect at this early step of IT formation in root hairs is coherent with the induction of *MtSYMREM1* transcription 24 h after NF addition. Formation of sac-like structures and high degrees of branching of the IT also indicate a loss in IT stability and polarity and demonstrate roles of *MtSYMREM1* during bacterial infection. From these data, we hypothesize that altered infection in *MtSYMREM1*-RNAi roots led to the development of fewer or no nodules, the latter possibly due to mild infection conditions in pouches, whereas plants attempted to compensate for this effect by initiation of more infection threads.

In parallel, two stable *Medicago* RNAi lines were obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer. To assess the phenotype of these plants, several cuttings from RNAi lines and from control plants carrying the empty vector were grown aeroponically and examined 32 dpi (Fig. 2A–F). In one of the transgenic lines (line 2), abnormal nodules were observed (Fig. 2D–F). Nodules were spherical instead of elongated, possibly due to a smaller meristematic zone (Fig. 2D and E). Using electron microscopy, we showed that in RNAi line 2, ITs in zone II were about 3-fold larger, indicating retarded bacterial release (Fig. 2F). In contrast, control plants showed normal nodules, as did *MtSYMREM1*-RNAi line 1 (Fig. 2A and B and Fig. S3E). Concordant with these observed phenotypes, *MtSYMREM1* RNA levels were found to be reduced by about 50% in line 2, whereas control plants and line 1 exhibited similar *MtSYMREM1* RNA levels (Fig. S3E). None of the other remorin genes were silenced by this construct (Fig. S3F). Overall plant growth was not affected in any of the lines, demonstrating that *MtSYMREM1* function is specific for rhizobial infection and nodule development.

We also made use of the recently established *Tnt1* transposon mutant collection (The Samuel Roberts Noble Foundation) and searched for insertion lines in the *MtSYMREM1* gene. Two lines (NF4432 and NF3495) were identified during the screen. Whereas NF3495 carries the insertion at the end of the second intron, the transposon inserted into the end of the last exon in line NF4432 (Fig. 2H). Seeds of both lines were grown for the R2 generation to obtain sufficient seed stock for a segregation analysis. Genotyping revealed a strongly altered segregation of NF3495, whereas line NF4432 segregated in the expected 1:2:1 fashion (wild-type:heterozygous:homozygous). Thus, insertion line NF4432 was used for phenotypical analysis. Plants were grown aeroponically and phenotypic assessment was performed on 88 individual plants from segregating populations 3 wpi. Overall, this line showed significantly reduced numbers of nodules (26%; Student's *t* test, $P \leq 0.01$) compared to wild-type plants (Fig. 2G). To test whether the insertion led to full knockout of *MtSYMREM1*, we extracted proteins from isolated nodules of heterozygous, homozygous, and wild-type plants of this mutant line. No *MtSYMREM1* protein was detected

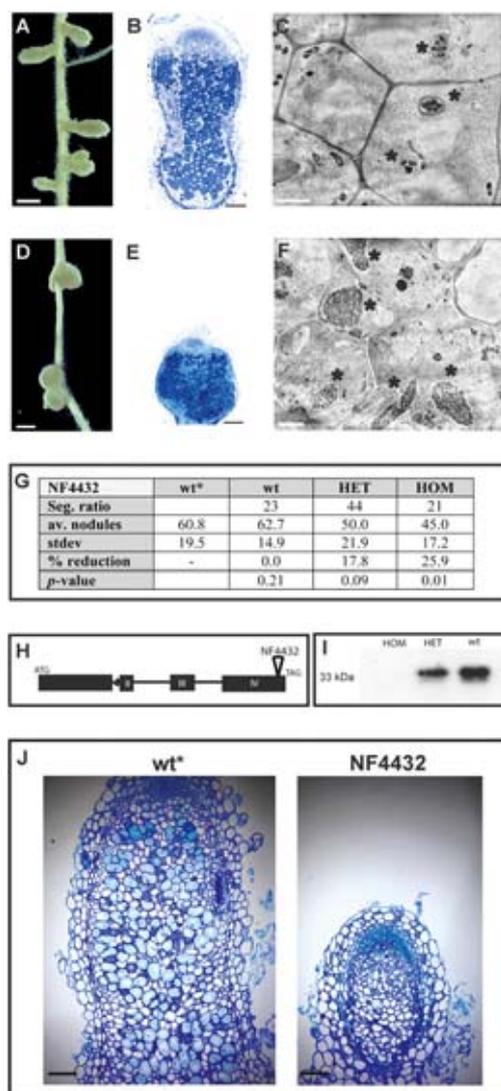


Fig. 2. MtSYMREM1 is required for nodulation and infection. Phenotypes were scored on roots transformed with an *MtSYMREM1*-RNAi construct by *A. tumefaciens* (A–F)-mediated gene transfer. (A–C) Control plants transformed with the empty vector developed normal nodules (A, B). (D–F) Abnormal nodules with altered meristem structure developed on plants with intermediate silencing levels. Electron microscopy showed ITs (*) in zone II to be enlarged (F). A *Tnt1* transposon insertion line (NF4432) was identified (H) and characterized (G–J). Segregation and the nodulation phenotype of this mutant were analyzed (G); wt*, wild-type nodules; wt, nodules from mutant lines that were genotyped as “wild-type” in the *MtSYMREM1* locus; HET, heterozygous; HOM, homozygous; seg., segregation; av., average; stdev, SD; P values were obtained from a Student’s *t* test (significance level $P \leq 0.01$). (I) Western blot analysis on proteins from isolated nodules probed with α -MtSYMREM1 antibodies. MtSYMREM1 protein is not detectable in the homozygous line NF4432. (J) Nodules (3 wpi) from NF4432 were embedded, sectioned, and stained with toluidine blue. [Scale bars, 1 mm (A and D), 5 μ m (C and F), 100 μ m (B, E, and J).]

in homozygous plants, whereas heterozygous and wild-type plants expressed the protein (Fig. 2I). Analysis of microscopic sections of wild-type and NF4432 mutant nodules at 3 wpi revealed that nodules of this line were stunted and more spherical compared to wild-type nodules (Fig. 2J). Infection threads in zone II appeared to be greatly enlarged and highly branched (Fig. S3G), confirming the RNAi-mediated phenotype described above. In contrast to RNAi plants, bacterial liberation from ITs was greatly reduced or com-

pletely absent (reflected by the lack of symbiosome) in these MtSYMREM1 knockout nodules (Fig. S3G). All together, knockdown and knockout plants show that MtSYMREM1 is important for rhizobial infection and regulates progression of infection structures.

We then tested whether MtSYMREM1 localizes to the PM and more specifically to lipid rafts, as accumulation in such putative microdomains has been shown for some group 1 remorins (9, 18, 22), and lipid rafts have been shown to be crucial to control microbial infection of host cells in animals (23). Expression of a CFP-MtSYMREM1 fusion protein in leaf epidermal cells of *Nicotiana benthamiana* revealed the protein to be localized at the PM (Fig. 3A). Protein immunoblotting detected the endogenous MtSYMREM1 protein in microsomal fractions of inoculated roots from *M. truncatula* shortly after inoculation (Fig. 3B). A weak but specific signal was also detected in the fraction containing cytosolic proteins, in coherence with MtSYMREM1 being a soluble protein (Fig. 3B). The slight band shift that was observed comparing soluble and microsomal fractions at 4 and 10 dpi suggests a secondary modification of a so far unknown nature. Phase partitioning of the microsomal fraction confirmed that MtSYMREM1 is almost exclusively present in the PM (Fig. 3C). In a second approach, we isolated detergent-insoluble PM fractions (lipid rafts) from hyper-nodulated roots (using the *M. truncatula sunn2-sickle* double mutant) and found that the MtSYMREM1 protein was highly enriched in this fraction (Fig. 3D). This indicates that group 2 remorins are specific marker proteins for lipid rafts and also highlights the potential role of membrane subcompartments during symbiotic plant-microbe interactions. The importance of these putative microdomains has also been suggested during host-pathogen interactions (24, 25).

We then used in situ immunofluorescence to spatially localize the endogenous MtSYMREM1 protein in nodules. Highly distinct fluorescence signals were detected along the PM of ITs in zone II (Fig. 3E) and around the symbiosome membrane (zone III) of 10-day-old nodules (Fig. 3F). The protein strongly accumulated in distinct spots in proximal parts of zone II that we identified as infection droplets, where bacteria are released from the ITs into the host cytoplasm (Fig. 3E). Almost no labeling was found in the nodule periphery and the meristematic zone (Fig. S4). Immunogold labeling and transmission electron microscopy on high-pressure frozen and cryosubstituted sections of 10-day-old nodules confirmed the presence of MtSYMREM1 in the PM of nodular ITs (Fig. 3G and H) and on symbiosome membranes (Fig. 3I). Gold particles were predominantly found in distinct patches, indicating accumulation of the protein in defined sites within or near the PM (Fig. 3H), possibly reflecting enrichment of the protein in lipid rafts.

These data indicate a distinct and spatial localization of the protein in close physical proximity to invading rhizobia, and thus at the plant-microbe signaling interface.

The accumulation and extension into the cytoplasm of gold particles during immunolocalization experiments suggests oligomerization of MtSYMREM1 (Fig. 3H). This would be in agreement with in vitro cross-linking experiments that show filament formation by group I remorins from potato and tomato (17). We thus used bimolecular-fluorescence complementation (BiFC) to test oligomerization of MtSYMREM1 in planta. Split-YFP proteins (YFP_N/YFP_C) were fused individually to the N terminus of MtSYMREM1, and both fusion proteins were coexpressed in *N. benthamiana* leaves. Clear BiFC signals were found at 2 dpi with *A. tumefaciens* in the PM of leaf epidermal cells showing homooligomerization of MtSYMREM1 proteins (Fig. 4A).

Despite MtSYMREM1 not sharing sequence similarities with proteins outside the remorin family, its structural and spatial features suggest interesting analogies with animal caveolin proteins. Caveolins are small, oligomeric, soluble scaffolding pro-

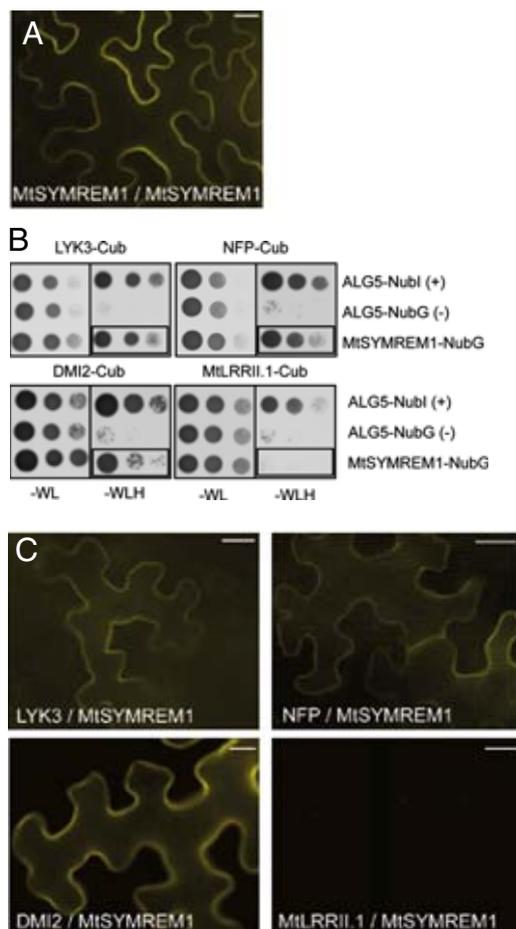


Fig. 4. MtSYMREM1 oligomerizes and interacts with symbiotic receptors at the PM. BiFC experiments were performed in *N. benthamiana* leaves by coexpression of proteins fused to the C- or N-terminal halves of YFP (YFP_C or YFP_N) (A and C). (A) MtSYMREM1 forms homooligomers. (B) The split-ubiquitin system (Cub-NubG) was used to study interactions in a yeast two-hybrid assay. Yeast expressing all indicated pairs of proteins grow on selective medium for transformation (–WL), but only those containing interacting pairs grew on –WLH supplemented with 5 mM 3AT. MtSYMREM1 interacts with LYK3, NFP, and DMI2 but not with MtLRR1.1 (rectangles). (Top Lane) All RLKs are expressed and can interact with the positive control, the yeast membrane protein ALG5 fused to Nubl, whereas no interaction was detected with the negative control ALG5-NubG (Middle Lane). (C) MtSYMREM1 specifically interacts with the symbiotic RLKs (NFP, LYK3, and DMI2) but not with MtLRR1.1 in BiFC assays. Images were taken 2 dpi. [Scale bars, 20 μ m.]

Quantitative Real-Time PCR. Total RNA was extracted using a commercial kit (Promega) following the supplier's instructions. An additional DNase treatment was performed on all samples using RNase free DNase Turbo (Ambion). Integrity of the samples was verified using Bioanalyzer analysis (Applied Biosystems). Synthesis of cDNA and qRT PCR were performed as described in ref. 31. All data were normalized to cDNA levels of the housekeeping gene *PDF2* encoding a serine/threonine protein phosphatase 2A (PP2A; homolog of *Arabidopsis thaliana* At1g13320; described in ref. 32; *PDF2*_f: 5'-GTGTTTTGCTTCCGCGT-3'; *PDF2*_r: 5'-CCAAATCTTGCTCCCTCATCTG-3'). *MtSYMREM1* was amplified using the following primers: *MtSYMREM1*_f: 5'-ACAAGAGCGTGTCTGAGTG-3'; *MtSYMREM1*_r: 5'-TCGGTCAACTGAGT-CCTTTGT-3'. Primers used for amplification of other remorin genes from *M. truncatula* can be found in Fig. S1B.

Vectors and Constructs. *MtSYMREM1* (BG580614), *MtLRR1.1* (EU849167), *LYK3*, *NFP*, and *DMI2* were cloned in pENTR vector (Invitrogen). Expression vectors were available or constructed in-house (33). For C-terminal translational fusions, vectors were generated by ligating the Gateway cassette Frame B (Invitrogen) between the 35S promoter sequence and YFP, YFP_N, or YFP_C.

N-terminal translational fusions, vectors were generated by ligating the Gateway cassette Frame A (Invitrogen) between the YFP_N or YFP_C coding sequences and the 35S terminator. The expression vectors were generated from recombination of the corresponding pENTR constructs with the different pAM-PAT-35S destination vectors. For RNAi, a 231-bp fragment of the 3' region of *MtSYMREM1* (bp 1–231 from the ATG) was cloned into the pPEX-RNAi vector (29). The control vector consisted of the empty pPEX-RNAi.

Yeast Two-Hybrid Experiments. Plasmids coding for ALG5NubG and ALG5Nubl, cloning vectors, and transformation protocols were provided by Dualsystems Biotech (DUALmembrane kit 2). The coding sequences of *MtLRR1.1*, *LYK3*, *NFP*, and *DMI2* were cloned in the pCCW-SUC bait plasmids (*LEU2*), leading to addition of Cub-lexAVP16 to the C terminus of the proteins. Their respective signal peptides (predicted by Psort) were replaced by the yeast SUC2 signal peptide. *MtSYMREM1* coding sequence was cloned in the pDSL prey plasmid (*TRP1*) leading to addition of NubG to the N terminus of the protein. The NMY32 yeast strain [leu2, trp1, his3, LexAVP16₄-*HIS3*] was first transformed with the bait vectors and a single colony was subsequently transformed with the different prey vectors. A minimum of 50 double-transformed colonies were mixed and tested for interaction on SD-WLH medium supplemented with 5 mM 3AT.

Antibodies, Protein Extraction, and Western Blotting. Polyclonal antibodies were raised against two peptides (SYFLEEKEPGNEGTS and AAGTDT-KDSVDRDAV) located in the N-terminal region of the MtSYMREM1 protein (Eurogentec). Antibodies were subsequently purified against these peptides and used in a 1:1000 dilution for western blotting. Microsomal, PM, and detergent-insoluble membrane fractions were prepared as previously described in ref. 22. After centrifugation of the microsomal fraction, the supernatant was precipitated with 10% TCA. All fractions were resuspended in the same volume, and equal volumes were loaded onto a 10% SDS/PAGE. For protein detection in *M. truncatula* root/nodules, 200 mg fresh weight of tissue was used and one quarter of the volume of solubilized proteins was separated on SDS/PAGE. Proteins were visualized by using HRP-coupled secondary anti-rabbit antibodies (Santa Cruz Biotechnology) together with Immobilon staining solutions (Millipore).

Histological Analysis and Microscopy. Fluorescence images were acquired using a Leica SP2-SE confocal microscope or a Zeiss Axiophot2 microscope equipped with a Micromax-1300Y-H5 controlled by MetaVue (Roper Scientific) with the appropriate excitation and emission wavelength windows for CFP, YFP, DAPI, and Alexa488. Observations of bright-field microscopic images were done with a Zeiss Axioplan2 and a Leica DMI 6000B. For immunofluorescence, root segments were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) with 0.05% Triton X-100 for 2 h at room temperature. After rinsing, the specimens were embedded in low-melting-point wax (34) and cut into 10- μ m-thick sections that were deposited on poly-L-lysine-coated slides and dewaxed before the immunolocalization procedure. For electron microscopy, samples were placed in a flat specimen carrier, 400 μ m in depth, filled with sucrose phosphate buffer. The carrier was quickly transferred to the Leica EM PACT high-pressure freezer (Leica Microsystems) and immediately frozen at 2,000 bars. Samples in carriers were stored in liquid nitrogen until transfer to the Leica AFS (automatic freeze substitution) in freeze substitution medium (0.25% uranyl acetate in anhydrous acetone) previously cooled at –90°C, gradually freeze substituted at –90°C for 36 h, –60°C for 8 h, and –30°C for 14 h before being transferred to –20°C. Here the F5 medium was replaced by rectapure acetone (two rinses of 10 min each). Samples were pulled off the carriers and individually placed in plastic capsules filled with acetone. Acetone was progressively replaced by London Resin (LR) gold resin during an embedding step of 48 h before plastic capsules were finally transferred into galantine capsules filled with LR gold. Polymerization was carried out under UV light at –20°C for 48 h and then at +20°C for 36 h. Ultrathin (70–80 nm) sections were prepared with a Reichert Ultracut microtome and collected on nickel carbon-coated grids and processed for electron microscopy immunolabeling. Remorin immunolocalization was performed on sections by treating with a polyclonal anti-remorin antibody 1/250 in PBS buffer with 0.2% glycine and 0.2% gelatin (pH 7.4) (PBSGG) overnight at 4°C. Sections were rinsed three times with PBSGG buffer and incubated with goat anti-rabbit Alexa488 (Molecular Probes) secondary antibodies (1/250 in PBSGG) for 2 h at room temperature. After staining, autofluorescence was quenched using Evans blue (Sigma; 0.5% in PBS, 5 min at room temperature), and the sections were mounted in Mowiol 4-88 (Calbiochem) containing 1,4-diazabicyclo-(2.2.2) octane (Sigma) as antifading agent and 4,6-diamino-2-phenylindole (Sigma) as nuclear stain. The same labeling protocol was used for electron microscopy on ultrathin sections with secondary goat anti rabbit antibodies labelled with 15 nm gold grains. (1/20 in PBSGG) for 2 h at room temperature. Observations were done on a JEOL 120 kV electron microscope.

Structural and ultrastructural studies on nodules were done from material fixed with 2% glutaraldehyde and embedded in Technovit 7100 (Kulzer) for light microscopy and Epon for electron microscopy.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank the team of Jean-Pierre Carde (Institut scientifique de Recherche Agronomique, Bordeaux, France) for performing the high-pressure freezing and cryosubstitution experiments. Seeds from the hypernodulating *sunn2-sickle* double mutant were gifts from Etienne-Pascal Journet (Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes (LIPM), Toulouse, France). Purified NFs were provided by Fabienne Maillet and Jean Dénarié (LIPM, Toulouse, France). We also thank Tatiana Vernié (LIPM, Toulouse, France) for providing several cDNAs, as well as José Garcia, Sylvie

Camut, and Céline Remblière (LIPM, Toulouse, France) and Karl-Heinz Braun (Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany) for excellent technical help. qRT-PCR experiments were performed with support of the Plate-forme Génomique (Toulouse, France). This project was funded by a Marie-Curie Intra-European Fellowship (contract 024587 "Nodule Remorin"; T.O.), by the French Agence National de la Recherche (contract ANR-05-BLAN-0243-01 "NodBindsLysM"; B.L. and J.C.), the European Community's Sixth Framework Programme through a Marie Curie Research Training Network (contract MRTN-CT-2006-035546 "NODPERCEPTION"; B.L. and J.C.), the German Academic exchange service (DAAD; K.T.), and the German Research Council (DFG; OT 423/1-1; T.O. and J.B.-S.).

- Arrighi JF, et al. (2006) The *Medicago truncatula* lysine motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant Physiol* 142: 265–279.
- Endre G, et al. (2002) A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417:962–966.
- Limpens E, et al. (2003) LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* 302:630–633.
- Madsen EB, et al. (2003) A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* 425:637–640.
- Radutoiu S, et al. (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425:585–592.
- Stracke S, et al. (2002) A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417:959–962.
- Smit P, et al. (2007) *Medicago* LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. *Plant Physiol* 145:183–191.
- Limpens E, et al. (2005) Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:10375–10380.
- Mongrand S, et al. (2004) Lipid rafts in higher plant cells: Purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J Biol Chem* 279:36277–36286.
- Raffaële S, Mongrand S, Gamas P, Niebel A, Ott T (2007) Genome-wide annotation of remorins, a plant-specific protein family: Evolutionary and functional perspectives. *Plant Physiol* 145:593–600.
- Campo S, Manrique S, García-Martínez J, San Segundo B (2008) Production of cecropin A in transgenic rice plants has an impact on host gene expression. *Plant Biotechnol J* 6:585–608.
- Coaker GL, Willard B, Kinter M, Stockinger EJ, Francis DM (2004) Proteomic analysis of resistance mediated by Rcm 2.0 and Rcm 5.1, two loci controlling resistance to bacterial canker of tomato. *Mol Plant Microbe Interact* 17:1019–1028.
- Rocco M, et al. (2008) The expression of tomato prosystemin gene in tobacco plants highly affects host proteomic repertoire. *J Proteomics* 71:176–185.
- Widjaja I, et al. (2009) Combining subproteome enrichment and Rubisco depletion enables identification of low abundance proteins differentially regulated during plant defense. *Proteomics* 9:138–147.
- Farmer EE, Pearce G, Ryan CA (1989) In vitro phosphorylation of plant plasma membrane proteins in response to the proteinase inhibitor inducing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:1539–1542.
- Reymond P, et al. (1996) Cloning of a cDNA encoding a plasma membrane-associated, uronide binding phosphoprotein with physical properties similar to viral movement proteins. *Plant Cell* 8:2265–2276.
- Bariola PA, et al. (2004) Remorins form a novel family of coiled coil-forming oligomeric and filamentous proteins associated with apical, vascular and embryonic tissues in plants. *Plant Mol Biol* 55:579–594.
- Raffaële S, et al. (2009) Remorin, a Solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. *Plant Cell* 21:1541–1555.
- Colebatch G, et al. (2004) Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*. *Plant J* 39: 487–512.
- El Yahyaoui F, et al. (2004) Expression profiling in *Medicago truncatula* identifies more than 750 genes differentially expressed during nodulation, including many potential regulators of the symbiotic program. *Plant Physiol* 136:3159–3176.
- Combier JP, et al. (2008) Evidence for the involvement in nodulation of the two small putative regulatory peptide-encoding genes MtrALFL1 and MtrDVL1. *Mol Plant Microbe Interact* 21:1118–1127.
- Lefebvre B, et al. (2007) Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: A proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *Plant Physiol* 144:402–418.
- Rajendran L, Simons K (2005) Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* 118: 1099–1102.
- Bhat RA, Miklis M, Schmelzer E, Schulze-Lefert P, Panstruga R (2005) Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:3135–3140.
- Zaas DW, et al. (2009) Counteracting signaling activities in lipid rafts associated with the invasion of lung epithelial cells by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 284: 9955–9964.
- Kabayama K, et al. (2007) Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 13678–13683.
- Liu P, Rudick M, Anderson RG (2002) Multiple functions of caveolin-1. *J Biol Chem* 277: 41295–41298.
- Chabaud M, de Carvalho-Niebel F, Barker DG (2003) Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. *Plant Cell Rep* 22:46–51.
- Combier JP, et al. (2006) MTHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes Dev* 20:3084–3088.
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* 33:949–956.
- Czechowski T, Bari RP, Stitt M, Scheible WR, Udvardi MK (2004) Real-time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: Unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *Plant J* 38:366–379.
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 139:5–17.
- Bernoux M, et al. (2008) RD19, an *Arabidopsis* cysteine protease required for RRS1-R-mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the *Ralstonia solanacearum* PopP2 effector. *Plant Cell* 20:2252–2264.
- Vitha S, Baluska F, Mews M, Volkmann D (1997) Immunofluorescence detection of F-actin on low melting point wax sections from plant tissues. *J Histochem Cytochem* 45: 89–95.

Supporting Information

Lefebvre et al. 10.1073/pnas.0913320107

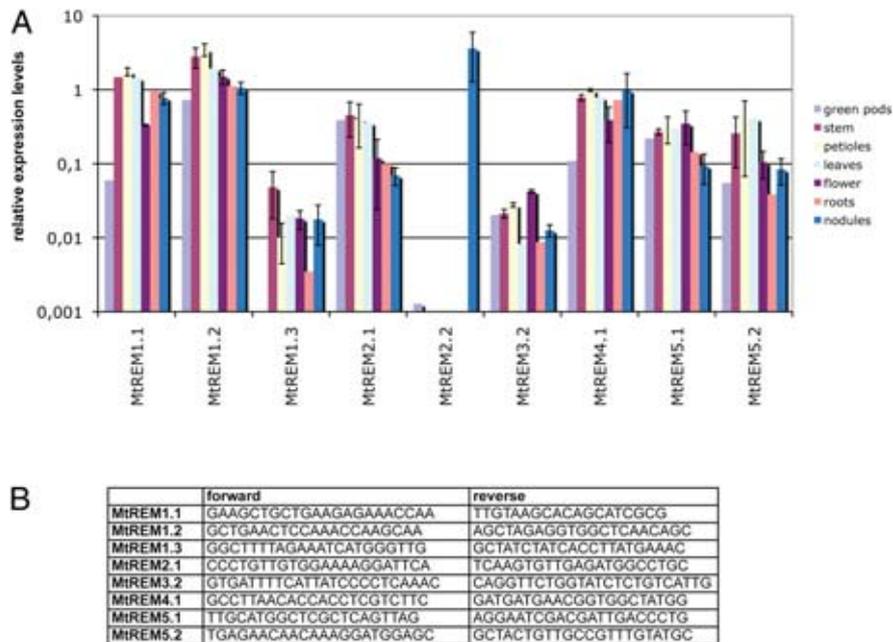


Fig. S1. qRT-PCR analysis of gene expression of all known remorins in different plant organs of *M. truncatula*. (A) *MtREM2.2* (*MtSYMREM1*) shows a distinct expression pattern, with an exclusive expression in nodules. Error bars indicate the SD obtained from three independent biological replicates. (B) The listed primers were used for expression analysis of different remorin genes. Nomenclature was used according to ref. 1.

1. Raffaele S, Mongrand S, Gamas P, Niebel A, Ott T (2007) Genome-wide annotation of remorins, a plant-specific protein family: Evolutionary and functional perspectives. *Plant Physiol* 145:593–600.

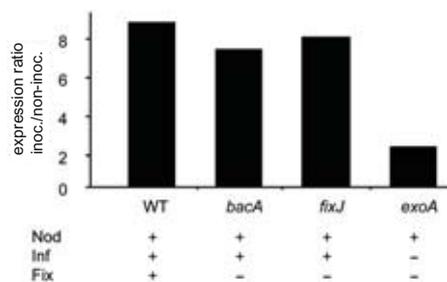


Fig. S2. *MtSYMREM1* is differentially expressed upon inoculation of roots with different *S. meliloti* strains. Induction patterns at 10 dpi depend on the infection phenotype of the symbiont. Phenotypes of these mutants are listed in the panel below: Nod, nodulation; Inf, infection; Fix, nitrogen fixation. Data were derived from microarray experiments.

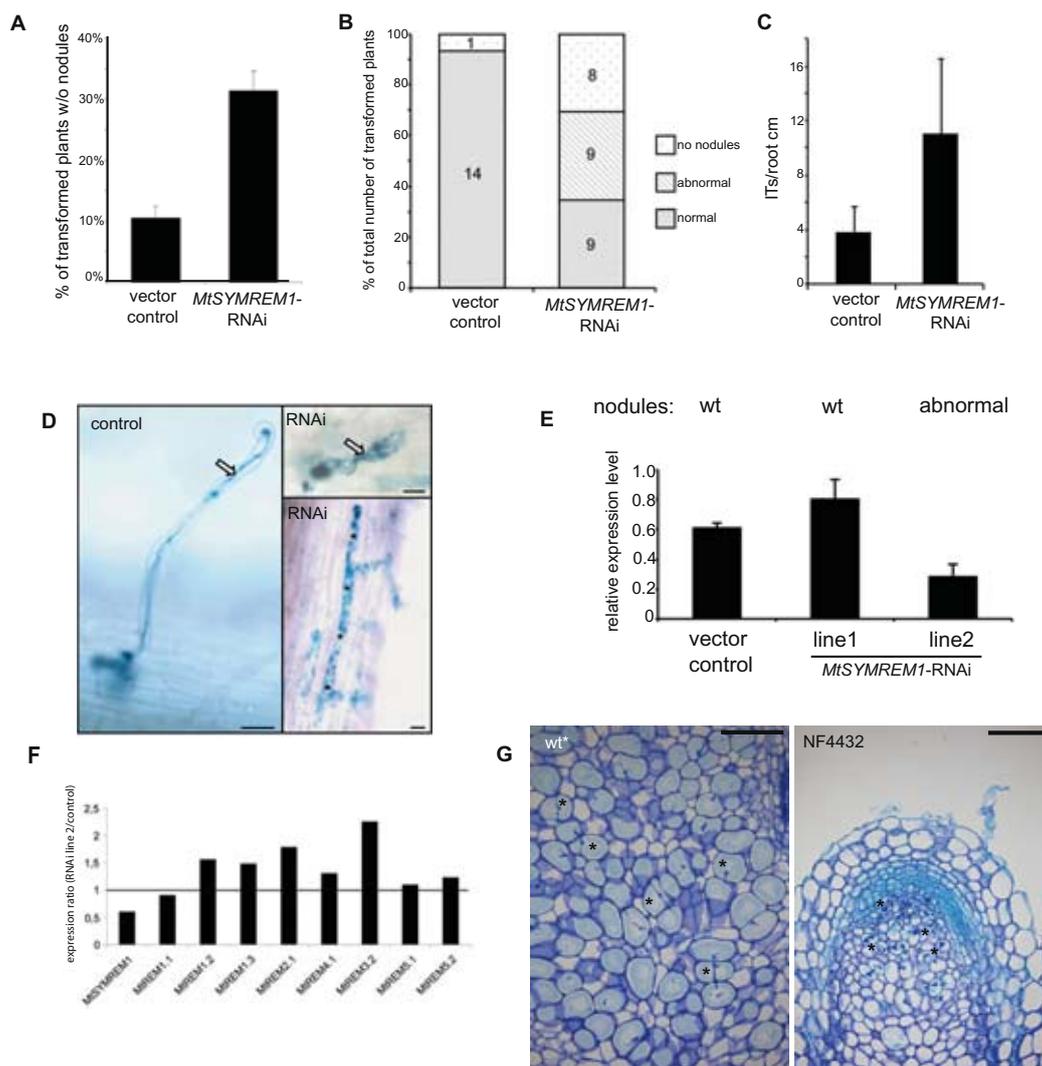


Fig. 53. Analysis of MtSYMREM1-RNAi and transposon insertion lines. (A) Significantly more transgenic roots, obtained by *A. rhizogenes* transformation, were impaired in nodulation at 2 weeks postinoculation (wpi) when being transformed with the MtSYMREM1-RNAi construct (χ^2 test: P value = 2.5×10^{-5}); $n = 134$ per genotype. Three independent experiments were performed, and standard deviation represents the variability between the experiments. (B) The majority of MtSYMREM1-RNAi roots developed no or abnormal nodules on plants grown in pouches for 6 wpi after transformation with *A. rhizogenes*. The total number of plants is indicated within the histogram bars. (C) Increased numbers of ITs were found upon knockdown of MtSYMREM1; $n = 5$ per genotype. (D) Normal IT in root hairs from control roots carrying the empty vector and sac-like structures, and highly branched IT on MtSYMREM1-RNAi roots. Uncontrolled rhizobial release into epidermal cells (stars) was occasionally observed in MtSYMREM1-RNAi roots (Lower Right). Arrows mark ITs. (Scale bars, 20 μ m.) Rhizobia carrying a lacZ reporter gene are stained in blue. (E) In plants transformed by *A. tumefaciens* with empty vector or MtSYMREM1-RNAi construct, transcript levels of MtSYMREM1 were reduced in RNAi line 2 compared to RNAi line 1 and empty vector control plants. Error bars indicate the SD obtained from three independent biological replicates. (F) Expression levels of all remorin genes that were analyzed before (Fig. 51) were tested in nodules of MtSYMREM1-RNAi line 2 and control plants. As indicated, transcript levels are reduced by about 50% for MtSYMREM1, whereas the other genes were not silenced in these plants. (G) Microtome sections of 3-wpi nodules of insertion line NF4432 and wild-type (wt*) plants were analyzed. Infection threads (*) were enlarged and highly branched in the mutant line compared with wild-type nodules. (Scale bars, 30 μ m.)

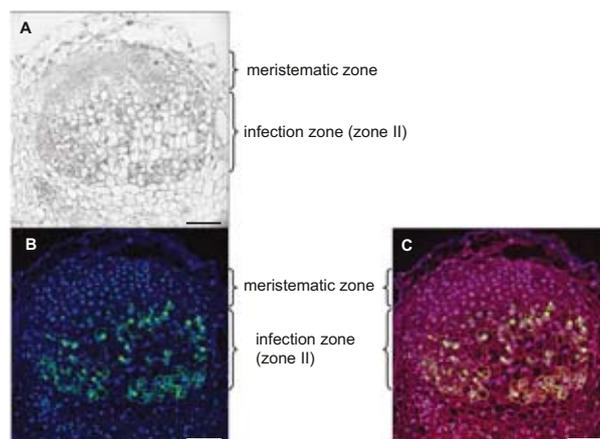


Fig. 54. Immunolocalization of MtSYMREM1 in a 10-day-old nodule. (A) Bright-field image of a 10-day-old nodule and indication of the meristematic and infection zones. (B) Immunolocalization of MtSYMREM1 using specific MtSYMREM1 antibodies. Plant and rhizobial DNA were stained with DAPI (blue) and secondary antibodies were coupled to Alexa488. (C) Evans blue was used to visualize plasma membranes. (Scale bars, 100 μm .)

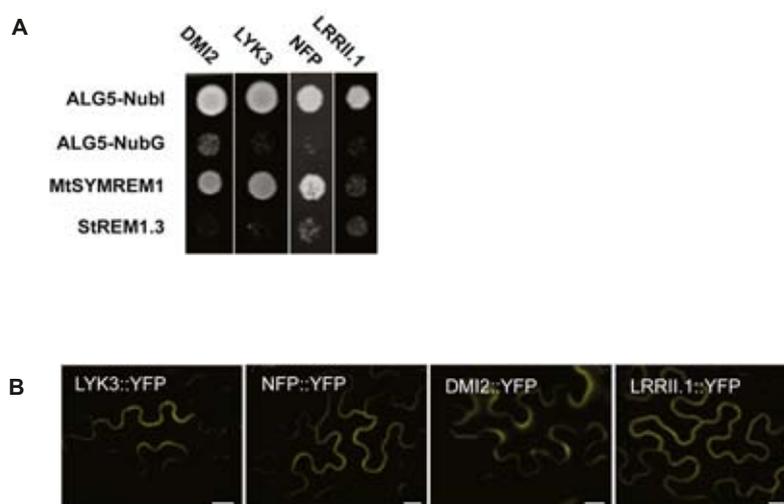


Fig. 55. LYK3, NFP, and DMI2 fusion proteins localized to the plasma membrane interact with MtSYMREM1 but not with StREM1.3. (A) The split-ubiquitin system (Cub-NubG) was used to study interactions in a yeast two-hybrid assay. Yeast expressing interacting pairs was able to grow on $-WLH$ supplemented with 5 mM 3AT. MtSYMREM1 interacts with LYK3, NFP, and DMI2 but not with MtLRR11.1. All receptor-like kinases are expressed and can interact with the positive control, the yeast membrane protein ALG5 fused to NubI, whereas no interaction was detected with the negative controls ALG5-NubG and StREM1.3. (B) The indicated constructs were expressed in *N. benthamiana*, and YFP fluorescence was imaged by confocal laser-scanning microscopy. (Scale bars, 20 μm .)

CHAPITRE III

Article

MtPUB1, une E3 ubiquitine ligase interagit avec le récepteur symbiotique LYK3 et régule négativement l'infection et la nodulation chez *Medicago truncatula*.

-

«The *Medicago truncatula* E3 ubiquitin ligase, MtPUB1, interacts with the LYK3 symbiotic receptor and negatively regulates infection and nodulation»

-

The Plant Cell, 2010

Résumé de l'article

Les plantes de la famille des légumineuses ont la particularité de pouvoir établir une symbiose fixatrice d'azote avec les bactéries de type rhizobia. Cette symbiose se traduit par la formation d'un nouvel organe sur les racines au sein duquel la bactérie va pouvoir fixer l'azote atmosphérique en échange de composés carbonés issus de la photosynthèse. Des études génétiques chez les bactéries et les légumineuses modèles *M. truncatula* et *L. japonicus* ont mis en évidence l'importance de la voie de signalisation des facteurs Nod (NFs), des molécules de nature lipochito-oligo-saccharidiques (LCOs) produites par les bactéries. Chez *M. truncatula*, de nombreux gènes essentiels à l'établissement de la symbiose fixatrice d'azote ont été identifiés lors de cribles génétiques recherchant des plantes incapables de former des nodules en présence de *Sinorhizobium meliloti*. Parmi ces gènes, *NFP* et *LYK3* codent tous deux pour des récepteurs putatif des NFs de la famille des lysin-motif-RLKs. Contrairement à leurs homologues probables chez l'autre légumineuse modèle *L. japonicus*, *NFR5* et *NFR1* respectivement, où la présence des deux gènes est nécessaire aux premières réponses suite à l'application de NFs, *LYK3* n'est pas requis pour les premières réponses chez *M. truncatula*. Des études complémentaires sur *LYK3* par ARN interférent ont montré que *LYK3* participe au contrôle de l'infection d'une manière dépendante de la structure des NFs. Il a donc été proposé un modèle de voie de signalisation où *NFP* jouerait un rôle de perception des NFs alors que *LYK3* jouerait le rôle d'un récepteur d'entrée discriminant les bactéries symbiotiques en fonction de la nature des NFs produits.

Afin de déterminer comment *LYK3* joue son rôle dans l'établissement de cette symbiose, nous avons utilisé une stratégie basée sur la recherche de partenaires protéiques de *LYK3* en système double hybride de levure GAL4. Une banque d'ADNc de poils racinaires de *M. truncatula* préalablement élicités par application de NFs a été criblée avec le domaine intracellulaire de *LYK3* (*LYK3-IR*). Ce crible a mené à l'identification d'une protéine de la famille des U-Box et nommée MtPUB1 pour *M. truncatula* Plant U-Box 1. MtPUB1 est constituée en N-terminal d'un domaine de fonction inconnue (UND pour U-Box N-terminal Domain), d'un domaine U-Box en son milieu, et de 5 répétitions du domaine ARMADILLO (ARMr) en C-terminal. Il a été trouvé sept autres protéines possédant la même organisation que MtPUB1 chez *M. truncatula*. Une analyse phylogénétique comprenant MtPUB1 et ses sept homologues et incluant les 17 protéines homologues d'*A. thaliana* a permis de définir un orthologue putatif dans cette espèce pour certains PUBs de *M. truncatula* à l'exception de MtPUB1. En revanche, après analyse élargie à d'autres organismes modèles, il a pu être montré que MtPUB1 fait partie d'un

sous groupe de PUBs contenant trois membres issus exclusivement de légumineuses avec deux chez le lotier (*L. japonicus*) et un membre chez le soja (*Glycine max*).

Le domaine ARMr est nécessaire et suffisant pour l'interaction avec LYK3-IR dans la levure comme montré par la cartographie des domaines d'interaction de MtPUB1. Aucune interaction n'a été détectée avec les domaines intracellulaires des RLKs non symbiotiques, BRI1 d'*A. thaliana* et LRR1.1 de *M. truncatula*. L'utilisation de *N. benthamiana* comme système d'expression transitoire a permis de confirmer cette interaction avec les formes entières de MtPUB1 et LYK3 par BiFC. La localisation subcellulaire de MtPUB1 a été déterminée par fractionnement. MtPUB1 est associée à la membrane plasmique chez *N. benthamiana* et associée aux membranes dans les racines de *M. truncatula*. En utilisant des protéines purifiées à partir de *E. coli*, il a été montré que MtPUB1 possède une activité E3 ubiquitin ligase et que MtPUB1 est phosphorylée par le domaine intracellulaire de LYK3.

Pour aider à déterminer le rôle de MtPUB1 dans la symbiose, son expression a été étudiée par qRT-PCR et une fusion promoteur::GUS. L'application de NFs purifiés est suffisante pour induire une expression transitoire entre 6 et 24 heures après traitement du gène MtPUB1 chez la plante sauvage comme montré par qRT-PCR. Cette induction est perdue chez les mutants de la voie de signalisation NFs *nfp*, *dmi2* et *dmi3* alors qu'elle est maintenue à un niveau comparable à celui observé chez la plante sauvage chez les mutants *lyk3* et *nin*. Son profil d'expression tissulaire a été déterminé en utilisant une région promotrice de *MtPUB1* de 3kb clonée en amont du gène rapporteur GUS. Il est apparu que *MtPUB1* est exprimé faiblement dans la racine avant inoculation et que cette expression est induite au site d'infection après inoculation. La fusion promoteur::GUS est, par la suite, exprimée dans la partie apicale du nodule mature.

Aucun mutant nul pour le gène *MtPUB1* n'a pu être trouvé dans les différentes banques de mutants de *M. truncatula* disponibles à ce jour. Cependant, son rôle dans la symbiose a pu être déterminé par la surexpression d'une version 3HA-MtPUB1 et par stratégie d'ARN interférent grâce au système de transformation par *Agrobacterium rhizogenes*. Il a été montré que la surexpression de MtPUB1 induit un délai dans la nodulation de telle manière qu'à 7 jours après inoculation l'efficacité de nodulation n'est que de 60% par rapport aux plantes contrôles. Ce phénotype a ensuite été confirmé par ARN interférent. En effet, la sous-régulation du transcrite de *MtPUB1* présente un phénotype inverse. Si les plantes ARN interférent ne présentent aucun phénotype après inoculation avec la souche sauvage de *S. meliloti*, elles forment significativement plus de nodules lorsque des mutants bactériens *nodL* ou *nodFnodL* produisant des NFs modifiés sont utilisés. Afin de lier les rôles des gènes *MtPUB1* et *LYK3*, nous avons utilisé le mutant faible *lyk3-4*. Ce mutant ne présente qu'environ 8% des transcrits pour le gène *LYK3* et il est très

faiblement nodulé par le symbionte sauvage. Lorsque *MtPUB1* est dérégulé par ARN interférent dans ce fond génétique, la nodulation est partiellement complétée avec 13 fois plus de nodules formés que sur les mutant transformés avec un vecteur contrôle. Une augmentation du nombre d'infections est aussi observée. Ce dernier résultat lie génétiquement les deux gènes dans la voie de signalisation NFs dépendante de LYK3. Ensemble, ces données phénotypiques indiquent que *MtPUB1* jouent un rôle négatif dans l'établissement de la symbiose fixatrice d'azote.

The *Medicago truncatula* E3 Ubiquitin Ligase PUB1 Interacts with the LYK3 Symbiotic Receptor and Negatively Regulates Infection and Nodulation ^{W|O}

Malick Mbengue, Sylvie Camut, Fernanda de Carvalho-Niebel, Laurent Deslandes, Solène Froidure, Dörte Klaus-Heisen, Sandra Moreau, Susana Rivas, Ton Timmers, Christine Hervé,¹ Julie Cullimore,^{1,2} and Benoit Lefebvre¹

Laboratoire des Interactions Plantes Micro-Organismes, Unité Mixte de Recherche 2594/441, Centre National de la Recherche Scientifique/Institut National de la Recherche Agronomique, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

LYK3 is a lysin motif receptor-like kinase of *Medicago truncatula*, which is essential for the establishment of the nitrogen-fixing, root nodule symbiosis with *Sinorhizobium meliloti*. LYK3 is a putative receptor of *S. meliloti* Nod factor signals, but little is known of how it is regulated and how it transduces these symbiotic signals. In a screen for LYK3-interacting proteins, we identified *M. truncatula* Plant U-box protein 1 (PUB1) as an interactor of the kinase domain. In planta, both proteins are localized and interact in the plasma membrane. In *M. truncatula*, PUB1 is expressed specifically in symbiotic conditions, is induced by Nod factors, and shows an overlapping expression pattern with LYK3 during nodulation. Biochemical studies show that PUB1 has a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase activity and is phosphorylated by the LYK3 kinase domain. Overexpression and RNA interference studies in *M. truncatula* show that PUB1 is a negative regulator of the LYK3 signaling pathway leading to infection and nodulation and is important for the discrimination of rhizobia strains producing variant Nod factors. The potential role of PUB E3 ubiquitin ligases in controlling plant-microbe interactions and development through interacting with receptor-like kinases is discussed.

INTRODUCTION

The ability of legumes to form a symbiosis with nitrogen-fixing bacteria termed rhizobia is of immense agronomic and ecological importance (Graham and Vance, 2003). The symbiosis is manifested by the production of nodules on the roots of the plant in which the bacteria fix nitrogen in exchange for plant carbohydrate and a safe niche. Genetic studies on both the bacterium and the plant have identified Nod factor signaling as an essential step in the establishment of the symbiosis in most, but not all studied legume-rhizobia interactions (Dénarié et al., 1996; Oldroyd and Downie, 2008; Masson-Boivin et al., 2009). Nod factors (NFs) are rhizobial lipochitooligosaccharides with a chitin fragment backbone of four or five *N*-acetyl glucosamines (tetrameric or pentameric factors) in which the terminal nonreducing sugar is de-*N*-acetylated and acylated with a fatty acid. The structure of the fatty acid and the type of chemical substitutions on the chitin fragment backbone are important elements for host-microbe recognition, infection, and nodulation. For example, the NFs produced by *Sinorhizobium meliloti*, which nodulates *Medicago truncatula* and related genera, are mainly

tetrameric with a C16:2 fatty acid and a 6-*O*-acetyl substitution on the terminal nonreducing sugar and a 6-*O*-sulphuryl group on the reducing sugar (Roche et al., 1991a). The *O*-sulfate is important for all NF activities, whereas the substitutions on the terminal, nonreducing sugar are important for infection (Roche et al., 1991b; Ardourel et al., 1994).

Studies, particularly on model legumes such as *M. truncatula* and *Lotus japonicus*, have led to the identification of specific lysin motif receptor-like kinases (LysM-RLKs) as putative NF receptors (Limpens et al., 2003; Madsen et al., 2003; Radutoiu et al., 2003). In both *M. truncatula* and *L. japonicus*, two probably orthologous pairs of genes are essential for nodulation. *M. truncatula* *NFP* and *L. japonicus* *NFR5* are required for all NF responses and may play very similar roles (Radutoiu et al., 2003; Arrighi et al., 2006). However, whereas *L. japonicus* *NFR1* is also required for early NF responses (Radutoiu et al., 2003), its putative ortholog in *M. truncatula*, *LYK3*, is not required for early responses but plays an essential role in regulating root hair curling and in promoting infection thread (IT) growth and nodulation (Catoira et al., 2001; Limpens et al., 2003; Smit et al., 2007).

It is important to understand how these receptors perceive NFs and transduce the signal to downstream components. Plant genetic studies have revealed that downstream of the LysM-RLKs, NF signal transduction requires a calcium signaling pathway, called the common symbiotic or DMI (for Does not Make Infections) pathway that is also required for establishment of the symbiosis with endomycorrhizal fungi (Oldroyd and Downie, 2008). In *M. truncatula*, this pathway is defined by three genes: *DMI2* (encoding a leucine-rich repeat [LRR] RLK), *DMI1*

¹ These authors contributed equally to this work.

² Address correspondence to julie.cullimore@toulouse.inra.fr.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the instructions for Authors (www.plantcell.org) is: Julie Cullimore (julie.cullimore@toulouse.inra.fr).

^{W|O} Online version contains Web-only data.

^O Open Access articles can be viewed online without a subscription. www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.110.075861

(encoding an ion channel protein), and *DMI3* (encoding a calcium calmodulin protein kinase). Whereas *DMI1* and *DMI2* are required for calcium spiking, *DMI3* is required for transducing the calcium signal. Further downstream, specific transcription factors are required for gene activation, including expression of early nodulin genes such as *ENOD11* (Andriankaja et al., 2007; Hirsch et al., 2009). Another regulatory gene, *NIN*, is not necessary for early NF responses but is required for nodulation and infection (Marsh et al., 2007).

A key question remains on how these pathways are activated by the LysM-RLKs. In *M. truncatula*, studies on plant responses to rhizobial nodulation mutants led to the suggestion that there are two NF receptors: the signaling receptor, which has a nonstringent requirement for the structure of the nonreducing end of NFs and leads to initial NF responses, and the entry receptor, which requires NFs with precise modifications on the nonreducing end and leads to infection (Ardourel et al., 1994). This hypothesis was supported by the different phenotypes of *nfp* and *lyk3* mutants, with NFP being proposed to be a major component of the signaling receptor as it is required for all early signaling responses, including calcium spiking and gene expression (Ben Amor et al., 2003; Arrighi et al., 2006). As the *DMI* pathway is required for the majority of the signaling responses, it is proposed that this pathway is activated via NFP. Mutants in *LYK3* (initially named *HCL*) were identified due to their aberrant root hair curling and infection (Catoira et al., 2001), and later the gene was cloned through potential synteny with a gene from pea (*Pisum sativum*) that is involved in NF structure-dependent infection (Limpens et al., 2003; Smit et al., 2007). These mutants still show NF signaling responses, suggesting that *LYK3* is not involved in the early NF recognition step. As rhizobial infection in a weak *lyk3* (*hcl-4*) mutant and *LYK3*-RNA interference (RNAi) plants is dependent on the structure of the modifications on the terminal nonreducing sugar, it has been suggested that *LYK3* is a component of the entry receptor with a stringent demand toward the NF structure (Smit et al., 2007). Transcriptomics using a *lyk3* mutant (Mitra et al., 2004) have shown that *LYK3* is required for the regulation of a subset of genes that are differentially expressed in the plant after 24 h exposure to *S. meliloti*, suggesting that its activity leads to specific gene expression. To date, how *LYK3* is regulated and couples to this specific gene expression, root hair curling, infection, and nodulation is completely unknown.

Although forward genetics on model legumes has proved a powerful tool for identifying genes essential for establishment of the symbiosis, it is likely that other key players have been overlooked either due to redundancy or playing pleiotropic roles. In this work, we set out to identify such genes through the identification of protein interactors of *LYK3* using a yeast two-hybrid screen.

RESULTS

PUB1, an UND-PUB-ARM Protein, Is an Interactor of the Intracellular Region of LYK3

To identify potential interacting proteins of *LYK3*, the intracellular region of the protein (*LYK3*-IR: amino acids 257 to 620), con-

taining the juxta membrane, kinase domain, and C-tail, was used as bait to screen a GAL4-based yeast two-hybrid cDNA library prepared from the root hair cells of *M. truncatula* roots treated with NFs (Andriankaja et al., 2007). Thirty-two clones contained a coding region related to the same gene, annotated as Mt5g090510 in the *M. truncatula* genome sequencing project. From the cDNA sequences of our clones and those in the *M. truncatula* Expressed Sequence Tag (MtEST) database, it is clear that the C terminus of the protein has not been correctly deduced from the automatic gene discovery/annotation programs in the *M. truncatula* genome sequencing project; thus, our sequence has been submitted to the GenBank databases and can be found under accession number BK007068.

Using the BLAST algorithm, interrogation of the National Centre for Biotechnology Information nonredundant protein database revealed that the encoded protein is related to the Plant U-box (PUB) E3 ubiquitin ligase family (Azevedo et al., 2001; Yee and Goring, 2009). The gene was thus named *PUB1*. Domain structure analysis showed that the U-box in this protein is highly conserved and followed by a region containing at least five ARMADILLO (ARM) repeats, some of which are highly variant compared with the consensus sequence. *PUB1* also contains the large U-box N-terminal Domain (UND), present in a subset of PUB-ARM proteins (Mudgil et al., 2004), including the well-characterized *Brassica napus* protein ARC1 (Gu et al., 1998; Stone et al., 1999). An alignment to homologous plant proteins, including ARC1 (see Supplemental Figure 1 online) shows that the UND domain is poorly conserved compared with the U-box and ARM repeat domains. In summary, *PUB1* has the typical structure of an UND-PUB-ARM protein (Figure 1A).

To test the specificity of the *LYK3*-IR/*PUB1* interaction, the intracellular region of two RLKs from the LRR subfamilies was tested: the root-expressed LRR-RLK (LRR11.1) from *M. truncatula* (Lefebvre et al., 2010) and the brassinosteroid RLK (BR1) from *Arabidopsis thaliana* (Li and Chory, 1997). No interaction between these RLKs and *PUB1* could be detected (Figure 1B). Specificity was then tested against members of the two subfamilies of LysM-RLKs: *LYK2*, *LYK4*, and NFP. No interaction with *PUB1* could be detected. The shorter clones isolated from the library lacked the UND domain (*PUB1*ΔUND), indicating that this domain is not essential for interacting with *LYK3*-IR as shown by pairwise interactions in Figure 1B. Further interacting-domain mapping revealed that the region containing the ARM repeats is necessary and sufficient for the *LYK3*-IR/*PUB1* interaction in yeast (Figure 1B).

PUB1 Associates with Membranes and Interacts with LYK3 in Planta

To investigate the subcellular localization of *PUB1*, we first attempted to express yellow fluorescent protein (YFP)-tagged *PUB1* proteins in *Nicotiana benthamiana* leaves. However, the fusion proteins showed partial cleavage, thus making localization based on YFP fluorescence unreliable. The subcellular localization of *PUB1* was therefore determined by cellular fractionation using an N-terminal 3HA-tagged fusion protein (3HA-*PUB1*). The construct was expressed in *N. benthamiana* leaves and in *M. truncatula* roots by *Agrobacterium tumefaciens* and

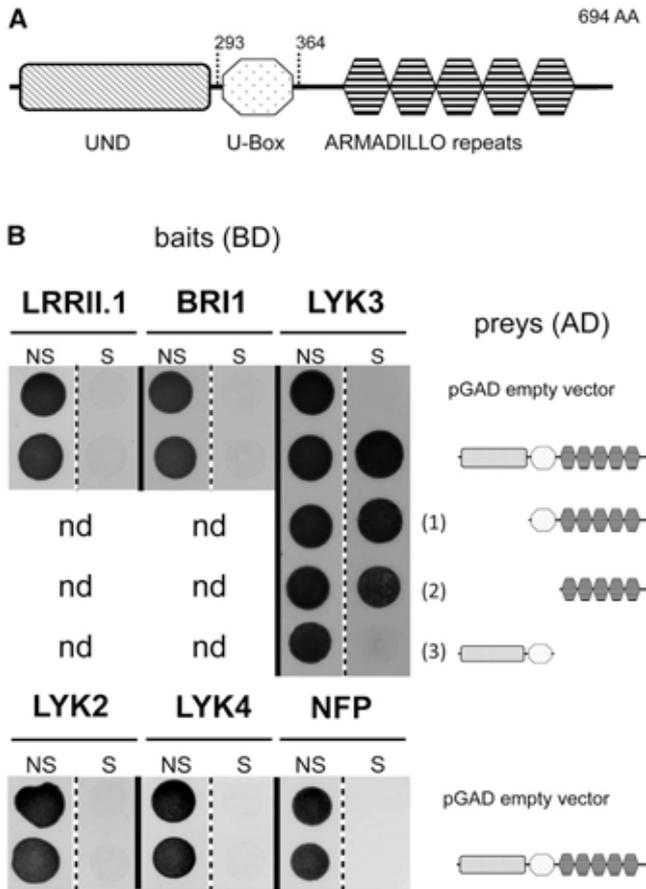


Figure 1. Characterization of PUB1 as a Protein Interactor of the LYK3 Intracellular Region.

(A) Domain organization of the PUB1 protein. The U-box domain (amino acids 293 to 364) is located between the UND domain at the N terminus and the ARMADILLO repeats near the C terminus.

(B) PUB1 interacts with LYK3 through the ARM repeats in yeast. Yeast cells expressing either LRR11.1, BRI1, LYK2, LYK4, NFP, or LYK3 intracellular regions cloned in the pBD bait vector were cotransformed with prey constructs cloned in the pGAD vector. The negative control prey consists of the pGAD vector. A full-size PUB1 prey fusion protein was tested for interaction with all bait fusion proteins. Three deletion variants, PUB1ΔUND (1), PUB1ΔUNDΔU-Box (2), and PUB1ΔARM (3), were tested for interaction with the LYK3 bait. Cotransformation of yeast cells with bait and prey vectors is reported by yeast growth on nonselective (NS) medium lacking Trp and Leu. Positive interactions are reported by yeast growth on selective (S) medium lacking Trp, Leu, and His and supplemented with 5 mM 3-amino-triazol. Yeast growth is in black. nd, not determined.

Agrobacterium rhizogenes transformation, respectively. Immunoblot analyses with an anti-HA antibody specifically detected the expressed 3HA-PUB1 fusion protein in both plant systems at the expected size of 81 kD (Figures 2A to 2C).

Soluble (S), total membrane (M), and plasma membrane (PM) fractions were prepared from leaves of *N. benthamiana* either expressing 3HA-PUB1 or transformed with a vector control. Immunoblot analysis showed strong enrichment of the H⁺ATP-

ase PM marker proteins (Maudoux et al., 2000) in the PM fraction compared with the M fraction, whereas this protein was not detected in the S fraction (Figure 2A). A similar partitioning between the three fractions for 3HA-PUB1 and the H⁺ATPase marker (Figure 2A) suggests that full-length PUB1 is associated with the PM. To investigate whether the presence of the LYK3 receptor could cause dissociation of PUB1 from the membranes, both proteins were coexpressed in *N. benthamiana* leaves. The 3HA-PUB1 expressed alone or together with a green fluorescent protein (GFP)-tagged LYK3 fusion protein was detected only in the M fraction (Figure 2B). S and M fractions were also prepared from *M. truncatula* roots expressing 3HA-PUB1. Detection of the H⁺ATPase marker exclusively in the M fraction shows that the S fraction was not contaminated with membranes (Figure 2C). PUB1 was found to be preferentially associated with membranes in *M. truncatula* roots, although a small proportion of the protein appeared to be soluble (Figure 2C). Together, the data show that PUB1 is predominantly associated with membranes, independently of the presence of LYK3.

Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) was next used to confirm the interaction between LYK3 and PUB1 in planta. This system has recently been used to demonstrate the specific interaction between LYK3 and a PM-associated protein, SYMREM1 (Lefebvre et al., 2010). YFP or its C-terminal part (Yc) was cloned as a translational fusion to the C terminus of the LYK3, LRR11.1, and BRI1 RLKs. The N-terminal part (Yn) was cloned as a translational fusion to the N terminus of PUB1. Fusion proteins were expressed in *N. benthamiana* leaves by *A. tumefaciens*-mediated transformation. All the RLKs were detected at the PM but LYK3 appeared to be relatively poorly expressed (see Supplemental Figure 2 online, left panels). However, coexpression of LYK3-Yc together with Yn-PUB1 led to a clear YFP signal at the PM of leaf epidermal cells whereas relatively weak fluorescence signals were detected when the BRI1-Yc/Yn-PUB1 or the LRR11.1-Yc/Yn-PUB1 pairs were used (Figure 2D; see Supplemental Figure 2 online). In all cases, PUB1 lacking the ARM repeats (Yn-PUB1ΔARM) gave weaker fluorescence signals than the full-length protein. Thus, although the ARM repeats are clearly important for the interaction with LYK3 in planta, it is possible that other domains also contribute. In summary, these results show that PUB1 is capable of interacting with the full-length LYK3 receptor at the PM in living plant cells.

PUB1 Is an E3 Ubiquitin Ligase and Is Phosphorylated by LYK3 in Vitro

The presence of the U-box domain suggests that PUB1 is an E3 ubiquitin ligase and thus functions in protein ubiquitination, a reaction that requires ubiquitin (Ub), an E1 (Ub-activating) protein, an E2 (Ub-conjugating) protein, and a protein substrate. Ubiquitination is a posttranslational modification specific to eukaryotes and in the past years has been recognized as a major means of protein regulation. In many cases, ubiquitination marks the protein for degradation, although in some cases, it modulates the activity or localization of the protein (Komander, 2009).

To examine whether PUB1 is a functional E3 ubiquitin ligase, we performed in vitro ubiquitination assays with PUB1 lacking

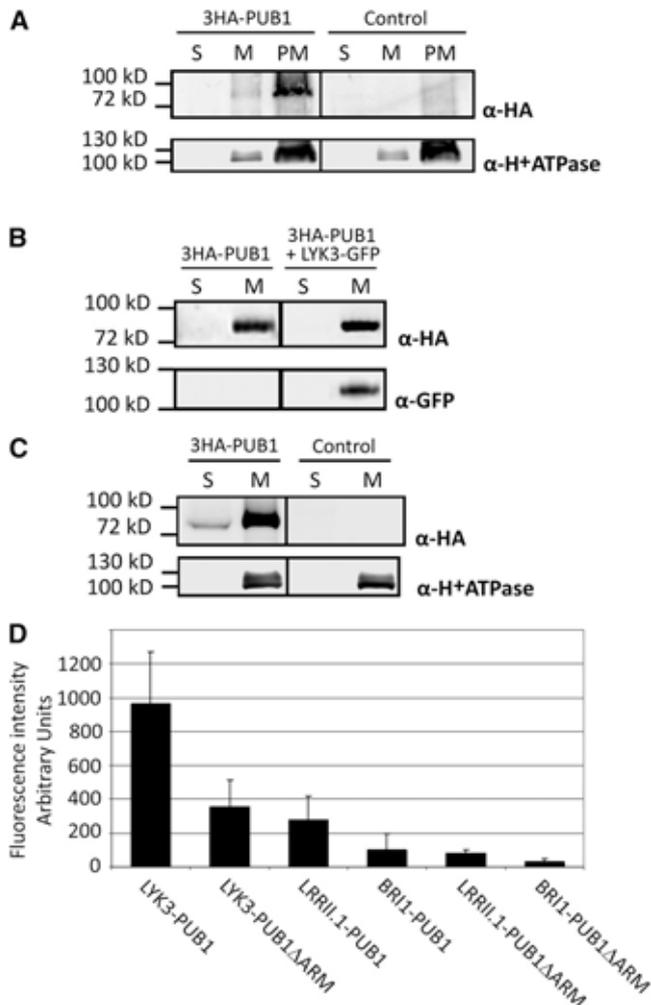


Figure 2. Subcellular Localization of PUB1 and Interaction with LYK3 in Planta.

For all biochemical experiments ([A] to [C]), plant material was fractionated into plasma membrane (PM), total membrane (M), or soluble (S) fractions. S and M fractions were concentrated and resuspended in the same volume and equal volumes were loaded. M and PM fractions contained equal protein amounts. The three fractions were used in immunoblots with indicated antibodies.

(A) 3HA-PUB1 is associated with the plasma membrane in *N. benthamiana*. *N. benthamiana* leaves were transformed with the 3HA-PUB1 construct or the vector alone (control).

(B) The membrane localization of PUB1 is not altered by coexpression with LYK3 in *N. benthamiana*. *N. benthamiana* leaves expressed 3HA-PUB1 alone or together with LYK3-GFP.

(C) 3HA-PUB1 is predominantly associated with membranes in *M. truncatula* and is also present in the soluble fraction. *M. truncatula* roots were transformed with either the 3HA-PUB1 construct or control vector expressing GFP.

(D) PUB1 interacts with LYK3 and not with BRI1 or LRR1.1 in *N. benthamiana*. BiFC experiments were performed by coexpression of the indicated split-YFP pair combinations: The C-terminal domain of YFP (Yc) was fused to the C terminus of the RLKs, whereas the N-terminal domain of YFP (Yn) was fused to the N terminus of PUB1 or a derivative lacking the ARM repeats (PUB1 Δ ARM). Leaves were imaged by epi-

fluorescence using identical exposure settings and quantified. Fluorescence intensities (arbitrary units) and standard deviations are shown.

the UND domain (PUB1 Δ UND), purified from *Escherichia coli* as a glutathione S-transferase (GST) fusion protein. In addition, a construct was made in which a highly conserved Trp residue in the U-box domain was mutated to Ala (PUB1 Δ UNDW326A), a modification that has previously been shown to abolish E3 ubiquitin ligase activity (Trujillo et al., 2008). A yeast E1 protein and the *Arabidopsis* E2 protein UBC8 were used in these assays. As expected, the E2 protein was activated by ubiquitination in the presence of the E1 and ubiquitin, independently of PUB1 Δ UND (Figure 3A, lane 3). When PUB1 Δ UND was added to the reaction, a protein ladder and a band higher than PUB1 Δ UND could be detected using anti-ubiquitin and anti-GST antibodies, respectively (Figure 3A, lane 5). Together, these results show that PUB1 Δ UND has E3 ubiquitin ligase activity and strongly suggest that the protein autoubiquitinates. The observed E3 ubiquitin ligase activity of PUB1 was dependent on the presence of Ub, E1, and E2 and was abolished by the W326A mutation in the U-box domain (Figure 3A, lane 6). Thus, PUB1 is a functional E3 ubiquitin ligase whose enzymatic activity depends on the structure of the U-box domain.

We also tested whether the LYK3 intracellular region could be a substrate for the E3 ubiquitin ligase activity of PUB1. In vitro ubiquitination assays using a maltose binding protein (MBP) fusion of PUB1 Δ UND and GST-LYK3-IR-6HIS did not succeed in detecting ubiquitinated forms of the LYK3-IR (Figure 3B) even after long exposure of the immunoblot.

A way to follow whether PUB1 ubiquitinates LYK3 in a plant system leading to its degradation is to follow LYK3 stability in the presence of PUB1. Despite many efforts (production of LYK3 specific antibodies and purifying plasma membrane), we were unable to detect LYK3 in *M. truncatula*, likely due to extremely low levels of the protein. Also, we were unable to produce stable transgenic lines of *M. truncatula* overexpressing LYK3, as expression was lost in all transgenic plants following propagation by seed. As an alternative approach, we coexpressed 3HA-PUB1 or 3HA-PUB1W326A with a LYK3-3FLAG fusion protein in *N. benthamiana* leaves. Similar levels of the LYK3 protein were detected using the active and inactive PUB1 proteins, suggesting that LYK3 is not preferentially degraded through the E3 ubiquitin ligase activity of PUB1 (Figure 3C). Therefore, we have no evidence to suggest that LYK3 is a substrate of the E3 ubiquitin ligase activity of PUB1, leading to its degradation. We then investigated whether PUB1 protein stability could be regulated by LYK3. For that purpose, PUB1 protein abundance was monitored after expression of 3HA-PUB1 with or without LYK3-3FLAG in *N. benthamiana* (Figure 3D). No difference in PUB1 protein abundance was detected in either case, suggesting that interaction with LYK3 does not lead to degradation of PUB1.

LYK3 possesses an active kinase domain as demonstrated previously by an in vitro autophosphorylation assay of a GST-LYK3-IR fusion protein (Arrighi et al., 2006). We therefore investigated whether the LYK3 kinase could *trans*-phosphorylate PUB1. PUB1 and PUB1 Δ UND were expressed as MBP fusion proteins and purified from *E. coli*. In vitro protein phosphorylation

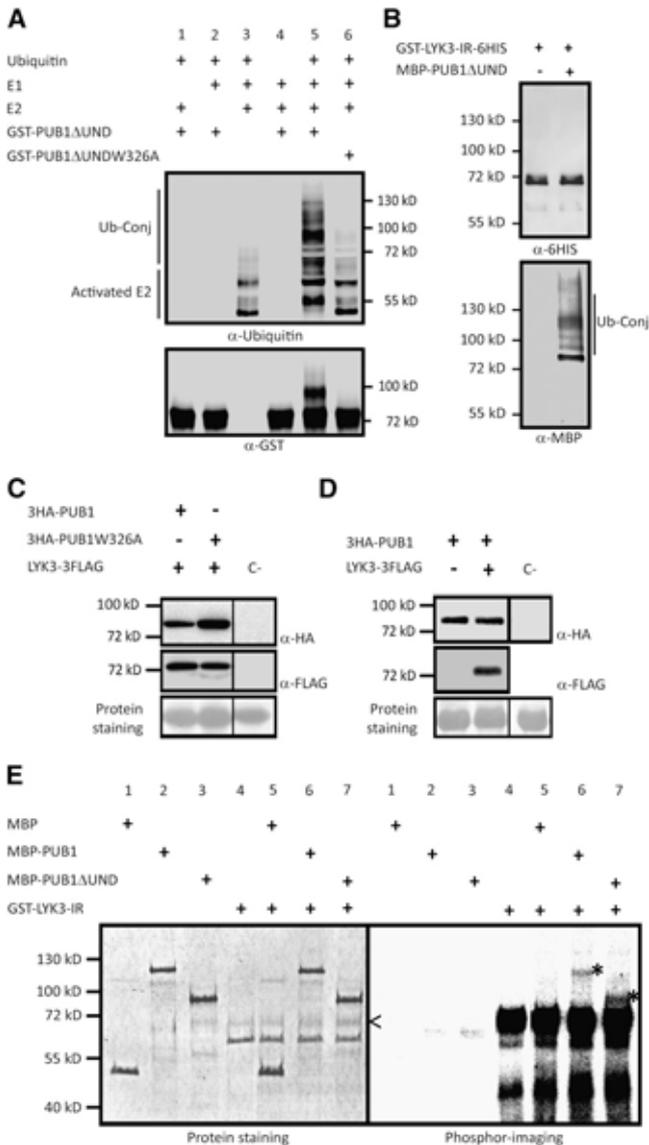


Figure 3. In Vitro E3 Ubiquitin Ligase Activity of PUB1, *Trans*-Phosphorylation of PUB1 by LYK3, and Coexpression Studies of PUB1 and LYK3 in *N. benthamiana*.

(A) PUB1 possesses an E3 ubiquitin ligase activity in vitro. GST-PUB1ΔUND was tested for E3 ubiquitin ligase activity in presence or absence of yeast E1, *Arabidopsis* E2 (UBC8), and ubiquitin. Anti-Ub and anti-GST antibodies were used to detect ubiquitinated proteins and GST-PUB1ΔUND, respectively. A range of proteins conjugated with ubiquitin (Ub-conj) were formed when GST-PUB1ΔUND was added in the mix and not with GST-PUB1ΔUND-W326A, an inactive U-box variant. **(B)** LYK3 in vitro ubiquitination assay. GST-LYK3-IR-6HIS with E1, E2, and ubiquitin was incubated in the presence or absence of MBP-PUB1ΔUND. Immunoblot analyses were performed with indicated antibodies. **(C)** PUB1 does not affect LYK3 abundance in *N. benthamiana*. 3HA-PUB1 or the inactive 3HA-PUB1W326A mutated protein was coexpressed with LYK3-3FLAG. Protein combinations were expressed in different halves of the same *N. benthamiana* leaf to avoid leaf expression effects. Total extracts from 1-cm diameter leaf discs were analyzed by

immunoblotting with the corresponding antibodies. Nontransformed leaves were used as the immunoblotting control (C-). Ponceau red staining shows that equal amount of protein were loaded on the gel. **(D)** LYK3 does not affect PUB1 abundance in *N. benthamiana*. 3HA-PUB1 was expressed with or without LYK3-3FLAG. Experiments were performed as in **(C)**. **(E)** PUB1 is phosphorylated by LYK3 in vitro. The auto- and *trans*-phosphorylation activities of GST-LYK3 (intracellular region) were assayed alone or by addition of MBP, MBP-PUB1, or MBP-PUB1ΔUND. On the left panel, protein staining shows the size and quantity of the purified proteins. On the right panel, phosphor imaging reveals LYK3 kinase-dependent phosphorylation. The ~70-kD recombinant LYK3 kinase (-) as detected by immunoblot using anti-GST antibodies (see Supplemental Figure 3 online) shows autophosphorylation. *Trans*-phosphorylated forms of MBP-PUB1 and MBP-PUB1ΔUND are visible at the expected size of 117 and 87 kD, respectively (*). No radiolabeling of MBP is observed.

PUB1 Is a Divergent Member of the *M. truncatula* UND-PUB-ARM Family

Higher plants contain a family of UND-PUB-ARM proteins (Mudgil et al., 2004; Samuel et al., 2008); for example, there are 17 such genes in *Arabidopsis*. Only a few UND-PUB-ARM genes have been functionally characterized; these include *Arabidopsis* PUB17 and its potential tobacco ortholog, ACRE276 (Yang et al., 2006), *B. napus* ARC1 (Gu et al., 1998; Stone et al., 1999), tobacco PUB1 (Kim et al., 2003), and *Oryza sativa* SPL11 (Zeng et al., 2004).

To identify potential homologs of *Medicago* PUB1, the current *M. truncatula* genome release (version 3.0) was searched for genes closely related to Mt PUB1 and encoding UND-PUB-ARM proteins (see Supplemental Methods online). First, a low stringency similarity search for U-box domains using the BLAST-P algorithm and Mt PUB1 U-box domain as reference was performed against all *M. truncatula* predicted proteins. In a second step, we looked for the presence of ARM repeats in the previously retrieved protein subset using the most conserved ARM repeat of Mt PUB1. Finally, a subset was made of those proteins containing an UND domain. To ensure that no proteins closely related to Mt PUB1 were missed, further searches were made with the complete Mt PUB1 protein and its three component domain regions. Two sequences on chromosome 2 showing the highest similarity to Mt PUB1 were found by this analysis (Mt2g007770/80), but they do not appear to contain an UND domain. The predicted proteins have an incomplete U-box, and there is no evidence from the EST database that they are expressed. Seven genes encoding complete UND-PUB-ARM proteins, in addition to Mt PUB1, were identified. These eight *M.*

immunoblotting with the corresponding antibodies. Nontransformed leaves were used as the immunoblotting control (C-). Ponceau red staining shows that equal amount of protein were loaded on the gel.

(D) LYK3 does not affect PUB1 abundance in *N. benthamiana*. 3HA-PUB1 was expressed with or without LYK3-3FLAG. Experiments were performed as in **(C)**.

(E) PUB1 is phosphorylated by LYK3 in vitro. The auto- and *trans*-phosphorylation activities of GST-LYK3 (intracellular region) were assayed alone or by addition of MBP, MBP-PUB1, or MBP-PUB1ΔUND. On the left panel, protein staining shows the size and quantity of the purified proteins. On the right panel, phosphor imaging reveals LYK3 kinase-dependent phosphorylation. The ~70-kD recombinant LYK3 kinase (-) as detected by immunoblot using anti-GST antibodies (see Supplemental Figure 3 online) shows autophosphorylation. *Trans*-phosphorylated forms of MBP-PUB1 and MBP-PUB1ΔUND are visible at the expected size of 117 and 87 kD, respectively (*). No radiolabeling of MBP is observed.

truncatula proteins, 17 proteins from *Arabidopsis*, and the four functionally characterized proteins (Nt PUB4, Nt ACRE276, Bn ARC1, and Os SPL11) were aligned (see Supplemental Data Set 1 online) and used in phylogenetic analyses.

These analyses identified *M. truncatula* proteins that are potentially orthologous to several of the *Arabidopsis* UND-PUB-ARM proteins and of Nt ACRE276 and Bn ARC1 (see Supplemental Figure 4 online). Mt PUB1, however, does not appear to be closely related to any of the proteins used in the analysis. To look more closely at the evolution of this gene, similarity searching using the BLAST-P algorithm was used to identify UND-PUB-ARM homologs from other plant species whose genomes are highly sequenced, including legumes (*Glycine max* and *L. japonicus*), other dicots (*Vitis vinifera* and *Populus trichocarpa*), and a monocot (*O. sativa*). Alignment and phylogenetic analysis of these proteins show that Mt PUB1 falls into a discrete subclade (see Supplemental Data Set 2 and Supplemental Figure 5 online). This subclade comprises two *L. japonicus*, one *G. max*, one *V. vinifera*, and two *P. trichocarpa* proteins, which are thus the potential orthologs of Mt PUB1.

PUB1 Is Expressed during Symbiosis and Is Induced by NFs

To identify the expression profiles of *PUB1* and its closest homologs, we first used the *M. truncatula* Gene Expression Atlas, which is based on microarray analysis (<http://bioinfo.noble.org/gene-atlas/v2/>; Benedito et al., 2008; He et al., 2009). *PUB1* and its previously described *M. truncatula* homologs, with the exception of Mt7g088030, are represented in this database. Most of these *M. truncatula* UND-PUB-ARM genes are expressed in both roots and aerial organs, in a variety of conditions (see Supplemental Data Set 3 online). By contrast, *PUB1* has a very different and much narrower expression pattern. It shows very low expression in all organs during nonsymbiotic growth and is strongly induced in roots during nodulation and to a lesser extent following mycorrhization. These Gene

Expression Atlas data for *PUB1* induction during nodulation were confirmed by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) (Figure 4A). Quantification of *PUB1* mRNA abundance was performed in nitrogen-starved roots of *M. truncatula* and in bumps and developing nodules at 4 and 10 d after inoculation (DAI), respectively. Ratios of gene induction obtained by qRT-PCR in 4 and 10 d samples in relation to the roots (Figure 4A) were similar to the ratios calculated from the Gene Expression Atlas data (see Supplemental Data Set 3 online).

NFs are the major elicitor of transcriptional changes occurring at early stages of the nitrogen fixing symbiosis (Mitra et al., 2004); therefore, we investigated whether they could elicit changes in *PUB1* expression. *PUB1* expression in roots of *M. truncatula* seedlings treated with NFs was compared with water-treated samples by qRT-PCR. *PUB1* showed a very early and transient induction after NF application in *M. truncatula* (Figure 4B). To assess if this induction was dependent on the NF signaling pathway, the same experiment was performed after 6 h of NF application to roots of various symbiotic mutants (Figure 4C). No induction of *PUB1* expression was detected in the *nfp*, *dmi2*, and *dmi3* mutants. By contrast, induction of *PUB1* expression was still observed in the *nin* and *lyk3* mutants (Figure 4C). These results suggest that *PUB1* induction by NFs is dependent on the signaling receptor (NFP) and the DMI pathway rather than on the entry receptor (LYK3).

To examine the spatial expression pattern of *PUB1* during nodulation, *A. rhizogenes* was used to produce transgenic roots containing fusions of a 3-kb promoter region of *PUB1* to the β -glucuronidase (GUS) reporter gene (Pro*PUB1*:GUS). In non-inoculated roots, the GUS reporter was expressed weakly, including in the hairs of the developing root hair zone, which are most susceptible to rhizobial infection (Figure 5A). Following inoculation, expression of the reporter was noticeably stronger in cortical cells in close contact to rhizobial infections (Figure 5B). Strong GUS expression was seen in the nodule primordia compared with lateral root primordia (Figure 5C). In young nodules,

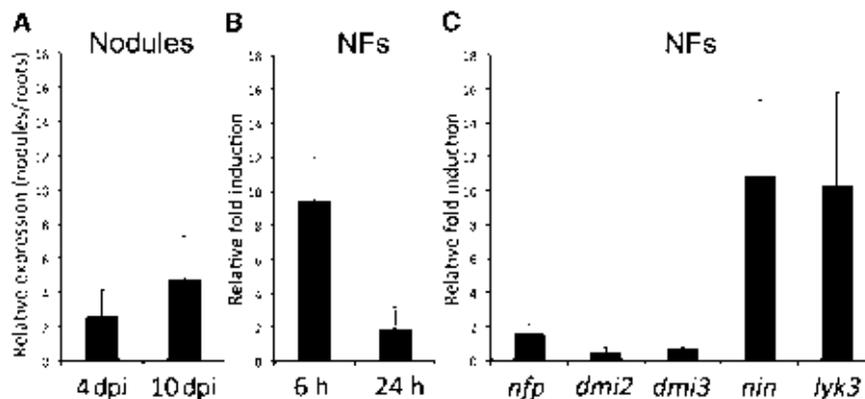


Figure 4. Quantification of *PUB1* Expression upon Rhizobia Inoculation and NF Treatment Using qRT-PCR.

Each bar represents the average of values from three independent biological replicates normalized using two reference genes. Standard deviation between biological replicates is represented.

(A) *PUB1* is induced in nodules at 4 and 10 DAI (dpi) compared with noninoculated roots.

(B) *PUB1* is induced after 6 and 24 h of NF versus water treatment.

(C) *PUB1* is not induced after 6 h of NF versus water treatment in *nfp*, *dmi2*, and *dmi3* mutants but is still induced in *nin* and *lyk3* mutants.

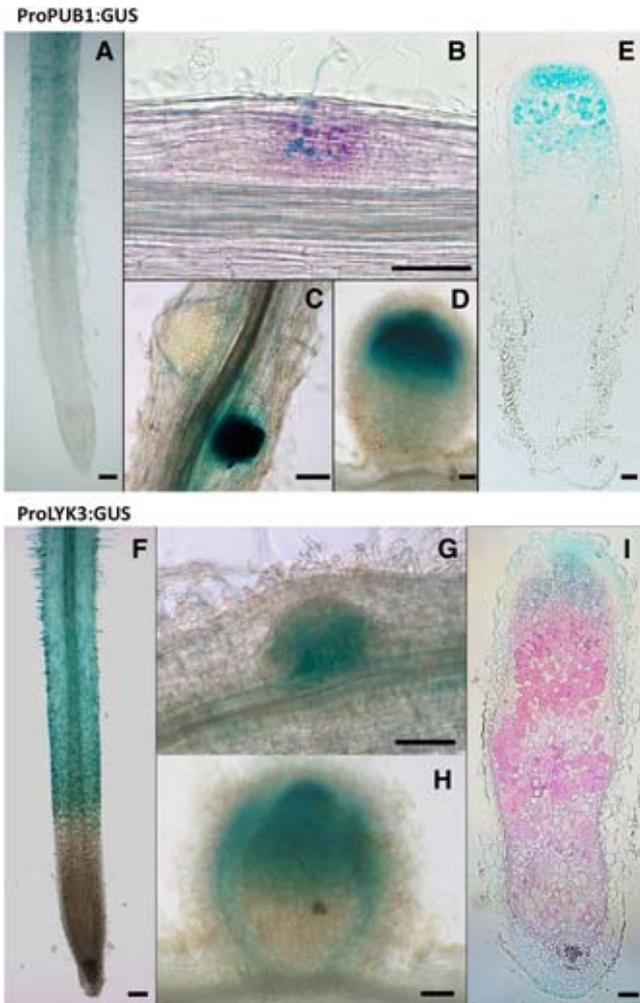


Figure 5. Histochemical Localization of ProPUB1:GUS and ProLYK3:GUS Expression during Nodulation of *M. truncatula*.

PUB1 expression pattern was determined using a 3-kb promoter region of the gene cloned in front of the GUS coding sequence. *LYK3* expression pattern was determined using the 2.6-kb promoter region of *LYK3* cloned in front of the GUS-GFP fusion coding sequence. *M. truncatula* roots transformed by *A. rhizogenes* were used for ProPUB1:GUS or ProLYK3:GUS detection during nodulation using either X-Gluc (blue in [A] and [C] to [I]) or Magenta-Gluc (magenta in [B]). Rhizobia were detected by β -galactosidase (LacZ) activity using X-Gal (blue in [B]) or Magenta-Gal (magenta in [I]). Bars = 100 μ m.

- (A) ProPUB1:GUS is weakly expressed in noninoculated roots, including in the root hair development zone.
 (B) After inoculation, ProPUB1:GUS is expressed predominantly in the nodule primordium and in cells associated with infection.
 (C) ProPUB1:GUS is expressed strongly in nodule compared with root primordia.
 (D) ProPUB1:GUS is expressed in the apical region of young, developing nodules.
 (E) In mature nodules, ProPUB1:GUS is expressed in the apical region, including the preinfection and infection zones and the early nitrogen-fixing zone.
 (F) ProLYK3:GUS is expressed in the developing root hair zone of noninoculated roots, including the epidermal cells.

the expression was confined to the apical regions (Figure 5D). In mature nodules GUS expression was evident in a broad apical region encompassing the preinfection, infection, and early nitrogen fixation zones (Figure 5E). Thus, *PUB1* shows an expression pattern compatible with a specific role during early stages of nodulation and during infection. Because *PUB1* is a protein interactor of *LYK3*, we also examined the spatial expression pattern of *LYK3* to assess if the two patterns of expression overlap. Transgenic roots containing fusions of a 2.6-kb promoter region of *LYK3* to the GUS reporter gene (ProLYK3:GUS) were generated by *A. rhizogenes* transformation. In noninoculated roots, the reporter was clearly expressed in the epidermal and root hair cells of the developing root hair zone (Figure 5F). Following inoculation, strong induction occurred in the nodule primordia (Figure 5G). In young nodules, GUS expression was evident in a broad apical region, like *PUB1*, and in the vasculature (Figure 5H). In mature nodules, expression was predominantly in the apical part of the nodule encompassing the preinfection and infection zones (Figure 5I). Thus, *LYK3* and *PUB1* patterns of expression show strong overlap before and during nodulation.

PUB1 Is a Negative Regulator of Infection and Nodulation

To examine the physiological role of *PUB1*, we attempted to identify mutants in the gene. However, despite screening the major *M. truncatula* mutant populations obtained by fast-neutron (Rogers et al., 2009), Tnt1 transposon insertion (d'Erfurth et al., 2003; Tadege et al., 2008), and chemical (ethyl methanesulfonate) mutagenesis (Le Signor et al., 2009), we were unable to recover null mutants in *PUB1*. We thus altered expression of the gene by overexpression with the Pro35S and knockdown using RNAi in *A. rhizogenes*-transformed roots.

We previously showed (Figure 2C) that expression with the Pro35S of 3HA-*PUB1* in wild-type *M. truncatula* leads to the production of the protein of the expected size. Following inoculation with the wild-type *S. meliloti* strain, the plants expressing 3HA-*PUB1* showed a reduction of $\sim 40\%$ in the number of nodules per plant compared with the control at 7 DAI in two large-scale experiments (Table 1). At 14 DAI, the difference was no longer significant, showing that overexpression of *PUB1* caused a delay in nodulation. These results are graphically represented in Figure 6A by showing the ratios of the mean number of nodules in the assay versus the control using data pooled from the two independent experiments; this ratio is referred to as the nodulation efficiency ratio and should be 1.0 if the genetic modification has no effect. The decreased nodulation efficiency ratio at 7 DAI (Figure 6A) suggests that *PUB1* could play a negative role in the establishment of the nitrogen-fixing symbiosis.

To investigate this possible negative role by another approach, a double-stranded RNA construct (RNAi) was prepared to knock down *PUB1* expression by targeting the 450-bp 5' region of the

- (G) ProLYK3:GUS is expressed in the nodule primordium.
 (H) In young nodules ProLYK3:GUS is expressed predominantly in the apical region of the nodule and to some extent in the vascular tissue.
 (I) In mature nodules, ProLYK3:GUS expression is predominantly in the apical region, including the preinfection and infection zones.

Table 1. Nodulation Phenotype of *M. truncatula* Roots Overexpressing PUB1

DAI	Experiment	Mean No. of Nodules per Plant		P Value ^a
		Control	3HA-PUB1	
7 DAI	Experiment 1	6.86 ± 5.81 (n = 96)	4.18 ± 4.19 (n = 87)	5.27 × 10 ^{-4***}
	Experiment 2	6.95 ± 5.21 (n = 43)	4.29 ± 3.44 (n = 42)	7.43 × 10 ^{-3**}
14 DAI	Experiment 1	9.09 ± 5.96 (n = 96)	8.42 ± 5.32 (n = 87)	0.42
	Experiment 2	8.8 ± 5.23 (n = 43)	7.28 ± 3.99 (n = 42)	0.15

Transformed wild-type *M. truncatula* plants overexpressing 3HA-PUB1 or GFP (control) were inoculated with wild-type *S. meliloti*. Two independent experiments were performed, and the means of the number of nodules formed at 7 and 14 DAI is shown as well as the standard deviations. The number of scored plants is shown in parentheses.

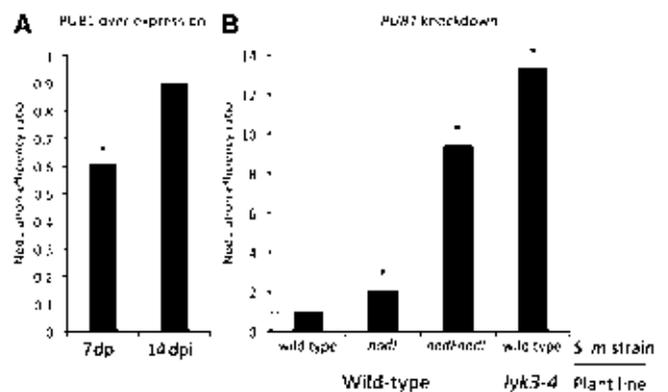
^aStatistical analysis of nodulation of 3HA-PUB1 versus control plants. P values below 0.01 and 0.001 are marked with two and three asterisks, respectively.

gene transcript. None of the seven Mt UND-PUB-ARM homologs described above (see Supplemental Figure 4 online) show sufficient homology in this region (21 identical and consecutive base pairs) to be affected by the RNAi construct. Analysis of roots from *PUB1*-RNAi plants pretreated with NFs showed a 70% reduction in *PUB1* transcripts on average compared with the control plants (see Supplemental Figure 6 online). The construct therefore appears to be efficient in downregulating expression of *PUB1* and was used to investigate the effect of *PUB1* knockdown on nodulation. *M. truncatula* plants transformed with this construct were inoculated with the wild-type *S. meliloti* strain. No difference was observed in the number of nodules (nodulation efficiency ratio of 0.97; Table 2, Figure 6B), a result also obtained in *LYK3*-RNAi plants (Limpens et al., 2003). However, *LYK3*-RNAi plants (Limpens et al., 2003) show reduced nodulation and a stronger phenotype with strains producing NFs modified at the nonreducing end. We thus tested nodulation of *PUB1*-RNAi plants using two strains that produce NFs harboring such alterations. The *S. meliloti nodL* mutant produces NFs that are not *O*-acetylated on the terminal nonreducing sugar and shows reduced nodulation on *M. truncatula* (Ardourel et al., 1994; Smit et al., 2007). The *S. meliloti nodFL* mutant produces non-*O*-acetylated NFs in which a C18:1 fatty acid generally replaces the specific C16:2 acyl chain. Such rhizobial mutants show very poor nodulation on *M. truncatula* (Ardourel et al., 1994). Nodulation experiments with such *S. meliloti* mutant strains show a very strong increase in the number of nodules produced on *PUB1*-RNAi plants compared with vector control plants, especially with the *nodFnodL* strain (Table 2, Figure 6B). Thus, the negative role in nodulation of *PUB1*, suggested by overexpressing *PUB1*, is confirmed using a knockdown strategy.

To link this role to *LYK3*, nodulation experiments were performed using the weak *lyk3-4 (hcl-4)* allele, in which only ~8% of the *LYK3* transcript appears to be correctly spliced. This mutant is poorly nodulated by wild-type rhizobia, resulting in <10% nodulation efficiency when compared with wild-type plants (Smit et al., 2007). In this mutant background, RNAi against *PUB1* led to a dramatic increase in nodulation with the wild-type *S. meliloti* strain compared with the control (Table 2, Figure 6B). Nodules were formed in only 19% of the control plants; by contrast, 79% of the *PUB1*-RNAi plants produced nodules.

LYK3 is primarily involved in infection, and in the *lyk3-4* allele, either the ITs are abnormally large, sac-like structures or the

bacteria remain as microcolonies in the root hair curl (Smit et al., 2007). We thus used this allele to study the effect of *PUB1* on infection. The number of ITs was dramatically increased in *PUB1*-RNAi *lyk3-4* plants compared with the control (Table 3). In addition, numerous normal, long, and thin ITs were observed in *PUB1* knockdown plants (Figure 7, left panel), while infections were restricted to large microcolonies and abnormal, short, and thick ITs at 5 DAI in control plants (Figure 7, right panel).

**Figure 6.** Analysis of the Role of *PUB1* in Nodulation using Overexpression and Knockdown Strategies.

Graphs represent the nodulation efficiency ratios: average number of nodules in the assay versus average number of nodules in the control. Each ratio is calculated using data from two independent experiments shown in Tables 1 and 2. The dashed line represents no difference of the assay plants to the vector control plants. *, Data showing statistical differences (P values below 0.01) in replicate experiments (see Tables 1 and 2).

(A) Overexpression of 3HA-PUB1 induces a significant delay in nodulation. *M. truncatula* wild-type plants, overexpressing 3HA-PUB1 or GFP (control) under the control of Pro35S, were inoculated with wild-type *S. meliloti*, and nodules were scored at 7 and 14 DAI (dpi) in growth pouches.

(B) *PUB1*-RNAi plants show increased nodulation efficiency of *M. truncatula* wild-type plants with *S. meliloti* strains altered in NF structure and of *M. truncatula lyk3-4* plants with the *S. meliloti* wild-type strain. *M. truncatula* wild-type or *lyk3-4* plants, transformed with the *PUB1*-RNAi construct or vector control, were inoculated with wild-type, *nodL*, or *nodFnodL* *S. meliloti* strains. Nodules were scored at 21 DAI in pots.

Table 2. Nodulation Phenotype of *PUB1* Knockdown Roots of *M. truncatula*

<i>M. truncatula</i>	<i>S. meliloti</i>	Experiment	Mean No. of Nodules per Plant		
			Control	<i>PUB1</i> RNAi	P Value ^a
Wild type	Wild type	Experiment 1	10.18 ± 4.77 (n = 44)	10.95 ± 5.71 (n = 60)	0.47
		Experiment 2	18.16 ± 7.48 (n = 62)	17.71 ± 7.89 (n = 63)	0.76
Wild type	<i>nodL</i>	Experiment 1	3.34 ± 3.43 (n = 44)	7.30 ± 4.26 (n = 52)	3.90 × 10 ^{-6***}
		Experiment 2	5.82 ± 3.59 (n = 65)	12.15 ± 5.92 (n = 61)	3.85 × 10 ^{-11***}
Wild type	<i>nodFnodL</i>	Experiment 1	0.22 ± 0.64 (n = 67)	1.53 ± 2.09 (n = 58)	3.77 × 10 ^{-6***}
		Experiment 2	0.17 ± 0.59 (n = 66)	2.11 ± 2.14 (n = 65)	1.04 × 10 ^{-10***}
<i>lyk3-4</i>	Wild type	Experiment 1	0.11 ± 0.42 (n = 26)	2.79 ± 3.34 (n = 23)	1.34 × 10 ^{-4***}
		Experiment 2	0.28 ± 0.56 (n = 86)	3.39 ± 2.99 (n = 90)	1.60 × 10 ^{-16***}

Wild-type or *lyk3-4* (*hcl-4*) mutant plants, transformed with the *PUB1* RNAi construct or empty vector (control), were inoculated with wild-type or *nod* mutant bacteria. For each combination, two independent experiments were performed, and the mean number of nodules formed at 21 DAI is shown as well as the standard deviations. The number of scored plants is shown in parentheses.

^aStatistical analysis of nodulation of *PUB1* RNAi versus control plants. P values below 0.001 are marked with asterisks.

Thus, the negative role of *PUB1* in nodulation is not confined to mutant strains producing altered NFs but is linked to the activity of LYK3 and the initiation and progression of the ITs.

DISCUSSION

LYK3 is essential for nodulation of *M. truncatula* but occupies an enigmatic position in the NF signaling pathways as little is known of how it links to downstream responses. In this article we describe an E3 ubiquitin ligase, *PUB1*, which interacts with LYK3 and provide evidence that this protein plays an important role as a negative regulator of the LYK3 signaling pathway controlling infection, nodulation and partner specificity.

The *PUB1* gene was identified in a yeast two-hybrid screen of a root hair cDNA library using the intracellular region of LYK3 as bait. To validate its role as a LYK3 interactor, we have shown that the two proteins interact in planta and that LYK3 interacts and phosphorylates *PUB1* in vitro (Figures 2 and 3). In *M. truncatula*, the two proteins locate to the same subcellular compartment, the plasma membrane (Figure 2), and their corresponding genes show a remarkable overlap in cellular expression patterns during nodulation (Figure 5), suggesting that the two proteins may encounter each other in vivo. Altogether, our data strongly suggest an interaction between LYK3 and *PUB1* in *M. truncatula*, raising the question of the function and the role of *PUB1* in LYK3-dependent nodulation. To address this question, we performed a detailed functional characterization of *PUB1*, including determining its enzymatic activity, its cellular function, and its biological role.

Our in vitro studies have shown that *PUB1* has a functional E3 ubiquitin ligase activity, as shown for other UND-PUB-ARM proteins (Stone et al., 2003; Zeng et al., 2004; Yang et al., 2006). As for these other proteins, this activity is dependent on the U-box domain as demonstrated here (Figure 3) by mutation of a key Trp residue known to be involved in interaction with E2 proteins (Andersen et al., 2004). Ubiquitination is a common, eukaryote-specific posttranslational modification that occurs in very different proteins and regulates many cellular processes. Often it leads to polyubiquitination and labeling of the proteins for deg-

radation. However, in other cases, ubiquitination is important for regulating the activity or trafficking of the target protein (Komander, 2009). The E3 ubiquitin ligases, which confer the specificity of substrate ubiquitination, are encoded by a large number of genes. For example, in *Arabidopsis*, there are >1200 E3 ubiquitin ligase genes (Smalle and Vierstra, 2004), including 64 encoding U-box proteins, many of which belong to the PUB-ARM subfamily (Yee and Goring, 2009).

Medicago *PUB1* is a member of the plant PUB-ARM protein family and particularly of the subset of these proteins that contains an UND domain (Azevedo et al., 2001; Mudgil et al., 2004). This UND-PUB-ARM group of proteins includes several with important roles in recognition responses, including self-incompatibility (*B. napus* ARC1; Stone et al., 1999) and biotic plant interactions (rice SPL11 [Zeng et al., 2004], tobacco ACRE276, and its potential ortholog in *Arabidopsis* *PUB17* [Yang et al., 2006]). In *M. truncatula*, other members of the UND-PUB-ARM family are more highly related to these proteins than *PUB1* (see Supplemental Figure 4 online), suggesting that *PUB1* is not orthologous to the previously characterized

Table 3. Infection Phenotype of *PUB1* Knockdown Roots of *M. truncatula* *lyk3-4*

Experiment	Mean No. of ITs per Plant		
	Control	<i>PUB1</i> RNAi	P Value ^a
Experiment 1	1.92 ± 3.22 (n = 36)	8.88 ± 10.48 (n = 33)	3.18 × 10 ^{-4***}
Experiment 2	0.48 ± 0.87 (n = 25)	6.41 ± 9.54 (n = 22)	3.34 × 10 ^{-3**}

lyk3-4 (*hcl-4*) mutant plants, transformed with the *PUB1* RNAi construct or empty vector (control), were inoculated with wild-type bacteria. For each combination, two independent experiments were performed, and the mean number of ITs formed at 5 DAI is shown as well as the standard deviations. The number of scored plants is shown in parentheses.

^aStatistical analysis of infection of *PUB1* RNAi versus control plants. P values below 0.01 and 0.001 are marked with two and three asterisks, respectively.



Figure 7. Analysis of ITs in *PUB1* Knockdown Roots of *lyk3-4* Plants.

lyk3-4 (*hcl-4*) mutant plants, transformed with the *PUB1* RNAi construct (left panel) or empty vector (right panel), were inoculated with wild-type *S. meliloti*. Rhizobia were detected by β -galactosidase (LacZ) activity using X-Gal (blue). ITs were imaged at 5 DAJ. Bars = 20 μ m.

UND-PUB-ARM genes. Indeed, *PUB1* is not closely related to any *Arabidopsis* protein but is the single *M. truncatula* member of a small clade of uncharacterized UND-PUB-ARM proteins, which includes two proteins from *L. japonicus* and one from *G. max* (see Supplemental Figure 5 online). Potential orthologs in nonleguminous dicotyledonous plants such as *V. vinifera* and *P. trichocarpa* suggest that this gene was not originally specialized for a role in nodulation, but such a function may have arisen during evolution of the legumes. However, this conclusion needs to await the completion of the *M. truncatula* genome sequencing project and the functional characterization of other legume proteins in the *PUB1* subclade.

Several E3 ubiquitin ligases have been shown to be regulated and/or play a role in nodulation (Nishimura et al., 2002; Karlowski and Hirsch, 2003; Shimomura et al., 2006; Den Herder et al., 2008; Kiss et al., 2009; Yano et al., 2009). These E3 ubiquitin ligases belong to other subfamilies than *PUB1* and have rather different protein structures. Their protein targets and modes of action are not yet known. The involvement of multiple E3 ubiquitin ligases in the control of a complex biological process, such as nodulation, is expected due to the key roles of these proteins in regulating protein level, localization, and activity. The targets and modes of action of *PUB1* and these various E3 ubiquitin ligases are thus expected to be different.

Our results on over- and knockdown expression clearly show that *PUB1* plays a physiological role in the negative control of nodulation. Overexpression leads to a delay in nodulation with wild-type *S. meliloti* (Table 1). Knockdown of expression demonstrates that the level of *PUB1* is important in determining the specificity of nodulation to rhizobial species in a NF-dependent manner (Table 2). For example, RNAi against *PUB1* leads to better nodulation of *M. truncatula* by rhizobial strains that produce nonoptimal NF structures (alteration in the acyl chain structure and non-*O*-acetylation of the terminal nonreducing sugar). This result is opposite to similar work on *LYK3* where knockdown plants and a weak *LYK3* mutant (*lyk3-4*) show increased specificity for rhizobial strains such that those producing nonoptimal NFs can no longer nodulate (Limpens et al., 2003; Smit et al., 2007). In addition, our demonstration that the weak *LYK3* mutant can be partially complemented for nodulation and infection by knockdown of *PUB1* (Figures 6 and 7, Tables 2 and 3) provides a genetic link between the two genes.

Thus, the use of rhizobial NF mutants has clearly shown a role of *PUB1* in a NF-dependent selection of the rhizobial symbiont. *PUB1* overexpression and the use of the weak *LYK3* mutant have confirmed the role of *PUB1* during nodulation with wild-type rhizobia and provide evidence that the role of *PUB1* is *LYK3*

dependent. Although, knockdown of *PUB1* did not lead to increased nodule number when inoculated with wild-type rhizobia, this result could be explained by the RNAi construct not being totally effective in downregulating *PUB1* activity, that another mechanism of negative regulation still controls the nodule number in *PUB1*-RNAi plants, or that another UND-PUB-ARM protein has partial functional redundancy with *PUB1*. Indeed, several of the *M. truncatula* UND-PUB-ARM genes are expressed in roots and nodules, although only *PUB1* shows an expression pattern specific to symbiosis (see Supplemental Data Set 3 online). Together, the data show that *PUB1* controls nodulation as a negative regulator in the signaling pathway driven by *LYK3*.

There are two main modes of action by which *PUB1* could exert an effect at the cellular level through interaction with *LYK3*. First, it could ubiquitinate *LYK3*, leading to its degradation. In animals, many RLKs are regulated by various E3 ubiquitin ligases leading to their degradation. For example, regulation of the Toll-like receptor family and their interacting proteins is important for regulating the innate immune response to invading microbes (Carpenter and O'Neill, 2009). In plants, direct evidence for regulation of RLKs by ubiquitination is starting to appear (Geldner and Robatzek, 2008; Göhre et al., 2008), but although several plant E3 ubiquitin ligases have been shown to interact with RLKs (Gu et al., 1998; Kim et al., 2003; Wang et al., 2006; Samuel et al., 2008), their direct role in RLK ubiquitination and degradation has not been shown. However, evidence for such a mechanism has been provided recently by the observation that a bacterial effector with E3 ubiquitin ligase activity (*AvrPtoB*), which is translocated to the plant cell cytoplasm, leads to ubiquitination and degradation of microbe-associated molecular pattern receptors and increases virulence of the pathogen (Göhre et al., 2008; Xiang et al., 2008; Gimenez-Ibanez et al., 2009). In our experiments, *PUB1* did not ubiquitinate the *LYK3* intracellular region *in vitro*, and coexpression of *PUB1* with *LYK3* in *N. benthamiana* did not lead to any changes in the level of *LYK3* (Figure 3). By contrast, similar work using the same *in vitro* and heterologous systems showed ubiquitination and degradation of *CERK1* by *AvrPtoB* (Gimenez-Ibanez et al., 2009). Together, our results have failed to provide evidence for a role of *PUB1* in regulating the activity or degradation of *LYK3* through ubiquitination. However, we cannot exclude the possibility that in *M. truncatula* such a mechanism may exist.

The second possible mechanism is that *LYK3* modulates the activity of *PUB1*, which then regulates downstream components, perhaps through their ubiquitination and degradation. In the interaction between the *S*-locus receptor kinase (*SRK1*) and *ARC1*, which regulates self-incompatibility in *B. napus*, *SRK1*

has been shown to phosphorylate ARC1 (Gu et al., 1998). Recently, a protein interacting with the UND domain of ARC1 has been identified and demonstrated to be ubiquitinated by ARC1. Functional analysis of this protein, EXO70A1, has shown that it is a downstream compatibility factor, which is inhibited in the incompatibility response leading to pollen rejection (Stone et al., 2003; Samuel et al., 2009). We have shown that PUB1 is phosphorylated by LYK3. PUB1 could then modulate the activity of downstream components in the LYK3 signal transduction pathway by ubiquitination, which could either lead to the degradation of positive regulators or the activation of negative regulators of nodulation. Isolation of PUB1 interactors could be a means to determine the mode of action of PUB1.

LYK3 is essential for nodulation and appears to be the key checkpoint for bacterial entry in *M. truncatula* (Limpens et al., 2003). Thus, its activity may need to be finely controlled to allow infection only by bacteria with the right passports (NFs) and to close the door to potential freeloaders and pathogens. The PUB1 E3 ubiquitin ligase may be a key component of this fine regulation playing a role as a negative regulator in signaling by LYK3. The transient induction of *PUB1* by NFs via NFP and the common symbiotic pathway (Figure 4) could be a mechanism whereby a local increase in PUB1 could regulate LYK3-dependent activities. In this way, the signaling receptor (NFP) would regulate the activities of the entry receptor (LYK3) through PUB1 induction, leading to a fine control of infection and nodulation.

In summary, this work identified a key regulator of infection, nodulation, and partner specificity in the establishment of the legume-rhizobia symbiosis and provides further evidence for the role of UND-PUB-ARM E3 ubiquitin ligases in regulating plant development through modulating RLK signaling pathways. This work extends the pioneering work on SRK1/ARC1 in the *Brassica* self-incompatibility response to show that a RLK/UND-PUB-ARM protein interaction can affect specificity in a plant-microbe interaction. There are a large number of PUB-ARM genes in higher plants, some of which have been shown to play important physiological roles in plant development and plant-pathogen interactions (Yee and Goring, 2009). Our work, together with that on Bn ARC1, further suggests that RLKs are good candidates to be tested as interactors of this important class of E3 ubiquitin ligases.

METHODS

Plant Material

Medicago truncatula Jemalong A17 (wild type) and NF signaling mutants *nfp-2*, *lyk3-1 (hcl-1)*, *dmi2-1 (tr25)*, *dmi3-1 (trv25)*, *nin1.1*, and *lyk3-4 (hcl-4)* were used in this study (Arrighi, et al., 2006; Catoira et al., 2000, 2001; Marsh et al., 2007; Smit et al., 2007). Seeds were surface-sterilized and germinated according to Boisson-Dernier et al. (2001) and either used for *Agrobacterium rhizogenes* transformation or transferred to nitrogen-free medium for 4 d before NF treatment or *Sinorhizobium meliloti* inoculation.

M. truncatula Transgenic Roots Generated by *A. rhizogenes* Transformation

Overexpression of a 3HA-Tagged *PUB1*

The 3HA-PUB1 construct consists of the coding sequence (3HA tag-AttB1 Gateway border-PUB1) under the control of Pro35S and cloned in a

pGREEN vector: the control construct contained a Pro35S:GFP construct in the same vector (Navarro-Gochicoa et al., 2003). All primers used in this study are reported in Supplemental Table 1 online. For *M. truncatula* transformation, 7-d-old A17 seedlings grown on Farhaeus agar plates were wounded with a needle at the hypocotyl-root junction and cocultured with *A. rhizogenes* carrying the 3HA-PUB1 or GFP constructs by application of Luria-Bertani agar grown bacteria on the wounds. Plants were grown for 5 d at 25°C before cutting and discarding the primary untransformed root. A concentrated solution of *A. rhizogenes* ($OD_{600} = 1$) was again applied on the cut edge of the hypocotyl. At 2 weeks after the second inoculation, plants were transferred to growth pouches (Mega International; four plants/pouch) prior to inoculation with *S. meliloti*. Nodule number was scored at 7 and 14 DAI. Two independent biological replicates were performed. Student's *t* test was used to compare the means between samples. For the localization studies, pieces of root expressing 3HA-PUB1 or GFP were cut and propagated at 25°C on M medium (for medium composition, see <http://www.noble.org/MedicagoHandbook/>) supplemented with 25 mg·L⁻¹ kanamycin and 200 mg·L⁻¹ augmentin.

Knockdown of *PUB1* by RNAi

The first 450 bp of *PUB1* coding sequence (1 to 450 bp starting from the ATG) was amplified by PCR using cDNA as template and cloned using the Gateway technology in the pK7GWiwG(II) binary vector, modified to express *DsRED1* (Limpens et al., 2005). A version of the vector cured of the Gateway recombination sites was constructed by deletion of the sequence contained between the promoter and terminator 35S by *ZraI*/*HindIII* digestions and used as negative control. Germinated seedlings were transformed with *A. rhizogenes* as described by Boisson-Dernier et al. (2001). At 3 weeks after inoculation, kanamycin-resistant plants showing fluorescence of DsRed were transferred to 150-mL pots containing perlite (three plants/pot) and acclimatized for 5 d in a greenhouse prior to inoculation with *S. meliloti* strains. Nodule number was scored at 21 DAI and ITs at 5 DAI. For IT analysis, roots were fixed and bacterial LacZ activity was performed as described by Bersoult et al. (2005). Two independent biological replicates were performed. Student's *t* test was used to compare the means between samples.

Rhizobium Inoculations

S. meliloti strains 2011 (GMI6526), *nodL* (GMI6563), and *nodFnodL* (GMI6630) mutants (Ardourel et al., 1994) harboring the *hemA-lacZ* transgene plasmid (pXLGD4) were grown for 3 d at 25°C on TY-agar medium supplemented with 6 mM CaCl₂ and containing the appropriate antibiotic combinations. Suspension of bacteria diluted in water were used to inoculate plants in pouches (0.5 mL of an $OD_{600} = 0.1$ per plant) and perlite-containing pots (10 mL of an $OD_{600} = 0.025$ per pot).

Yeast Two-Hybrid Screen and Pairwise Interactions

The sequence coding the LYK3 intracellular region, containing the juxta membrane, the kinase, and the C-terminal regions (amino acids 257 to 620) was amplified by PCR and cloned by restriction digestion into the pBD vector (Clontech) and transformed into the yeast strain AH109 using the LiAc-mediated yeast transformation protocol as described in the Yeast Protocols Handbook (Clontech). The resulting yeast strain was then transformed with plasmid DNAs derived from a *M. truncatula* NF-elicited, root hair cell cDNA library (Andriankaja et al., 2007). Approximately 1.5×10^6 yeast transformants were screened for the activation of the *HIS3* reporter gene on minimal medium lacking His, Trp, and Leu and supplemented with 10 mM 3-amino-triazol. The *HIS3*⁺ yeast colonies were recovered after 3 or 4 d of growth at 28°C and retested for growth on

minimal medium lacking His and adenine. The cDNA inserts of positive clones were amplified by PCR from yeast cell extracts and sequenced after a PCR product purification step. Plasmid rescue of nonredundant candidates was then performed. The intracellular regions of the *Arabidopsis thaliana* BRI1 RLK (amino acids 815 to 1196), the *M. truncatula* LRR11.1 RLK (amino acids 230 to 597), the *M. truncatula* LysM-RLK LYK2 (amino acids 255 to 612), LYK4 (amino acids 257 to 624), and NFP (amino acids 274 to 595) were amplified by PCR and cloned using the Gateway technology into the pBD vector prior to specificity tests with the obtained candidates. For homogeneity reasons, the LYK3 intracellular region (amino acids 253 to 620) was cloned into the pBD vector using the Gateway technology when interactions were retested. In addition to the three PUB1 variants obtained in the screen (full-size PUB1, PUB1 Δ UND [amino acids 271 to 694], and PUB1 Δ UND Δ -Box [amino acids 397 to 694]), the PUB1 Δ ARM (amino acids 1 to 387) construct was obtained by PCR and cloned into the pGAD vector (Andriankaja et al., 2007) using Gateway technology.

Transient Expression in *Nicotiana benthamiana* Leaves and BiFC Experiments

The pGREEN 3HA-PUB1, pCAMBIA LYK3-3FLAG, and pGREEN LYK3-GFP constructs, all under the control of the Pro35S, were introduced into the *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 strain for expression in *N. benthamiana* leaves. The pAMPAT destination vectors and the constructs LYK3-YFP, LYK3-Yc, LRR11.1-YFP, and LRR11.1-Yc are described by Lefebvre et al. (2010). Yn-PUB1, Yn-PUB1 Δ ARM, BRI1-YFP, and BRI1-Yc constructs were made using Gateway technology and corresponding pAMPAT destination vectors and introduced in *A. tumefaciens* GV3103 pmp90RK. *A. tumefaciens*-containing expression vectors were grown overnight at 28°C in liquid YEB medium supplemented with appropriate antibiotics. Bacteria were washed and diluted in 10 mM MES, pH 5.6, 10 mM MgCl₂, and 100 μ M acetosyringone prior to *N. benthamiana* leaf inoculation. Bacteria containing pGREEN, pCAMBIA, or pAMPAT vectors were diluted to OD₆₀₀ = 0.5, OD₆₀₀ = 0.05, and OD₆₀₀ = 0.25, respectively. The p19 protein, which inhibits gene silencing (Voinnet et al., 2003), was coexpressed with the pAMPAT constructs using bacteria diluted to OD₆₀₀ = 0.1. Leaves were imaged using a Zeiss epifluorescence Axiophot microscope with a \times 5 objective. Two 8-bit TIFF images for each transformed leaf were quantified using ImageJ. Background was removed using the same threshold for all images. All pairs were tested in three different leaves in each experiment. At least three independent experiments were performed. Results from one experiment are shown.

Protein Extraction and Membrane Fractionation

For total extract protein analysis, *N. benthamiana* leaf discs of 1-cm diameter were frozen in liquid nitrogen and ground for 1 min in 2-mL eppendorf tubes with 4-mm metal beads using a Retsch miller. Extracts were solubilized directly by adding 2% SDS gel loading buffer and heating at 95°C for 5 min.

For fractionation, *N. benthamiana* leaves or *M. truncatula* roots were homogenized at 4°C in a blender with 250 mM Sorbitol, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM EDTA, 0.6% polyvinylpyrrolidone, 5 mM DTT, protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 1 μ g/mL each of leupeptin, aprotinin, antipain, chymostatin, and pepstatin from Sigma-Aldrich). After centrifugation for 10 min at 3000g, the resulting supernatant was centrifuged for 30 min at 100,000g, and the pellet resuspended in 330 mM sucrose, 3 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, pH 7.8, and protease inhibitors to give the total membrane fraction. The supernatant was precipitated with 10% trichloroacetic acid, washed twice with 90% acetone, and resuspended in the same volume as the total membrane fraction. Plasma membrane fraction was purified from the total membrane fraction by phase partitioning using 6.5% PEG3350 and 6.5%

Dextran T500 as described by Larsson et al. (1987) and resuspended in the same buffer as the total membrane fraction. Fractions were solubilized by adding 2% SDS gel loading buffer and heating at 95°C for 5 min.

Production of Recombinant Proteins and in Vitro Biochemical Assays

Recombinant Protein Purification

The LYK3-IR-6HIS, PUB1 Δ UND, and At UBC8 GST-tagged proteins were expressed in *Escherichia coli* strain DH5 α , and purifications were performed using Glutathione Sepharose 4B according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare). The PUB1 and PUB1 Δ UND MBP-tagged proteins and MBP were expressed in *E. coli* strain DH5 α , and purifications were performed using amylose resin according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs). For protein production, a 2.5-mL *E. coli* overnight culture was transferred to 250 mL of Luria-Bertani medium and grown at 37°C to a density of OD₆₀₀ = 0.6. Isopropylthio- β -galactoside was added to 0.5 mM and cells were grown for 5 h at 20°C and 28°C for GST-tagged and MBP-tagged proteins, respectively. The cells were collected by centrifugation and resuspended in 20 mL of ice-cold lysis buffers supplemented with protease inhibitors and 1 mM benzimidazole prior to cell disruption using a French press. Insoluble material was eliminated by centrifugation at 18,000g for 20 min at 4°C. The soluble fraction was run twice through columns prepared with 200 μ L of prewashed glutathione sepharose 4B matrix or amylose resin. Bound proteins were washed with 10 mL of ice-cold lysis buffers prior to elution in 4 mL of GST or MBP elution buffers. Eluted proteins were concentrated to a final volume of 200 μ L using Amicon Ultra Ultracel 10-K (Millipore). The purity of eluted proteins was checked visually by SDS-PAGE and staining with SimplyBlue SafeStain (Invitrogen).

Phosphorylation Assay

For kinase phosphorylation assays, proteins were incubated in 25 μ L of 50 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂, 1 mM DTT, and 100 nM (10 μ Ci) -P³²ATP at 25°C for 1.5 h. Approximately equal quantities of the purified substrate proteins were used. Reactions were stopped by adding 2% SDS gel loading buffer and heating at 95°C for 5 min. Reactions were analyzed by SDS-PAGE, and after staining with SimplyBlue SafeStain, gels were dried and analyzed by phosphor imaging.

Ubiquitination Assay

In vitro ubiquitination assays were performed as follows: the reaction mixtures (20 μ L) contained 0.5 μ g of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) E1 enzyme (Sigma-Aldrich), 0.5 μ g of purified *Arabidopsis* E2 enzyme UBC8, 0.5 μ g of purified GST-PUB1 Δ UND protein as the E3 ubiquitin ligase, and 1 μ g of ubiquitin (Sigma-Aldrich) in 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 1 mM ATP, and 0.5 mM DTT. Reactions were incubated at 30°C for 2 h and terminated by adding 2% SDS gel loading buffer and heating at 95°C for 5 min before SDS-PAGE and protein gel blot analysis.

Immunoblotting

Proteins were separated on 10% SDS-PAGE gels, transferred onto nitrocellulose or polyvinylidene difluoride membranes using the Mighty Small Transphor liquid transfer apparatus (GE healthcare), and detected with antibodies as indicated in each figure. The antibodies were diluted as follows: anti HA-HRP (Roche; 1:1000 to 1:4000), anti FLAG-HRP (Sigma; 1:4000), anti HIS-HRP (Sigma; 1:5000), anti GST-HRP (GE Healthcare; 1:10000), alone and mouse anti-ubiquitin (Santa Cruz Biotech; 1:5000), rabbit anti-GFP (Invitrogen; 1:5000) and rabbit anti-MBP (New England Biolabs; 1:7500) in combination with anti-rabbit-HRP (Millipore; 1:25000)

or anti-mouse HRP (Santa Cruz Biotech; 1:20000). Horseradish peroxidase (HRP) was detected using the Immobilon protein gel blotting detection system (Millipore) and a digital camera (G-Box; Syngene).

NF Treatment and Gene Expression Quantification by qRT-PCR

Seedlings of aeroponically grown wild type and mutants, with the exception of *dmi3-1* (treated on pouch paper), were transferred into tubes with the root system immersed in either Farhaeus medium alone as control or with NFs (10^{-9} M) purified from *S. meliloti*, containing predominantly NodSmIV (Ac, S, C16:2), prepared as described by Roche et al. (1991a). The plant material was incubated for 6 or 24 h before harvesting the roots. NF treatment of seedling roots grown on pouch paper support (Mega International) was performed as described by Sauviac et al. (2005) by covering the roots for 6 h in either Farhaeus medium alone or a 10^{-8} M concentration of purified NFs. To test RNAi efficiency, roots from 17 transgenic control plants and roots from 18 transgenic *PUB1*-RNAi plants [obtained using the *lyk3-4* (*hcl-4*) mutant background and growing on Farhaeus agar plates] were transferred into tubes containing Farhaeus medium with purified NFs (10^{-9} M) and incubated for 8 h before harvesting of the roots.

Total RNA was extracted from roots of *M. truncatula* using the NucleoSpin RNA II total RNA isolation kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA was removed via DNase treatment (TURBO DNase; Applied Biosystems) after RNA elution, following the manufacturer's instructions. The integrity and quantity of the RNA samples were simultaneously checked using Agilent chips and the Agilent RNA 6000 Nano reagents kit (Agilent Technologies). First-strand cDNA synthesis was performed using 1 μ g (or 200 ng for the RNAi efficiency experiment) of total RNA with an anchored oligo(dT) and Transcriptase reverse transcriptase (Roche) following the manufacturer's protocol. Real-time PCR reactions were performed on Light Cycler 480 (Roche) according to the manufacturer's instructions, using SYBR Green I Master and the following primer pairs: *HLC* (5'-GTACGAGGTCGGT-GCTCTTGA-3', 5'-GCAACCGAAAATTGCACCATA-3'), *UBQ* (5'-TTGTG-TGTTGAATCCTAAGCA-3', 5'-CAAGACCCATGCAACAAGTTC-3'), *PUB1* (5'-AAAGCCGGTATAACCGACGATT-3', 5'-TCCAACCCCTCAGAACAACCT-3'). Transcript levels of *PUB1* were normalized to the endogenous *HLC* (Helicase MtD35391_GC) and *UBQ* (ubiquitin MtC00117.1_GC) gene transcript levels. Three independent biological replicates were performed for each condition tested.

Spatiotemporal Expression Analysis of the *PUB1* and *LYK3* Genes

For promoter GUS fusions, a 3-kb region upstream of *PUB1* (−2968 to −1 bp from ATG) was cloned into the pBI101 binary vector. The ProLYK3:GUS-GFP expression construct used a 2.6-kb region upstream of *LYK3* (−2600 to −4 bp from ATG). Transformation of *M. truncatula* and selection of kanamycin-resistant plants was performed as described previously. Plants were transferred to pouches or perlite-containing pots and inoculated with *S. meliloti* (GMI6526). Double detection of ProPUB1:GUS or ProLYK3:GUS expression and bacterial LacZ activity was performed as described by Bersoult et al. (2005) using Magenta-Gluc and X-Gal or X-Gluc and Magenta-Gal, respectively. Mature nodules were embedded in Technovit 7100 resin (Hareus Kulzer) before making 8- μ m-thick sections with a Richert-Jung microtome. Observations were made with a bright-field Axiophot microscope. Digital images were taken with a Leica camera and software.

Accession Numbers

The *PUB1* nucleotide sequence data reported are available in the Third Party Annotation Section of the GenBank/EMBL/DDBJ databases under the accession number TPA: BK007068. Other sequence data from this

article can be found in the GenBank/EMBL databases under the following accession numbers: BRI1 (AF017056), LRR1.1 (EU849167), LYK2 (BN001116), LYK4 (AY372403), and NFP (DQ496250). Accession numbers for proteins used in the alignments and phylogenetic analyses can be found in Supplemental Methods and Supplemental Figure 5 online.

Author Contributions

M.M. participated in all aspects of the work. C.H. and B.L. conceived and performed some of the experiments. S.C., L.D., D.K.-H., S.M., F.D.C.-N., S.F., S.R., and T.T. provided expert technical support and discussions on specific parts of the work. J.C., B.L., and C.H. conceived the project. The article was written by J.C., M.M., B.L., and C.H.

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure 1. Alignment of Mt PUB1 with Closely Related Proteins.

Supplemental Figure 2. Interaction of PUB1 with LYK3 in *N. benthamiana*.

Supplemental Figure 3. Detection of GST LYK3-IR in the in Vitro Trans-Phosphorylation of PUB1 Experiment.

Supplemental Figure 4. Phylogenetic Relationships between the UND-PUB-ARM Proteins of *M. truncatula* and Selected UND-PUB-ARM Proteins from Other Higher Plants.

Supplemental Figure 5. Phylogenetic Analysis of Higher-Plant UND-PUB-ARM Proteins.

Supplemental 6. *PUB1*-RNAi Construct Efficiency.

Supplemental Table 1. Primers Used in This Study.

Supplemental Data Set 1. Text file of Alignment of UND-PUB-ARM Proteins of *M. truncatula* and Selected UND-PUB-ARM Proteins from Other Higher Plants.

Supplemental Data Set 2. Text file of Alignment of Higher-Plant UND-PUB-ARM Proteins.

Supplemental Data Set 3. Expression Pattern of the *M. truncatula* UND-PUB-ARM Family Based on the *M. truncatula* Gene Expression Atlas.

Supplemental Methods. Phylogenetic and Protein Sequence Analyses.

Supplemental References.

ACKNOWLEDGMENTS

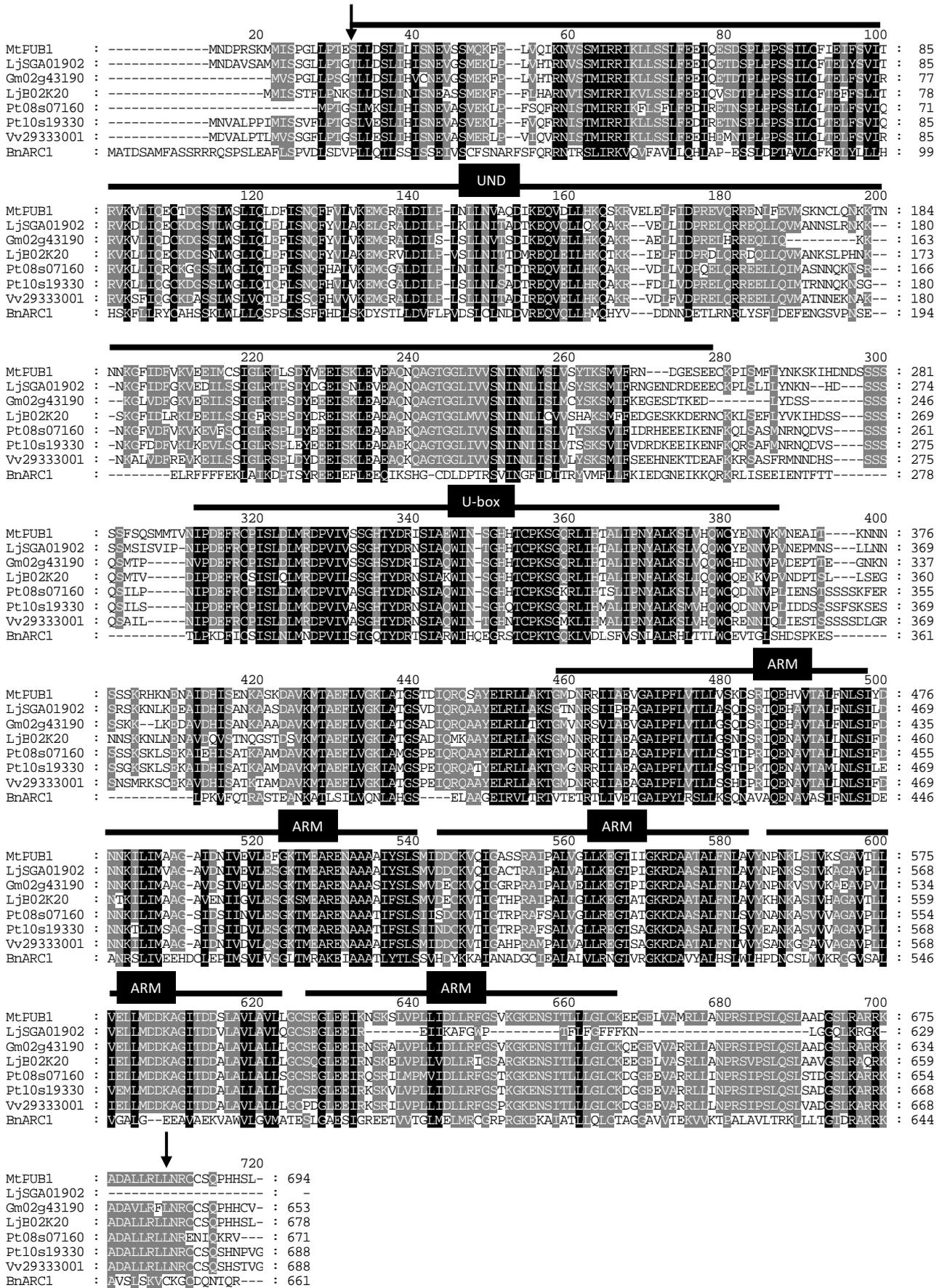
We gratefully acknowledge the contribution of the following persons at Wageningen University: René Geurts and Arend Streng for the gift of the ProLYK3:GUS construct and Eric Limpens for the modified RNAi plasmid. From our laboratory, we thank Fabienne Maillet for providing purified NFs and Clare Gough for critically reading the manuscript. This work was supported by the European Community funded Research Training Network "NODPERCEPTION" and by the French National Research Agency (ANR) contract "NodBindsLysM." M.M. acknowledges a doctoral grant from the French Ministry for Higher Education and Research.

Received April 28, 2010; revised September 24, 2010; accepted October 4, 2010; published October 22, 2010.

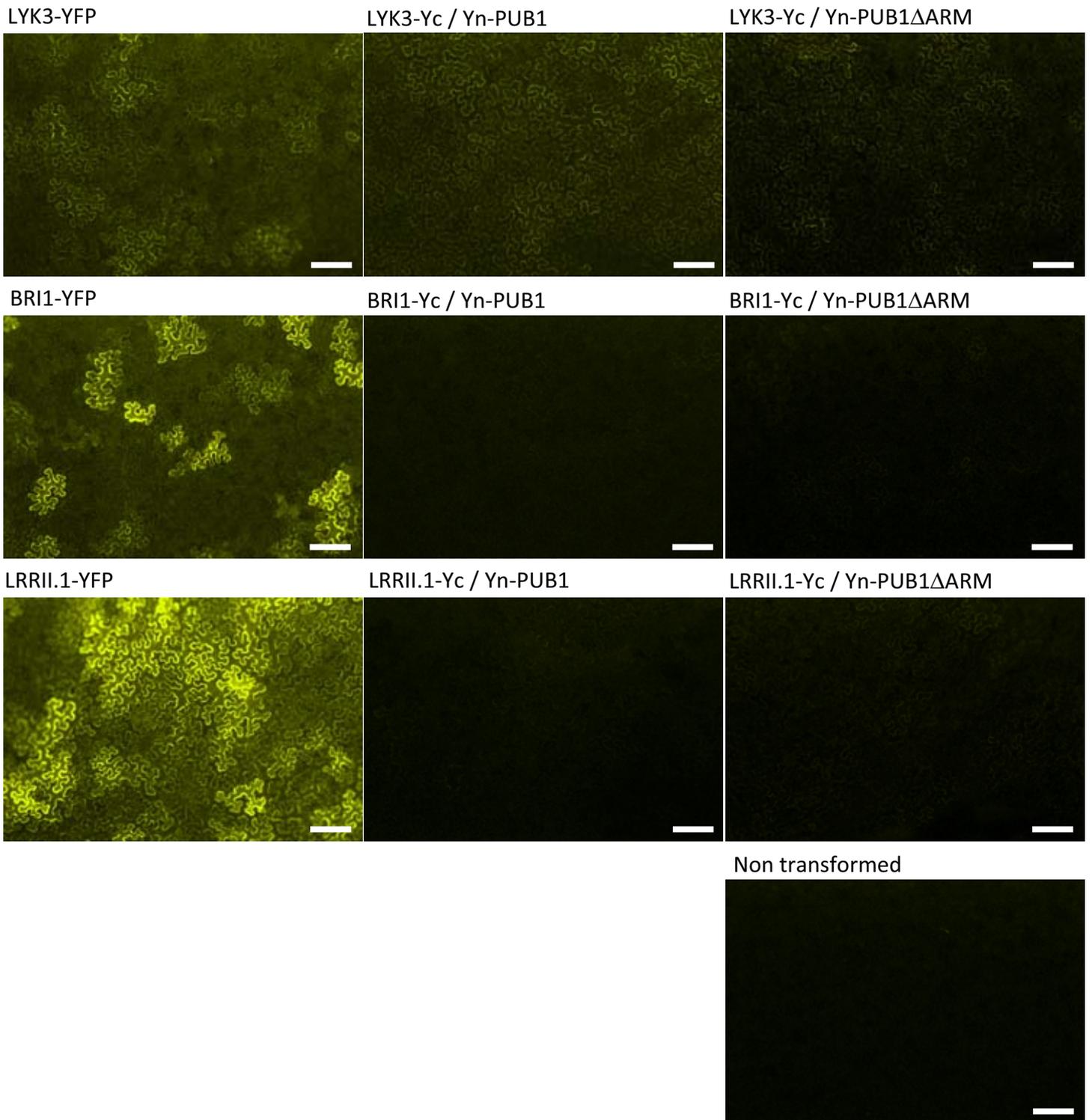
REFERENCES

- Amor, B.B., Shaw, S.L., Oldroyd, G.E., Maillet, F., Penmetsa, R.V., Cook, D., Long, S.R., Dénarié, J., and Gough, C. (2003). The *NFP* locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J.* **34**: 495–506.
- Andersen, P., Kragelund, B.B., Olsen, A.N., Larsen, F.H., Chua, N.H., Poulsen, F.M., and Skriver, K. (2004). Structure and biochemical function of a prototypical *Arabidopsis* U-box domain. *J. Biol. Chem.* **279**: 40053–40061.
- Andriankaja, A., Boisson-Dernier, A., Frances, L., Sauviac, L., Jauneau, A., Barker, D.G., and de Carvalho-Niebel, F. (2007). AP2-ERF transcription factors mediate Nod factor dependent Mt *ENOD11* activation in root hairs via a novel cis-regulatory motif. *Plant Cell* **19**: 2866–2885.
- Ardourel, M., Demont, N., Debelle, F., Maillet, F., de Billy, F., Promé, J.C., Dénarié, J., and Truchet, G. (1994). *Rhizobium meliloti* lipopoligosaccharide nodulation factors: Different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell* **6**: 1357–1374.
- Arrighi, J.F., et al. (2006). The *Medicago truncatula* lysin [corrected] motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant Physiol.* **142**: 265–279.
- Azevedo, C., Santos-Rosa, M.J., and Shirasu, K. (2001). The U-box protein family in plants. *Trends Plant Sci.* **6**: 354–358.
- Benedito, V.A., et al. (2008). A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J.* **55**: 504–513.
- Bersoult, A., Camut, S., Perhald, A., Kereszt, A., Kiss, G.B., and Cullimore, J.V. (2005). Expression of the *Medicago truncatula* *DM12* gene suggests roles of the symbiotic nodulation receptor kinase in nodules and during early nodule development. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**: 869–876.
- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Bécard, G., Rosenberg, C., and Barker, D.G. (2001). *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**: 695–700.
- Carpenter, S., and O'Neill, L.A. (2009). Recent insights into the structure of Toll-like receptors and post-translational modifications of their associated signalling proteins. *Biochem. J.* **422**: 1–10.
- Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, R.V., Journet, E.P., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C., and Dénarié, J. (2000). Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell* **12**: 1647–1666.
- Catoira, R., Timmers, A.C., Maillet, F., Galera, C., Penmetsa, R.V., Cook, D., Dénarié, J., and Gough, C. (2001). The *HCL* gene of *Medicago truncatula* controls *Rhizobium*-induced root hair curling. *Development* **128**: 1507–1518.
- Dénarié, J., Debelle, F., and Promé, J.C. (1996). *Rhizobium* lipochitooligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 503–535.
- Den Herder, G., De Keyser, A., De Rycke, R., Rombauts, S., Van de Velde, W., Clemente, M.R., Verplancke, C., Mergaert, P., Kondorosi, E., Holsters, M., and Goormachtig, S. (2008). Seven in absentia proteins affect plant growth and nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* **148**: 369–382.
- d'Erfurth, I., Cosson, V., Eschstruth, A., Lucas, H., Kondorosi, A., and Ratet, P. (2003). Efficient transposition of the Tnt1 tobacco retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J.* **34**: 95–106.
- Geldner, N., and Robatzek, S. (2008). Plant receptors go endosomal: A moving view on signal transduction. *Plant Physiol.* **147**: 1565–1574.
- Gimenez-Ibanez, S., Hann, D.R., Ntoukakis, V., Petutschnig, E., Lipka, V., and Rathjen, J.P. (2009). AvrPtoB targets the LysM receptor kinase CERK1 to promote bacterial virulence on plants. *Curr. Biol.* **19**: 423–429.
- Göhre, V., Spallek, T., Häweker, H., Mersmann, S., Mentzel, T., Boller, T., de Torres, M., Mansfield, J.W., and Robatzek, S. (2008). Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Curr. Biol.* **18**: 1824–1832.
- Graham, P.H., and Vance, C.P. (2003). Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* **131**: 872–877.
- Gu, T., Mazzurco, M., Sulaman, W., Matias, D.D., and Goring, D.R. (1998). Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the S-locus receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 382–387.
- He, J., Benedito, V.A., Wang, M., Murray, J.D., Zhao, P.X., Tang, Y., and Udvardi, M.K. (2009). The *Medicago truncatula* gene expression atlas web server. *BMC Bioinformatics* **10**: 441.
- Hirsch, S., Kim, J., Muñoz, A., Heckmann, A.B., Downie, J.A., and Oldroyd, G.E. (2009). GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **21**: 545–557.
- Karlowski, W.M., and Hirsch, A.M. (2003). The over-expression of an alfalfa RING-H2 gene induces pleiotropic effects on plant growth and development. *Plant Mol. Biol.* **52**: 121–133.
- Kim, M., Cho, H.S., Kim, D.M., Lee, J.H., and Pai, H.S. (2003). CHRK1, a chitinase-related receptor-like kinase, interacts with NtPUB4, an armadillo repeat protein, in tobacco. *Biochim. Biophys. Acta* **1651**: 50–59.
- Kiss, E., Oláh, B., Kaló, P., Morales, M., Heckmann, A.B., Borbala, A., Lózsa, A., Kontár, K., Middleton, P., Downie, J.A., Oldroyd, G.E., and Endre, G. (2009). LIN, a novel type of U-box/WD40 protein, controls early infection by rhizobia in legumes. *Plant Physiol.* **151**: 1239–1249.
- Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem. Soc. Trans.* **37**: 937–953.
- Larsson, C., Widell, S., and Kjellbom, B. (1987). Preparation of high-purity plasma membranes. *Methods Enzymol.* **148**: 558–568.
- Lefebvre, B., et al. (2010). A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 2343–2348.
- Le Signor, C., Savoies, V., Aubert, G., Verdier, J., Nicolas, M., Pagny, G., Moussy, F., Sanchez, M., Baker, D., Clarke, J., and Thompson, R. (2009). Optimizing TILLING populations for reverse genetics in *Medicago truncatula*. *Plant Biotechnol. J.* **7**: 430–441.
- Li, J., and Chory, J. (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* **90**: 929–938.
- Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemse, J., Bisseling, T., and Geurts, R. (2003). LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* **302**: 630–633.
- Limpens, E., Mirabella, R., Fedorova, E., Franken, C., Franssen, H., Bisseling, T., and Geurts, R. (2005). Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by *DMI2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 10375–10380.
- Madsen, E.B., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., and Stougaard, J. (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* **425**: 637–640.
- Marsh, J.F., Rakocevic, A., Mitra, R.M., Brocard, L., Sun, J., Eschstruth, A., Long, S.R., Schultze, M., Ratet, P., and Oldroyd, G.E. (2007). *Medicago truncatula* NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiol.* **144**: 324–335.

- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., and Batut, J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: How many rhizobium recipes? *Trends Microbiol.* **17**: 458–466.
- Maudoux, O., Batoko, H., Oecking, C., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Boutry, M., and Morsomme, P. (2000). A plant plasma membrane H⁺-ATPase expressed in yeast is activated by phosphorylation at its penultimate residue and binding of 14-3-3 regulatory proteins in the absence of fusicoccin. *J. Biol. Chem.* **275**: 17762–17770.
- Mitra, R.M., Shaw, S.L., and Long, S.R. (2004). Six nonnodulating plant mutants defective for Nod factor-induced transcriptional changes associated with the legume-rhizobia symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 10217–10222.
- Mudgil, Y., Shiu, S.H., Stone, S.L., Salt, J.N., and Goring, D.R. (2004). A large complement of the predicted Arabidopsis ARM repeat proteins are members of the U-box E3 ubiquitin ligase family. *Plant Physiol.* **134**: 59–66.
- Navarro-Gochicoa, M.T., Camut, S., Timmers, A.C., Niebel, A., Herve, C., Boutet, E., Bono, J.J., Imbert, A., and Cullimore, J.V. (2003). Characterization of four lectin-like receptor kinases expressed in roots of *Medicago truncatula*. Structure, location, regulation of expression, and potential role in the symbiosis with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* **133**: 1893–1910.
- Nishimura, R., Ohmori, M., Fujita, H., and Kawaguchi, M. (2002). A *Lotus* basic leucine zipper protein with a RING-finger motif negatively regulates the developmental program of nodulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 15206–15210.
- Oldroyd, G.E., and Downie, J.A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 519–546.
- Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Felle, H.H., Umehara, Y., Grønlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., and Stougaard, J. (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* **425**: 585–592.
- Roche, P., Debelle, F., Maillet, F., Lerouge, P., Faucher, C., Truchet, G., Dénarié, J., and Promé, J.C. (1991b). Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell* **67**: 1131–1143.
- Roche, P., Lerouge, P., Ponthus, C., and Promé, J.C. (1991a). Structural determination of bacterial nodulation factors involved in the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *J. Biol. Chem.* **266**: 10933–10940.
- Rogers, C., Wen, J., Chen, R., and Oldroyd, G. (2009). Deletion-based reverse genetics in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* **151**: 1077–1086.
- Samuel, M.A., Chong, Y.T., Haasen, K.E., Aldea-Brydges, M.G., Stone, S.L., and Goring, D.R. (2009). Cellular pathways regulating responses to compatible and self-incompatible pollen in *Brassica* and *Arabidopsis* stigmas intersect at Exo70A1, a putative component of the exocyst complex. *Plant Cell* **21**: 2655–2671.
- Samuel, M.A., Mudgil, Y., Salt, J.N., Delmas, F., Ramachandran, S., Chilelli, A., and Goring, D.R. (2008). Interactions between the S-domain receptor kinases and AtPUB-ARM E3 ubiquitin ligases suggest a conserved signaling pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **147**: 2084–2095.
- Sauviac, L., Niebel, A., Boisson-Dernier, A., Barker, D.G., and de Carvalho-Niebel, F. (2005). Transcript enrichment of Nod factor-elicited early nodulin genes in purified root hair fractions of the model legume *Medicago truncatula*. *J. Exp. Bot.* **56**: 2507–2513.
- Shimomura, K., Nomura, M., Tajima, S., and Kouchi, H. (2006). LjnsRING, a novel RING finger protein, is required for symbiotic interactions between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol.* **47**: 1572–1581.
- Smalle, J., and Vierstra, R.D. (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 555–590.
- Smit, P., Limpens, E., Geurts, R., Fedorova, E., Dolgikh, E., Gough, C., and Bisseling, T. (2007). *Medicago* LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. *Plant Physiol.* **145**: 183–191.
- Stone, S.L., Anderson, E.M., Mullen, R.T., and Goring, D.R. (2003). ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible *Brassica* pollen. *Plant Cell* **15**: 885–898.
- Stone, S.L., Arnoldo, M., and Goring, D.R. (1999). A breakdown of *Brassica* self-incompatibility in ARC1 antisense transgenic plants. *Science* **286**: 1729–1731.
- Tadege, M., Wen, J., He, J., Tu, H., Kwak, Y., Eschstruth, A., Cayrel, A., Endre, G., Zhao, P.X., Chabaud, M., Ratet, P., and Mysore, K. S. (2008). Large-scale insertional mutagenesis using the Tnt1 retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J.* **54**: 335–347.
- Trujillo, M., Ichimura, K., Casais, C., and Shirasu, K. (2008). Negative regulation of PAMP-triggered immunity by an E3 ubiquitin ligase triplet in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **18**: 1396–1401.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., and Baulcombe, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* **33**: 949–956.
- Wang, Y.S., Pi, L.Y., Chen, X., Chakrabarty, P.K., Jiang, J., De Leon, A.L., Liu, G.Z., Li, L., Benny, U., Oard, J., Ronald, P.C., and Song, W.Y. (2006). Rice XA21 binding protein 3 is a ubiquitin ligase required for full Xa21-mediated disease resistance. *Plant Cell* **18**: 3635–3646.
- Xiang, T., Zong, N., Zou, Y., Wu, Y., Zhang, J., Xing, W., Li, Y., Tang, X., Zhu, L., Chai, J., and Zhou, J.M. (2008). *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Curr. Biol.* **18**: 74–80.
- Yang, C.W., González-Lamothe, R., Ewan, R.A., Rowland, O., Yoshioka, H., Shenton, M., Ye, H., O'Donnell, E., Jones, J.D., and Sadanandom, A. (2006). The E3 ubiquitin ligase activity of *Arabidopsis* PLANT U-BOX17 and its functional tobacco homolog ACRE276 are required for cell death and defense. *Plant Cell* **18**: 1084–1098.
- Yano, K., et al. (2009). CERBERUS, a novel U-box protein containing WD-40 repeats, is required for formation of the infection thread and nodule development in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Plant J.* **60**: 168–180.
- Yee, D., and Goring, D.R. (2009). The diversity of plant U-box E3 ubiquitin ligases: From upstream activators to downstream target substrates. *J. Exp. Bot.* **60**: 1109–1121.
- Zeng, L.R., Qu, S., Bordeos, A., Yang, C., Baraoidan, M., Yan, H., Xie, Q., Nahm, B.H., Leung, H., and Wang, G.L. (2004). *Spotted leaf11*, a negative regulator of plant cell death and defense, encodes a U-box/armadillo repeat protein endowed with E3 ubiquitin ligase activity. *Plant Cell* **16**: 2795–2808.

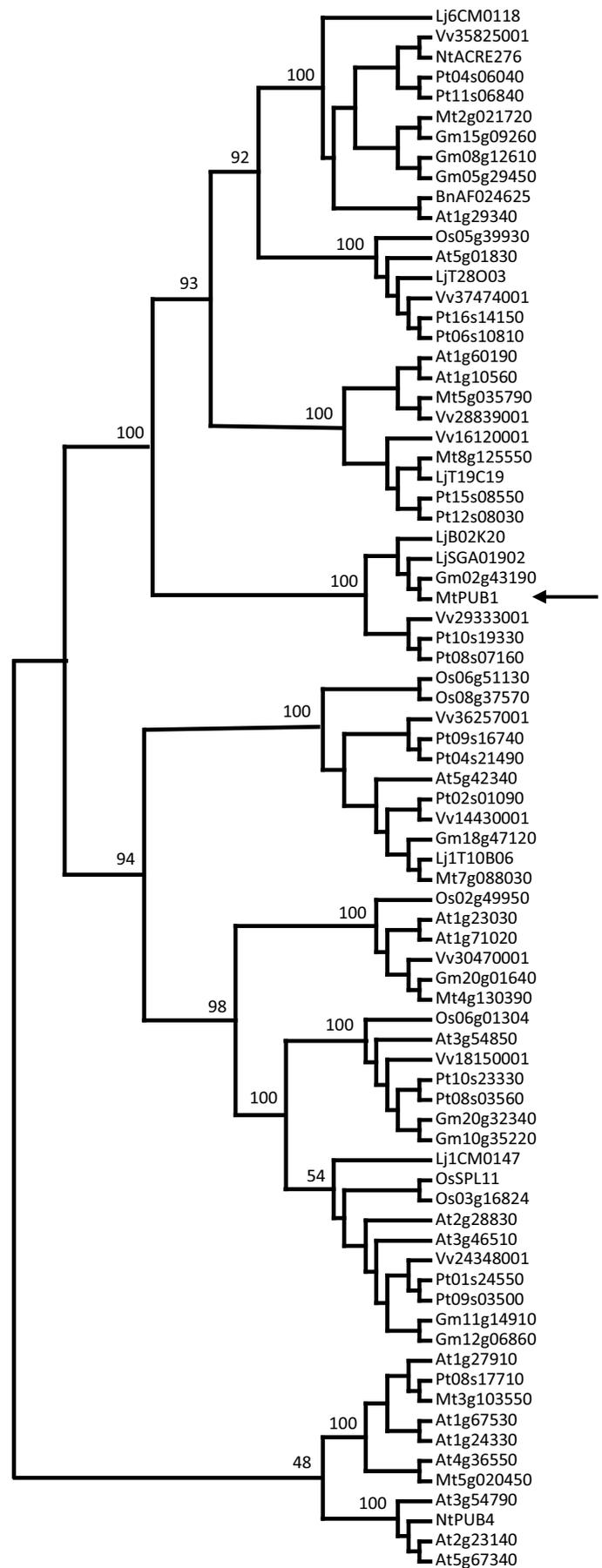


Supplemental Figure 1. Annotated alignment of PUB1 with Closely Related Proteins. Putative Mt PUB1 orthologues from *Lotus japonicus* (Lj), *Glycine max* (Gm), *Populus trichocarpa* (Pt) and *Vitis vinifera* (Vv) and ARC1 from *Brassica napus* (Bn) were used for the alignment. The position of the UND, U-Box and ARM repeats are shown. Similar alignments (Supplemental Datasets 1 and 2) were used to generate Supplemental Figures 4 and 5 and the alignments were trimmed between the arrows before phylogenetic analyses.



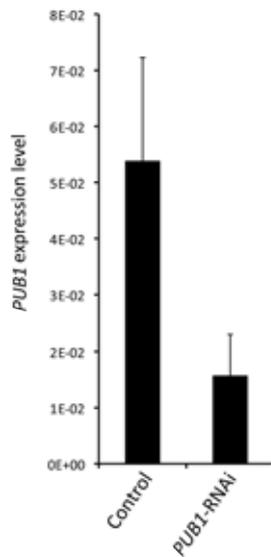
Supplemental Figure 2. Interaction of PUB1 with LYK3 in *N. benthamiana*.

PUB1 interacts preferentially with LYK3 rather than BRI1 or LRRII.1 in *N. benthamiana*. PUB1 Δ ARM interacts less than PUB1 with LYK3. The expression level of each receptor was tested by fusion to full length YFP (left panels). BiFC experiments were performed by co-expression of the indicated split-YFP pair combinations: Yn = N-terminal domain of YFP; Yc = C-terminal domain of YFP (right panels). Leaves were imaged by epi-fluorescence using identical exposure settings. Identical post-treatment parameters were applied to all images. Bars represent 200 μ m.



Supplemental Figure 5. Phylogenetic Analysis of Higher-Plant UND-PUB-ARM Proteins.

Phylogenetic relationships between PUB1 and other plant UND-PUB-ARM proteins illustrating clustering of related proteins. Proteins from the following species were used: *A. thaliana* (At), *B. napus* (Bn), *G. max* (Gm), *L. japonicus* (Lj), *M. truncatula* (Mt), *Nicotiana tabacum* (Nt), *O. sativa* (Os), *P. trichocarpa* (Pt) and *V. vinifera* (Vv). Analyses were made on whole protein alignments (Supplemental Dataset 2) using a neighbor-joining method with 1000 bootstrap replicates (shown as percentages on the major clusters). Mt PUB1 is arrowed.



Supplemental Figure 6. *PUB1*-RNAi Construct Efficiency.

The *PUB1*-RNAi construct efficiently down-regulates *PUB1* gene expression. *PUB1* mRNA quantification was determined after 8 h of NF treatment of *lyk3-4* roots transformed with the *PUB1*-RNAi construct or the vector control. Roots from 17 control and 18 *PUB1*-RNAi plants were tested. *PUB1* mRNA quantification was normalized against two reference genes in each sample tested (relative units). The standard deviation between samples is represented.

Gene	Mitr24021720		Mitr48126550		Mitr54035799		Mitr44130390		Mitr43103550		Mitr55020450		Mitr70808030		Mitr26500151		MIPUB1 Induction Ratio : All to Root Odpi
	Mitr39500151	Mitr5477151	Mitr41031151	Mitr3951151	Mitr3951151	Mitr40909151	Mitr42699151	Mitr35532151	Mitr42699151	Mitr35532151	Mitr55532151	Mitr35532151	No probe	No probe	Mitr26500151	PUB1	
Cell Suspension-MeJA (24h)	1329.00	1373.50	14.50	51.50	892.50	169.00	702.50	14.50	16.50	0.44							
Cell Suspension-MeJA control (24h)	1066.00	963.50	12.00	33.00	422.00	232.00	562.50	16.50	0.50								
Cell Suspension-MeJA (2h)	1174.50	1196.00	13.00	43.00	1013.50	235.00	327.50	15.50	0.47								
Cell Suspension-MeJA control (2h)	1073.50	862.00	12.50	46.00	434.50	344.50	468.00	16.50	0.50								
Cell Suspension-TE control (0h)	946.50	1015.50	23.00	30.00	436.00	365.50	945.50	13.50	0.47								
Cell Suspension-TE (24h)	1149.00	1149.00	11.00	22.00	336.50	366.00	945.00	16.00	0.48								
Cell Suspension-TE control (24h)	1066.00	1386.50	13.00	39.50	351.50	321.00	1237.00	16.50	0.53								
Cell Suspension-TE (2h)	1398.50	146.00	13.00	53.00	439.00	293.00	1630.00	16.50	0.46								
Flower	366.07	414.50	17.33	35.00	439.00	703.67	714.33	13.33	0.37								
Leaf 2HA-1wk BE	144.00	328.67	36.00	20.67	391.67	262.33	764.67	13.67	0.41								
Leaf 2HA-1wk BE+AA	1149.77	329.67	14.67	69.67	606.67	736.33	1414.67	13.67	0.41								
Leaf 2HA-2wk BE+AA+BA	1209.00	507.33	15.00	146.00	1146.00	209.00	346.67	26.67	0.80								
Leaf 2HA-2wk BE+AA+BA+BP	1069.67	507.33	13.67	195.67	1146.00	419.67	346.67	26.67	0.52								
Leaf 2HA-2wk BE+AA+BA+BP	1030.00	267.33	14.00	120.67	1033.33	339.33	207.33	19.33	0.58								
Nodule-10dpi (mature nodules)	1072.00	544.33	19.00	220.67	1545.33	189.33	105.67	157.67	4.73								
Nodule-10dpi (immature nodules)	990.67	469.67	24.00	465.33	862.67	195.67	102.00	196.33	5.89								
Nodule-16dpi (fixing nodule)	1431.00	671.67	30.00	427.33	1011.33	135.00	130.67	63.00	1.59								
Nodule-28dpi (2d after N ₂ treatment)	774.00	656.33	35.00	364.67	921.33	197.67	49.33	199.67	5.66								
Nodule-4dpi (bumps)	1213.33	639.67	25.33	193.33	1476.33	320.33	150.33	73.00	2.19								
Petiole	471.67	399.67	126.33	28.00	542.67	523.33	330.67	14.67	0.44								
Pod	270.33	203.67	16.33	16.33	656.00	786.33	13.33	15.67	0.47								
Root	652.67	490.00	20.67	79.00	1142.00	270.00	206.67	17.00	0.51								
Root-0dpi (nodule control)	833.33	256.33	14.00	53.33	2027.33	262.33	87.33	33.33	1.00								
Root (1cm adjacent from tip)	962.67	316.67	19.33	31.00	1626.00	192.67	87.33	28.67	0.86								
Root-0h (200mM NaCl)	701.00	635.00	13.00	29.00	755.00	133.00	285.00	15.00	0.45								
Root-10h (200mM NaCl)	1168.00	1198.00	528.00	1067.00	654.00	161.00	178.00	18.00	0.54								
Root-1h (200mM NaCl)	1200.00	1089.00	1140.00	1067.00	616.00	123.00	173.00	19.00	0.57								
Root-24h (200mM NaCl)	1335.00	1241.00	1106.00	1277.00	669.00	82.00	208.00	16.00	0.48								
Root-2h (200mM NaCl)	1107.00	1066.00	334.00	775.00	852.00	97.00	304.00	15.00	0.45								
Root-5h (200mM NaCl)	1273.00	1273.00	156.00	531.00	856.00	67.00	382.00	16.00	0.48								
Root (3mm tip)	569.67	256.33	13.00	63.67	2409.67	445.33	15.00	16.00	0.48								
Split root: limited NH4	1233.00	659.00	76.00	189.00	1285.50	428.00	283.00	19.50	0.59								
Split root: limited NO3	905.50	494.50	24.50	134.50	1383.50	438.00	212.00	25.00	0.75								
Split root: no NO3	999.00	662.50	42.00	112.00	1191.50	413.50	459.50	30.00	0.90								
Split root: sufficient NH4	1402.00	664.50	63.00	212.50	1263.00	448.00	161.00	18.00	0.54								
Split root: sufficient NO3	1345.00	733.50	28.50	101.00	1179.50	394.50	211.00	16.00	0.48								
Root-0h Phymatotrichum	729.33	519.33	13.67	24.67	929.67	165.67	438.67	12.33	0.37								
Root-72h Phymatotrichum	831.00	626.67	14.33	31.67	693.67	142.33	631.67	12.33	0.37								
Root-96h Phymatotrichum	1718.67	1330.00	14.67	171.67	596.33	108.67	474.00	13.67	0.41								
Root-denodulated	1163.67	961.67	349.67	632.33	1280.00	291.67	419.67	122.00	3.66								
Root-non-mycorrhizal	851.67	619.67	365.00	633.67	977.00	210.33	528.67	35.33	1.06								
Root-mycorrhizal	927.67	611.33	41.00	800.00	925.00	213.67	488.00	85.67	2.57								
Split root (nodulating): limited N2	756.50	476.00	41.00	105.00	378.50	378.50	223.50	32.50	0.98								
Split root (nodulating): sufficient N2	1260.50	883.50	89.00	150.00	763.50	178.50	188.00	21.50	0.65								
Hairy Root-GUS (TT2 control)	765.50	594.00	76.50	177.00	939.00	337.50	337.50	13.00	0.39								
Hairy Root-TT2	637.50	477.50	71.50	175.00	850.50	264.50	264.50	13.00	0.39								
Seed: 10dap-late embryogenesis (heart stage)	156.67	61.00	12.67	18.33	664.33	660.00	11.00	10.00	0.45								
Seed: 12dap-transition phase	181.00	56.00	12.00	17.00	664.00	488.00	10.00	14.67	0.44								
Seed: 16dap-seed filling	239.33	113.33	13.33	22.67	277.00	315.67	12.33	15.00	0.45								
Seed: 20dap-seed filling	356.00	113.00	15.67	21.00	277.00	315.67	12.33	14.33	0.43								
Seed: 24dap seed filling	398.33	129.33	16.67	14.33	232.67	313.67	11.00	14.00	0.50								
Seed: 36dap-physiological maturity	662.00	263.67	186.00	24.33	211.67	359.67	16.00	16.67	0.48								
Seed coat (16-24dap)	181.67	81.33	121.00	119.00	426.00	501.00	9.67	13.33	0.40								
Transg. Seed: 20-22dap (mannan synthase)	264.00	258.33	23.67	257.33	220.67	395.33	15.33	15.33	0.46								
Transg. Seed: 20-22dap (empty vector control)	495.67	421.00	104.00	706.67	278.00	406.00	9.00	15.67	0.47								
Shoot (split-root exp)-limited N2	723.50	513.50	52.50	69.00	341.00	552.50	15.00	15.00	0.45								
Shoot (split-root exp)-limited NH4	749.50	556.50	130.50	130.50	473.50	473.50	591.00	14.00	0.47								
Shoot (split-root exp)-limited NO3	708.00	569.00	443.50	121.00	425.50	580.50	554.00	14.00	0.42								
Shoot (split-root exp)-sufficient N2	739.50	560.00	113.00	113.00	370.00	472.50	554.00	15.50	0.47								
Shoot (split-root exp)-sufficient NH4	611.50	410.50	103.00	80.50	513.50	494.00	348.50	15.00	0.45								
Shoot (split-root exp)-sufficient NO3	499.50	377.50	72.00	57.50	493.50	568.00	387.00	17.00	0.51								
Stem	510.00	438.67	388.33	67.67	712.33	622.00	41.33	14.67	0.44								
Vegetative Bud	376.33	267.00	86.33	31.00	574.67	512.00	29.00	14.67	0.44								
Minimum	156.67	56.00	11.00	14.33	211.67	67.00	9.00	12.33	0.37								
Maximum	1718.67	1585.00	1140.00	1277.00	2409.67	792.67	1237.00	196.33	5.89								

Supplemental Dataset 3. Expression Pattern of the *M. truncatula* UND-PUB-ARM family based on *M. truncatula* Gene Expression AtlasData were extracted from *M. truncatula* Gene Expression Atlas (<http://bioinfo.noble.org/gene-atlas/v2/>).

PUB1 Induction Ratio was calculated relative to expression in the Root Odpi condition.

Supplemental Table 1. Primers used in this study

Constructs	Primers		Destination vectors	Restrictions (5' and 3')
	Forward	Reverse		
proPUB1 (Restriction)	GCAGAGGATCGGGGTCCA	TCCCCCGGGTTTGTGATTAGTGTGACAAAATTAGATTACT CT	pBI101	BamHI - SmaI
RNAI PUB1 (Gateway)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTATGAAT GATCCTAGATCAAAGATGATGATATCTCC	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGCTTTGGATTG TTTATGCAAAAGATCAACTTGCT	pK7GWVG(II) + ubq10::DsRED1	
LYK3-IR for Y2H screen (Restriction, Stop codon)	GAATTCGGTTATAGACACAAGTCAATT	AAACTGCAGTCATCTAGTTGACAAACAGATTATGAG	pGB (Y2H bait)	EcoRI - PstI
LYK3-IR (Gateway, No Stop codon)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGAAA TACTTCCAAAAGAAAGAAAGAGAAAAC	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCTAGTTG ACAACAGATTTATGAGAGATTGATTTTC	PGB GW (Y2H bait)	
BR11-IR (Gateway, No Stop codon)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGAGA GAGATGAGGAAGAGACGGGAAAGAAAAG	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAAATTTTCC TTCAGGAACCTCTTTTATACTCATATCA	PGB GW (Y2H bait)	
LRRII.1-IR (Gateway, No Stop codon)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGAGA CACCATCAAAAAGATCAGACACAAAAGT	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTATCTTGGCTCT GAAAAGTTGTATAGCTTC	PGB GW (Y2H bait)	
LYK2-IR (Gateway, No Stop codon)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGAGA TACTTCAAAAAGAAAGAAAGAGAAAAC	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCTCACTG ACAAGAGATTTATGATAGTTTGAATTTCA	PGB GW (Y2H bait)	
LYK4-IR (Gateway, No Stop codon)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGAGA TACTTTCGCAAGAAAGATGGAGAAGAT	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTATTTGAATC ATGCTCCACATCAAGACTCA	PGB GW (Y2H bait)	
NFP-IR (Gateway, No Stop codon)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGAGA TACTTTCGCAAGAAAGATGGAGAAGAT	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTACGAGCTA TTACAGAAAGTAAACAACATGAGTAGCT	PGB GW (Y2H bait)	
PUB1 (Gateway, No Stop codon)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTATGAAT GATCCTAGATCAAAGATGATGATATCTCC	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAAAGAAT GATGAGGTTGAGAACAAACACC	pAMpAT35S-Yn-GW, pAMpAT35S-3HA-GW	
3HA-PUB1 (Restriction, Stop codon)	GCTTACCATGGGGTACCCA (PCR on pAMPAT35S-3HA-PUB1)	TCCCCCGGGTCAAAAAGATGATGAGGTTGAGAACA	pGREEN35S	NcoI - SstI
BR1 (Gateway, No Stop codon)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGAAG ACTTTTTCAAGCTTCTTCTCTCTGTAAAC	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAAATTTTCC TTCAGGAACCTCTTTTATACTCATATCA	pAMpAT35S-GW-YFP, pAMpAT35S-GW-Yc	
PUB1 (Gateway, Stop codon)	Recovered from the Y2H screen	Recovered from the Y2H screen	PGAD GW (Y2H prey), pGEX GW (GST fusion)	
PUB1ΔUND (Gateway, Stop codon)	Recovered from the Y2H screen	Recovered from the Y2H screen	PGAD GW (Y2H prey), pGEX GW (GST fusion)	
PUB1ΔUNDΔU-Box (Gateway, Stop codon)	Recovered from the Y2H screen	Recovered from the Y2H screen	PGAD GW (Y2H prey)	
PUB1ΔARM (Gateway, No Stop codon)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTATGAAT GATCCTAGATCAAAGATGATGATATCTCC	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAGCATTCT CATTCTTGTGCCTTTTGCCT	PGAD GW (Y2H prey), pAMpAT35S-Yn-GW	
PUB1 (Restriction, Stop codon)	ATTCCAGCTCAATGAATGATCCTCTAGATCAAAGATGA	GCAGGTCGACTCACAAGAATGATGAGGTTGAGA	pMAL (MBP fusion)	SstI - Sall
PUB1ΔUND (Restriction, Stop codon)	ATTCCAGCTCAAGTAAAAACATGATAATGATGATTTCT TCT	GCAGGTCGACTCACAAGAATGATGAGGTTGAGA	pMAL (MBP fusion)	SstI - Sall

Supplemental Methods

Phylogenetic and Protein Sequence Analyses

The *Medicago truncatula* EST data base (Journet et al., 2002) and the *Medicago truncatula* Gene Index (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=medicago>) were used to access cDNAs. The *A. thaliana* UND-PUB-ARM protein sequences were obtained from the TAIR database (<http://www.arabidopsis.org/>) using the accessions given in Mudgil et al. (2004). The *M. truncatula* proteins were obtained from the *M. truncatula* genome sequence database release 3.0 using either BLASTP with default values or by using the REMORA server (Carrere and Gouzy, 2006; Courcelle et al., 2008) and the following workflow: BLASTP using the U-Box of PUB1 (E-value = 10), followed by BLASTP on the protein subset using the PUB1 ARM repeat 3 (E-value = 0.001), see Supplemental Figure 1 for the sequences used. The following sequences were obtained from the NCBI database using the following accessions: ARC1 (AAB97738), ACRE276 (AAP03882), PUB4 (AAO61490), SPL11 (AAT94161). Other plant sequences were obtained by BLASTP using the protein sequence of PUB1 and the *L. japonicus* genome database (<http://www.kazusa.or.jp/lotus/index.html>) or Phytozome V5.0 (<http://www.phytozome.net/>). Protein alignments used CLUSTALX (Thompson et al., 1997) and minor adjustments were made either to improve the alignments or to delete the N-terminal and C-terminal extensions using GeneDoc (Nicholas et al., 1997). Phylogenetic analyses were then performed on the alignments using the PHYLIP package of programs (Felsenstein, 1989) on the Pasteur Institute Server (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/phylogeny/>), using default parameters unless otherwise stated. PROTDIST with 1000 bootstrap analyses was used to calculate the distance between the sequences before analysis with the neighbor-joining program NEIGHBOR and calculation of the consensus tree using CONSENSE. Trees were viewed and edited using TREEVIEW (Page, 1996).

Protein domains were identified with the PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) and SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) databases. Protein topology prediction used TMHMM at the Expasy server (<http://www.expasy.ch/>).

Supplemental References

- Carrere, S., and Gouzy, J.** (2006). REMORA: a pilot in the ocean of BioMoby web-services. *Bioinformatics* **22**: 900-901.
- Courcelle, E., Beausse, Y., Letort, S., Stahl, O., Fremez, R., Ngom-Bru, C., Gouzy, J., and Faraut, T.** (2008). Narcisse: a mirror view of conserved synteny. *Nucleic Acids Res.* **36**: 485-490.
- Felsenstein, J.** (1989). PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**: 164-166.
- Journet, E.P., van Tuinen, D., Gouzy, J., Crespeau, H., Carreau, V., Farmer, M.J., Niebel, A., Schiex, T., Jaillon, O., Chatagnier, O., Godiard, L., Micheli, F., Kahn, D., Gianinazzi-Pearson, V., and Gamas, P.** (2002). Exploring root symbiotic programs in the model legume *Medicago truncatula* using EST analysis. *Nucleic Acids Res.* **30**: 5579-5592.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B.Jr., and Deerfield, D.W.** (1997). GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEW.NEWS* **4**: 14.
- Page, R.D.M.** (1996). TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* **12**: 357-358.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G.** (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876-4882.

DISCUSSION

I) MtPUB1, un régulateur négatif dans l'établissement de la symbiose fixatrice d'azote

Le criblage d'une banque d'ADNc de poils absorbants préalablement élicités aux NFs contre la région cytosolique de LYK3 par le système double hybride GAL4 chez la levure a permis l'identification du gène *MtPUB1*, codant une E3 ubiquitine ligase de la famille des protéines à domaine U-Box. L'induction de *MtPUB1* par les NFs et son profil d'expression durant la symbiose fixatrice d'azote suggèrent que *MtPUB1* remplit une fonction symbiotique, soulevant alors la question de savoir quel rôle il joue dans cette symbiose. Pour y répondre, les phénotypes de nodulation de racines surexprimant MtPUB1 ou sous-réglées spécifiquement dans l'expression de *MtPUB1* par ARN interférent (RNAi) ont été déterminés. Les résultats obtenus dans les deux cas font état d'un rôle négatif pour *MtPUB1* dans l'établissement de la symbiose fixatrice d'azote.

1) Une régulation nouvelle

L'établissement de la symbiose rhizobium-légumineuse est un processus étroitement contrôlé par l'hôte végétal et plusieurs voies régulent négativement la nodulation de manière à optimiser le ratio entre le bénéfice tiré de l'interaction et son coût énergétique (Magori and Kawaguchi, 2009). Plusieurs gènes jouant un rôle négatif dans la nodulation ont été identifiées chez les légumineuses. Leur absence ou l'altération de leurs fonctions par mutagenèse se traduit, après inoculation, par une augmentation du nombre de nodules formés. Ainsi chez *M. truncatula*, le gène *SUNN* (*Super Numeric Nodules*) code un LRR-RLK impliqué dans l'autorégulation systémique du nombre de nodules ou AON (*Autoregulation Of Nodulation*) (Penmetsa et al., 2003; Schnabel et al., 2005). Le gène *MtSKL1* (*SICKLE*) code une protéine impliquée dans la perception de l'éthylène, hormone régulant négativement la symbiose fixatrice d'azote (Penmetsa et al., 2008). Enfin, le gène *EFD* (*Ethylene-response Factor required for nodule Differentiation*) code un facteur de transcription de la famille des ERF impliqué dans une régulation négative de la voie des cytokinines (Vernie et al., 2008).

A la différence de ces régulateurs négatifs dont les phénotypes des mutants perte de fonction sont observables après inoculation avec une souche sauvage de rhizobia, l'augmentation du nombre de nodules chez les plantes RNAi *MtPUB1* est corrélé à la qualité des NFs produits par les bactéries. Un phénotype inverse est observé après sous-régulation du gène *LYK3* par RNAi

(Limpens et al., 2003). Ces données phénotypiques suggèrent donc que les fonctions de LYK3 et de MtPUB1 dans la symbiose sont antagonistes et dépendantes de la structure NFs. De plus, la sous-régulation de *MtPUB1* par RNAi dans un fond génétique *lyk3-4* supprime partiellement la l'incapacité à noduler de ce mutant par une amélioration du processus d'infection. Cette dernière donnée lie génétiquement les fonctions des gènes *MtPUB1* et *LYK3* dans l'établissement de l'infection. Ensemble, ces résultats suggèrent que MtPUB1 définit un nouveau mécanisme de régulation négative de la symbiose.

En condition sauvage de nodulation, l'absence de phénotype des plantes RNAi *MtPUB1* pourrait être expliqué par le fait que d'autres mécanismes régulateurs prévalent. Par exemple, l'autorégulation systémique du nombre de nodules par *SUNN* empêcherait de dépasser le nombre maximal de nodules. Seules des conditions non optimales de nodulation n'activant pas ce type de mécanisme permettrait alors de révéler le rôle négatif de *MtPUB1*. Deux autres hypothèses peuvent aussi expliquer cette observation : (i) l'efficacité de la construction RNAi *MtPUB1* par n'étant pas totale, évaluée à 70% en moyenne (**Article – Figure Supp. 6**), il n'est pas exclu que les 30% de transcrits restants produisent un niveau de protéine suffisant pour assurer le rôle négatif de MtPUB1 en présence de rhizobia sauvage. L'étude du phénotype d'un mutant nul pour le gène *MtPUB1* permettrait de conclure sur ce point. (ii) : Une complémentation fonctionnelle partielle par un homologue de *MtPUB1* pourrait aussi expliquer cette observation. En effet, bien que seul *MtPUB1* possède un profil d'expression symbiotique, plusieurs autres UND-PUB-ARM sont exprimées à des niveaux supérieurs à *MtPUB1* dans les racines et les nodules (**Article – Tableau Supp. 1**). Cette dernière hypothèse est toutefois peu compatible avec le fait qu'aucun homologue de MtPUB1 n'ait été retrouvé durant le criblage double hybride. De plus, l'obtention d'un phénotype après extinction spécifique de *MtPUB1* suggère un rôle unique dans la symbiose pour ce gène en comparaison des autres membres de la famille. Le clonage de ces homologues pourrait cependant être envisagé afin de tester par double hybride la possibilité d'interactions avec le domaine cytosolique de LYK3.

2) Phylogénie et similarités chez les légumineuses

Il a été dénombré à ce jour chez *M. truncatula* six autres protéines possédant la même organisation en domaines que MtPUB1 (cette étude). En comparaison, le génome de la plante modèle *A. thaliana* possède une famille plus large avec 17 membres identifiés (Mudgil et al.,

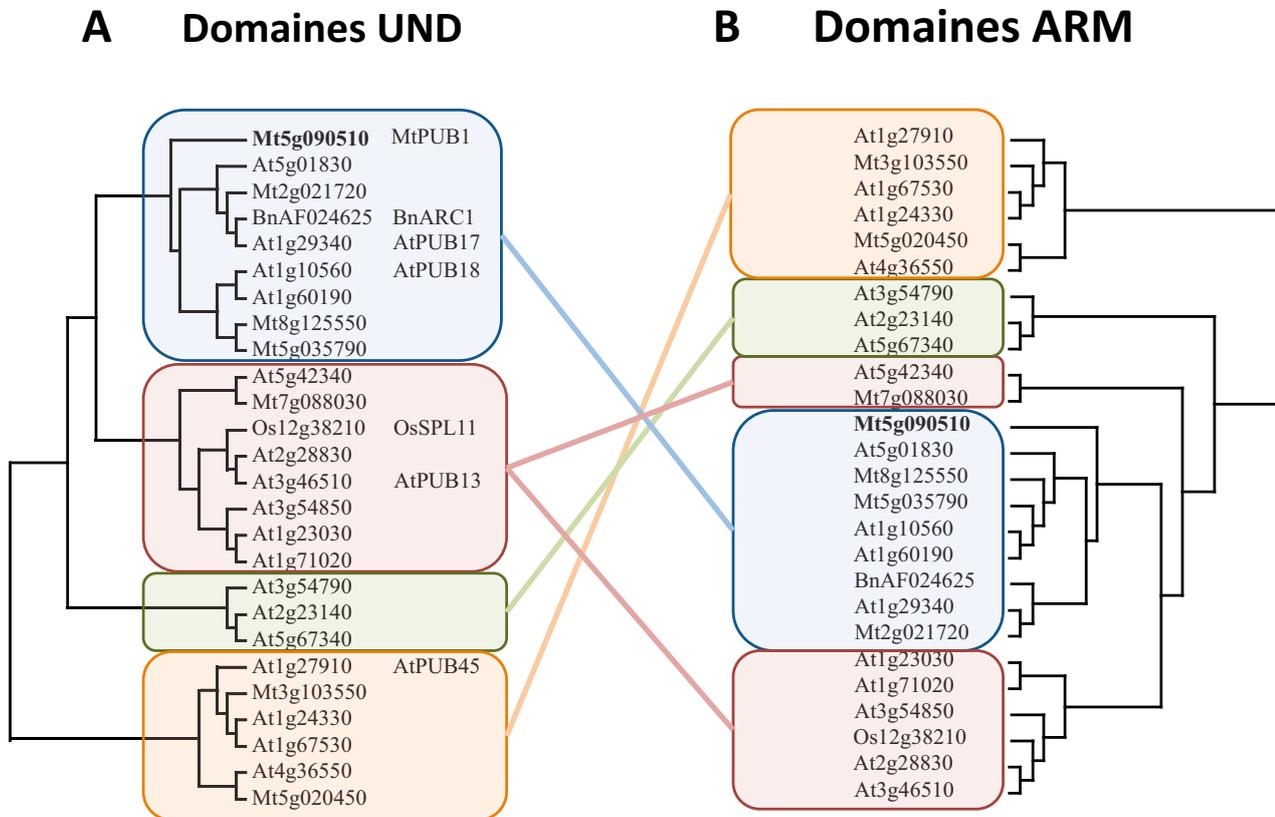


Figure 40. Analyses phylogénétiques incluant les protéines UND-PUB-ARM d'*A. thaliana* et de *M. truncatula*, BnARC1 et OsSPL11, en fonction du domaine utilisé

(A) Analyse phylogénétique effectuée avec les séquences des domaines N-terminaux UND. (B) Analyse phylogénétique effectuée avec les séquences des domaines C-terminaux ARM. Les quatre grands groupes définis en (A) sont retrouvés en (B), un seul changement étant observé pour le second groupe.

2004). Cependant, le génome de *M. truncatula* n'étant pas complètement séquencé, il est possible que cette plante modèle possède une famille plus grande de protéines UND-PUB-ARM.

La comparaison des arbres phylogénétiques construits à partir des séquences des domaines U-Box et UND des 17 UND-PUB-ARM d'*A. thaliana* ont relevé des différences importantes, suggérant une acquisition indépendante du domaine UND à de multiples reprises durant l'évolution de cette famille (Mudgil et al., 2004). Une analyse phylogénétique incluant ces 17 protéines d'*A. thaliana*, les sept membres de *M. truncatula*, OsSPL11, BnARC1, NtPUB4 et NtACRE276 nous a amené à une conclusion différente. En effet, aucune différence majeure n'a pu être relevée entre analyses phylogénétiques faites avec les sous-domaines N-terminaux (UND) et C-terminaux (ARM) séparés (**Figure 40**). Ce résultat suggère donc une évolution monophylétique pour ce groupe de protéines. Cette différence entre l'analyse faite par Mudgil et al. (2004) et celle effectuée dans le cadre de ma thèse pourrait s'expliquer par le fait que les auteurs ont utilisé la séquence du domaine U-Box, courte et très conservée, et une méthode de comparaison des séquences différente.

Les protéines UND-PUB-ARM de *M. truncatula* possèdent toutes un homologue proche chez *A. thaliana*, à l'exception remarquable de MtPUB1 (**Article – Figure Supp. 4**). Il est tentant d'interpréter ce résultat comme la conséquence d'une spécialisation de la fonction de MtPUB1 dans la symbiose. En effet, MtPUB1 est issue de la seule légumineuse incluse dans cette analyse. Élargie à d'autres organismes modèles, une seconde analyse phylogénétique a permis d'identifier un sous groupe de protéines UND-PUB-ARM proches de MtPUB1 et appartenant à *L. japonicus* (2 gènes) et *G. max* (1 gène) (**Article – Figure Supp. 5**). Les gènes correspondants constituent donc de bons candidats comme orthologues putatifs de *MtPUB1*, pouvant alors remplir la fonction de MtPUB1 chez ces deux légumineuses. Certaines données récentes tendent à soutenir cette hypothèse. En effet, il a récemment été montré chez *L. japonicus* que le récepteur symbiotique LjNFR1, orthologue putatif de LYK3, interagit avec une E3 ubiquitine ligase de la famille des U-Box. De plus, cette protéine régule aussi négativement la symbiose fixatrice d'azote (J. Stougaard, communication personnelle). L'identité de cette protéine n'est pas encore connue, mais d'après les similarités de fonction avec MtPUB1, il est raisonnable de penser qu'il s'agit de l'un des deux orthologues putatifs de MtPUB1 identifiés chez cette espèce. Chez *G. max*, des données d'expression indiquent que l'orthologue putatif de *MtPUB1* est induit de manière précoce et transitoire dans les poils absorbants après inoculation avec *B. japonicum* (Libault et al., 2010) (**Figure 41**). Il est par conséquent possible que cette protéine remplisse une fonction similaire à MtPUB1 chez *G. max*. Le type de régulation négative de la symbiose défini par *MtPUB1* serait alors une propriété partagée avec les légumineuses formant des nodules déterminés.

3) Relations entre voie d'organogenèse et voie d'infection

Les études de l'expression de *MtPUB1* ont montré que ce gène possède un profil d'expression tissulaire associé à la préparation de l'infection durant la symbiose (**Article – Figure 5**). Les NFs sont capables d'induire son expression et cette induction dépend de la voie de signalisation activée par NFP et relayée par DMI2 et DMI3 (**Article – Figure 4**).

Très récemment, des travaux utilisant des mutants de nodulation chez *L. japonicus* et son symbiote *Mesorhizobium loti* sont parvenus à déterminer la participation de nombreux gènes symbiotiques situés en aval des récepteurs LjNFR5/LjNFR1 dans les processus d'infection et/ou d'organogenèse. De manière intéressante, les auteurs ont aussi montré que la voie menant à l'organogenèse exerce un contrôle positif sur le processus d'infection, cette interférence se situant au niveau de *LjCCamK* (*DMI3*) (Madsen et al., 2010). Toutefois, ces études génétiques n'ont pas déterminé si ce contrôle s'effectue directement par la protéine LjCCamK ou indirectement par l'induction des gènes. Chez *M. truncatula*, bien que le modèle de perception de NFs par les récepteurs NFP et LYK3 soit différent de chez *L. japonicus*, il peut être établi un parallèle où la voie de signalisation *NFP/DMI/NSP*-dépendante correspondrait à la voie d'organogenèse LjNFR/LjSYMRK./LjCASTOR/LjPOLLUX/LjCCamK/LjNSP de *L. japonicus*. La voie d'entrée *LYK3*-dépendante correspondrait alors à celle d'infection chez *L. japonicus*. Compte tenu du rôle symbiotique négatif de *MtPUB1*, cela suggère que la voie de signalisation (ou d'organogenèse) peut contrôler négativement la voie d'infection ou d'entrée *LYK3*-dépendante, via une régulation positive de l'expression de *MtPUB1*. Cette donnée s'ajoute aux études génétiques effectuées chez *L. japonicus*, démontrant les connexions étroites entre voie de signalisation (organogenèse) et voie d'infection.

En plus des protéines DMI, les facteurs de transcription NSP1 et NSP2 sont aussi impliqués dans l'expression des gènes symbiotiques après activation de la voie de signalisation dépendante de NFP. Des expériences préliminaires de suivi de l'induction de *MtPUB1* par qRT-PCR chez le mutant *nsp1* ont montré que ce gène n'est pas requis pour l'induction de *MtPUB1* après application de NFs (**Figure 41**). Ce résultat est différent de ce qui a été observé pour le marqueur symbiotique *ENOD11*, dont l'induction par les NFs n'est pas totalement abolie chez le mutant *nsp1* mais réduite d'un facteur cent (Catoira et al., 2000). De manière surprenante, l'induction de *MtPUB1* chez *nsp1* après 6 heures de traitement aux NFs n'est pas réduite mais est supérieure à ce qui observé en condition sauvage (**Figure 41**). Cela suggère un contrôle fin de l'expression de *MtPUB1* où NSP1 pourrait jouer un rôle négatif. Les écarts observés entre

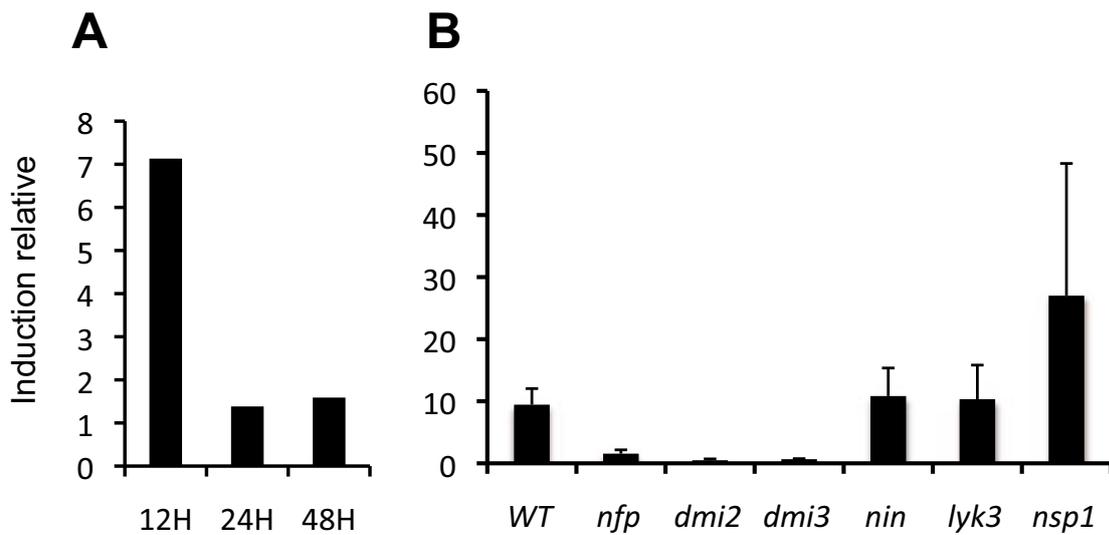


Figure 41. Ratios d'induction des gènes *Gm02g43190.1* et *MtPUB1* chez *G. max* et *M. truncatula*

(A) Induction relative du gène *Gm02g43190.1* chez le soja 12, 24 et 48 heures après inoculation avec le symbiote *Bradyrhizobium japonicum*. Données obtenues à partir (B) Induction relative du gène *MtPUB1* de *M. truncatula* après 6H de traitement aux NFs concentrés à 10^{-9} M chez la plante sauvage et les mutants *nfp*, *dmi2*, *dmi3*, *nin*, *lyk3*, et *nsp1*.

répétitions biologiques contraignent toutefois à considérer ce résultat avec précaution et il est important de confirmer plus avant cette observation par des répétitions techniques ou biologiques supplémentaires. Il a été montré que NSP1 et NSP2 agissent de concert *in vivo* dans la liaison du promoteur du gène *ENOD11* (Hirsch et al., 2009). En revanche, chez le mutant *nsp2*, aucune induction de *ENOD11* n'a pu être observée (Oldroyd and Long, 2003). Il serait donc intéressant de déterminer si NSP2 est requis pour l'expression de *MtPUB1*. Enfin, l'implication du facteur de transcription ERN1 dans l'expression de *MtPUB1* pourrait être déterminée par des expériences d'induction aux NFs chez le mutant *bit1*.

4) Localisation subcellulaire de MtPUB1

L'expression transitoire d'une forme étiquetée de MtPUB1 chez *N. benthamiana* suivie d'un fractionnement cellulaire a permis de montrer une association de cette protéine à la membrane plasmique (**Article – Figure 2**). Par microscopie à fluorescence, une localisation subcellulaire identique a été montrée en système d'expression hétérologue pour la protéine de fusion RFP-NtPUB4, partenaire du RLK CHRK1 (Kim et al., 2003). MtPUB1 et NtPUB4 ne possèdent aucun domaine transmembranaire. Le mécanisme par lequel ces protéines s'associent à la membrane pourrait donc être la conséquence d'une association hydrophobe avec la membrane, d'interactions protéine-protéine avec des partenaires membranaires, ou de modifications post-traductionnelles comme la myristoylation, la palmitoylation ou l'isoprénylation. Cette association se ferait toutefois du côté cytosolique de la membrane plasmique.

Une association membranaire a aussi été mise en évidence pour MtPUB1 chez *M. truncatula* avec pour différence la présence de MtPUB1 dans la fraction soluble (**Article – Figure 2**). Pour tester l'hypothèse que chez *M. truncatula*, la présence du récepteur LYK3 endogène explique la localisation de MtPUB1 dans la fraction soluble, MtPUB1 et de LYK3 ont été co-exprimés chez *N. benthamiana* et aucun changement de localisation de MtPUB1 n'a pu être mis en évidence (**Article – Figure 2**). Ce résultat ayant été obtenu en système d'expression hétérologue, il n'est pas exclu que cela soit le cas chez *M. truncatula*. Ainsi, la présence de MtPUB1 dans la fraction soluble chez *M. truncatula* pourrait être une conséquence d'une modification de MtPUB1 par l'activité kinase de LYK3 après perception des NFs. Un autre partenaire de MtPUB1 encore non identifié pourrait aussi en être responsable. Il serait intéressant de déterminer l'influence d'une application de NFs sur la localisation de MtPUB1 après co-expression des deux partenaires

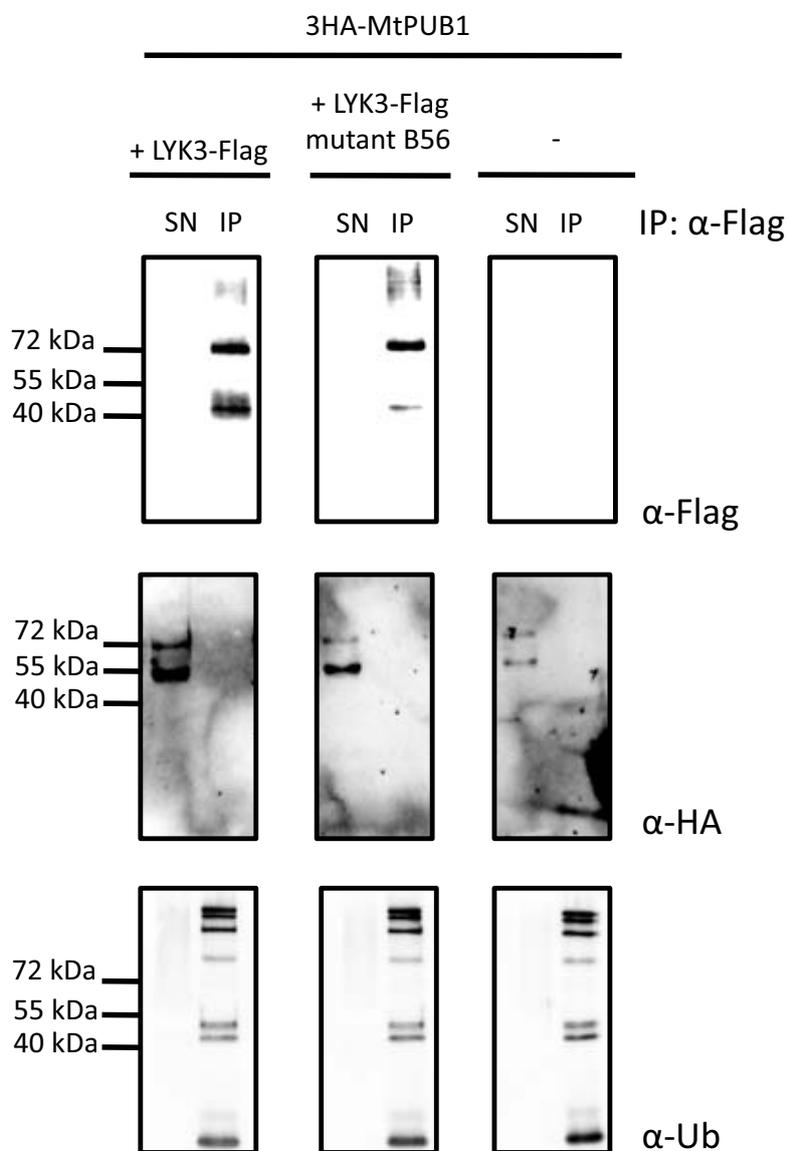


Figure 42. Co-immunopurification de LYK3 et MtPUB1 exprimés chez *N. benthamiana*

Une version étiquetée de MtPUB1 (3HA-MtPUB1) a été exprimée seule ou avec une forme sauvage ou kinase mutante de LYK3-Flag avant immunopurification contre l'épitope Flag. (Haut) Révélation par Western-Blot de LYK3 avec un anti-Flag dans la fraction soluble (SN) ou le culot (IP). (Milieu) Révélation par Western-Blot de MtPUB1 avec un anti-HA. (Bas) Révélation par Western-Blot avec un anti-Ub.

chez *N. benthamiana*. Alternativement, il n'est pas exclu que la surexpression de MtPUB1 par l'emploi du promoteur fort 35S chez *M. truncatula* soit à l'origine de cette observation.

Afin d'affiner ce résultat de localisation de MtPUB1 chez *M. truncatula*, il est envisageable de répéter ces expériences de fractionnement en détectant la protéine MtPUB1 endogène avec un anticorps anti-MtPUB1. S'affranchissant ainsi de la surexpression d'une protéine chimérique, cette méthode permettrait de plus, en utilisant le fond génétique mutant *lyk3-1*, de déterminer si le partitionnement de MtPUB1 entre fraction soluble et membranaire est influencée par l'activité kinase du récepteur LYK3.

5) Quel mode d'action pour MtPUB1 ?

Chez *A. thaliana*, les récepteurs FLS2 et CERK1 impliqués dans les mécanismes de résistance basale, un LRR-RLK et un LysM-RLK respectivement, sont ubiquitinés par AvrPtoB, un effecteur de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Gohre et al., 2008; Gimenez-Ibanez et al., 2009b). En présence d'AvrPtoB, l'abondance du récepteur FLS2 à la membrane plasmique est diminuée (Gohre et al., 2008) et le récepteur CERK1 n'est plus détectable (Gimenez-Ibanez et al., 2009b). Récepteurs nécessaires à l'induction de mécanismes de défense chez les plantes, leur dégradation suite à leur ubiquitination par AvrPtoB participe donc aux mécanismes de virulence de *P. syringae*. De manière analogue, MtPUB1 pourrait ubiquitiner LYK3, provoquant alors sa dégradation et l'arrêt de la signalisation dépendante de LYK3 nécessaire à l'infection. Comme déterminé pour de nombreuses protéines à domaine U-Box de plantes, une activité E3 ubiquitine ligase a été rapportée *in vitro* pour MtPUB1 (**Article – Figure 3**). Afin de déterminer si LYK3 est un substrat de cette activité E3 ubiquitine ligase, deux types de tests ont été effectués dont l'un direct, utilisant les deux protéines purifiées *in vitro*, et l'autre indirect, évaluant la dégradation de LYK3 chez *N. benthamiana* après co-expression avec MtPUB1 (**Article – Figure 3**). Aucune de ces deux approches n'a permis de suggérer une ubiquitination de LYK3 par MtPUB1. Une approche complémentaire ayant pour but de visualiser plus directement l'ubiquitination *in vivo* de LYK3 par MtPUB1 a été menée. Après co-expression des partenaires chez *N. benthamiana* et traitement par un mélange d'inhibiteurs du protéasome (MG132, MG115 et Expoxomycine), le récepteur LYK3 a été immuno-purifié. Le récepteur LYK3 ou les protéines ubiquitinées ont ensuite été détectées par Western Blot dans les fractions immuno-purifiées ou solubles (**Figure 42**). Aucune bande surnuméraire n'ayant pu être détectée par rapport au contrôle sans MtPUB1, ces résultats suggèrent aussi que LYK3 n'est pas un substrat de l'activité E3 ubiquitine ligase de

MtPUB1 (**Figure 42**). Afin de déterminer si l'état de phosphorylation de LYK3 peut influencer son ubiquitination par MtPUB1, une expérience identique a été menée avec une forme mutée de LYK3 sans activité kinase. Un même résultat négatif a été obtenu (**Figure 42**). Il est à noter que la détection de MtPUB1 n'a pas permis de montrer une co-immunopurification avec LYK3 (**Figure 42**). L'hypothèse du mode d'action de MtPUB1 dans la symbiose par ubiquitination de LYK3 ne semble donc pas validée. Cependant, ces résultats ayant été obtenus en système hétérologue, la possibilité qu'une telle modification de LYK3 par MtPUB1 existe chez *M. truncatula* n'est pas exclue. Une quantification de l'abondance du récepteur LYK3 directement chez *M. truncatula* et sous différentes conditions (ex. +/- NFs ou rhizobia) pourrait être alors un moyen de valider cette hypothèse.

Malgré un nombre croissant d'E3 ubiquitine ligases de plantes identifiées comme des partenaires de RLKs, aucun cas d'ubiquitination de ces RLKs par leur E3 ubiquitine ligase partenaire n'a encore été rapporté dans la littérature. En revanche, plusieurs cas de transphosphorylation de ces E3 ubiquitine ligase par le domaine kinase des RLKs ont été rapportés. La protéine ARC1, partenaire du récepteur d'auto-incompatibilité SRK chez *B. napus*, est phosphorylée *in vitro* par le domaine kinase de SRK (Gu et al., 1998). Plus récemment, il a été montré que plusieurs domaines kinases de récepteurs de la famille des S-Domain Receptor Kinase d'*A. thaliana* sont capables de phosphoryler la région C-terminale (ARM) de plusieurs protéines de la famille des PUB-ARM (Samuel et al., 2008). Un mode d'action possible pour MtPUB1 impliquerait donc sa phosphorylation par LYK3. Les tests de phosphorylation *in vitro* menés durant ma thèse ont montré que l'activité kinase du récepteur LYK3 est en effet capable de transphosphoryler MtPUB1 (**Article – Figure 3**). La phosphorylation d'une forme de MtPUB1 tronquée de son domaine N-terminal UND suggère la présence d'au moins un site de phosphorylation sur la région PUB-ARM de MtPUB1 (**Article – Figure 3**). La phosphorylation de MtPUB1 par LYK3 pourrait donc être une fonction de l'interaction entre les deux protéines *in vivo*.

Les conséquences de telles phosphorylations des PUB-ARM par les RLKs sont encore inconnues, mais il est tentant de leur attribuer un rôle dans l'activation ou l'inactivation de la fonction des protéines PUB-ARM. En système d'expression hétérologue, la co-expression de ARC1 et du domaine kinase de SRK induit un changement de localisation de ARC1 du cytosol vers des compartiments contenant des marqueurs du protéasome (Stone et al., 2003). L'activité kinase du récepteur SRK est requise pour induire cette relocalisation, suggérant que la phosphorylation de ARC1 précède sa relocalisation (Stone et al., 2003). Cette relocalisation, aussi dépendante de l'activité E3 ubiquitine ligase de ARC1, pourrait être due à une modification de

l'affinité de ARC1 pour ses substrats ou pour d'autres partenaires nécessaires à sa fonction. Un autre exemple est donné par l'étude de la localisation de AtPUB9, partenaire de plusieurs RLKs de la famille des S-Domain Receptor kinase. A l'état basal, AtPUB9 est localisé dans le noyau de cellules BY-2 (Samuel et al., 2008). Sa co-expression avec le domaine kinase de ARK2 induit sa relocalisation dans le cytosol, alors qu'en présence du domaine kinase de ARK1, AtPUB9 relocalise à la membrane plasmique (Samuel et al., 2008). Ces données suggèrent l'existence de mécanismes fins de régulation de l'activité de AtPUB9 par des relocalisations subcellulaires variées et conséquentes à sa phosphorylation (Yee and Goring, 2009).

Enfin, il est envisageable que la phosphorylation de MtPUB1 par LYK3 entraîne sa dégradation et donc l'inhibition de son rôle négatif. Ce dernier mécanisme de régulation a été démontré chez *A. thaliana* pour KEG, une E3 ubiquitine ligase contenant un domaine kinase (Liu and Stone, 2010). De manière remarquable, l'activité kinase de KEG est indispensable à son auto-ubiquitination et à sa dégradation par le protéasome, suggérant ainsi qu'une autophosphorylation de KEG est un pré requis à son auto-ubiquitination (Liu and Stone, 2010). L'abondance de MtPUB1 exprimée chez *N. benthamiana* ne varie pas en fonction de la présence de LYK3 (**Article – Figure 3**), suggérant qu'une telle régulation de MtPUB1 n'a pas lieu. Il est toutefois possible que l'absence de NFs pour activer LYK3 en système hétérologue empêche de suivre ce phénomène. Il pourrait être envisagé de tester si l'application de NFs dans ce système d'expression induit une variation dans l'abondance de MtPUB1.

De manière similaire à ces différents exemples, on peut supposer que la phosphorylation de MtPUB1 par LYK3 durant la symbiose puisse modifier l'activité enzymatique de MtPUB1, sa localisation subcellulaire ou enfin, promouvoir sa dégradation par auto-ubiquitination.

De récents travaux sur le modèle de la voie de signalisation de l'auto-incompatibilité chez *B. napus* ont permis l'identification de la protéine Exo70A comme partenaire de ARC1. Exo70A est ubiquitinée *in vitro* par ARC1 (Samuel et al., 2009). Il est possible que l'inhibition du rôle positif de Exo70A dans la sécrétion vésiculaire, par son ubiquitination et sa dégradation après interaction avec ARC1, soit une composante de la réponse d'auto-incompatibilité. De manière similaire MtPUB1 pourrait, après induction de son expression, inhiber un régulateur positif de même nature que Exo70A. En effet, la croissance du cordon d'infection implique, comme celle du tube pollinique, la sécrétion polarisée de vésicules. Cette réponse dépendrait de son activité E3 ubiquitine ligase. L'ubiquitination menant à la dégradation d'un tel substrat serait inhibée après la phosphorylation de MtPUB1 par LYK3. Ce raisonnement est toutefois applicable à tous type de régulateur positif de la nodulation.

Alternativement, l'activation d'un régulateur négatif par mono-ubiquitination pourrait aussi expliquer le rôle symbiotique négatif de MtPUB1. Dans ce cas, l'inhibition de l'activité E3 ubiquitine ligase de MtPUB1 par LYK3 empêcherait l'activation d'une voie de régulation négative. Un mécanisme de modulation de l'activité d'un substrat par mono-ubiquitination a ainsi été rapporté dans l'étude de la fonction de AtCHIP, une E3 ubiquitine ligase d'*A. thaliana* de la famille des U-Box impliquée dans les mécanismes de tolérance aux stress abiotiques (Yan et al., 2003). AtCHIP admet deux isoformes d'une sous unité du complexe PP2A (phosphatase) comme partenaires (PP2AA3 et PP2AA1) (Luo et al., 2006). Ces deux partenaires sont mono-ubiquitinés par AtCHIP *in vitro* (Luo et al., 2006). La surexpression de AtCHIP chez *A. thaliana* n'altère pas l'abondance du complexe PP2A mais au contraire, stimule positivement l'activité phosphatase de ce dernier, suggérant que l'ubiquitination des deux sous-unités du complexe PPA2 participe à une augmentation de son activité (Luo et al., 2006).

En poursuivant cette hypothèse, il est possible de spéculer sur la nature de la régulation négative activée par MtPUB1 dans la symbiose. Parmi le faible nombre de protéines UND-PUB-ARM caractérisées à ce jour dans la littérature, trois sont impliquées dans des interactions plantes-pathogènes ou dans la régulation de la mort cellulaire (OsSPL11, NtACRE276 et AtPUB17 ; Cf. Introduction). Les rôles de ces protéines dans les mécanismes de défense ou de mort cellulaire peuvent être positifs (NtACR276, AtPUB17) ou négatifs (OsSPL11). En plus de ces trois protéines UND-PUB-ARM, il a été montré un rôle dans la défense aux pathogènes pour un triplet de protéines PUB-ARM chez *A. thaliana* (Trujillo et al., 2008). L'implication dans des mécanismes de réponse aux stress biotiques pourrait ainsi être une caractéristique de nombreuses protéines de la famille des PUB-ARM. Dans cette perspective, le mécanisme par lequel MtPUB1 régule négativement la symbiose présenterait alors des homologies avec une réaction de défense. L'inactivation de ce rôle de MtPUB1 suite à la perception des NFs par LYK3 serait alors un moyen pour le symbiote de contourner ces défenses.

6) Un modèle de fonctionnement pour MtPUB1

Un modèle de fonctionnement de MtPUB1 et du rôle de l'interaction entre LYK3 et MtPUB1 durant la symbiose fixatrice d'azote chez *M. truncatula* est proposé **Figure 43**. La perception des NFs par le récepteur de la voie de signalisation (NFP) induit l'expression de nombreux gènes symbiotiques dont *MtPUB1* (**Figure 43A**). MtPUB1 exerce un contrôle négatif sur le processus d'infection bactérien, en activant des régulateurs négatifs ou en inhibant des

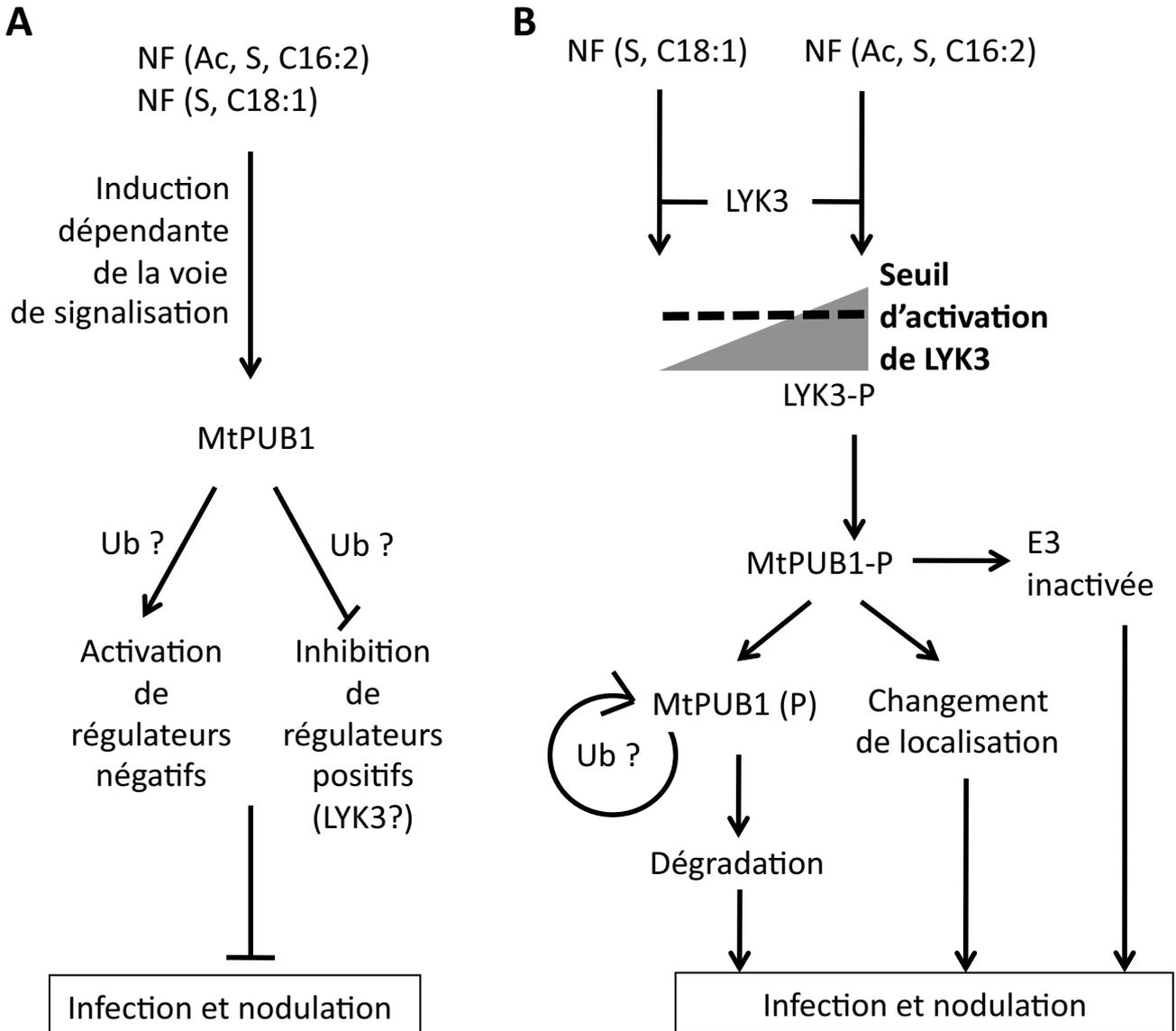


Figure 43. Modèle des modes d'actions de MtPUB1 durant la symbiose fixatrice d'azote

régulateurs positifs (dont peut-être LYK3), probablement par son activité E3 ubiquitine ligase (**Figure 43A**). Dans la voie d'infection, les NFs sont perçus par LYK3 et déclenchent son activation par phosphorylation (**Figure 43B**). LYK3 phosphorylerait alors MtPUB1, à la suite de quoi le rôle négatif de MtPUB1 sur l'infection serait inhibée. Les mécanismes menant à cette inhibition du rôle de MtPUB1 sont inconnus, mais trois cas peuvent être imaginés : (i) MtPUB1 s'auto-ubiquitinerait, provoquant sa dégradation. (ii) MtPUB1 changerait de localisation. (iii) L'activité E3 ubiquitine ligase de MtPUB1 serait abolie (**Figure 43B**).

Les phénotypes des plantes RNAi *MtPUB1* (cette étude), RNAi *LYK3* (Limpens et al., 2003) ou mutantes *lyk3-4* (Smit et al., 2007) montrent tous une corrélation entre la structure des NFs produits par les bactéries et efficacité de nodulation. Cette corrélation pourrait s'expliquer un phénomène de « seuil d'activation » du récepteur LYK3. Ainsi, une perception inefficace de NFs modifiés (*nodL*, *nodF*/*nodL*) par LYK3 ou la diminution de la quantité de LYK3 à la membrane (RNAi *LYK3* et mutant *lyk3-4*) se traduiraient par une mauvaise phosphorylation de MtPUB1. Le rôle négatif de *MtPUB1* sur l'infection prédominerait alors, empêchant l'infection. En présence de NFs sauvages, LYK3 atteindrait un seuil d'activation suffisant, permettant ainsi la phosphorylation de MtPUB1. La sous-régulation de *MtPUB1* par RNAi abaisserait ce seuil nécessaire d'activation de LYK3. Cette hypothèse d'un « seuil d'activation » est aussi renforcée par les travaux d'Ardourel et al. (1994), montrant que la surproduction par *S. meliloti* de NFs modifiés (*nodL*, *nodFL*) complémente partiellement l'infection chez *Medicago sp* (Ardourel et al., 1994). Cette surproduction de NFs modifiés parviendrait ainsi à surmonter partiellement la baisse d'affinité de LYK3 pour ces NFs, activant suffisamment ce dernier pour phosphoryler MtPUB1.

Le suivi de l'expression de *MtPUB1* indique que ce gène est exprimé durant toutes les phases de la vie du nodule (**Article – Figure 5**), indiquant que la voie de régulation négative qu'il contrôle est persistante. MtPUB1 définirait donc un mécanisme de contrôle constant du symbiote durant l'infection. La suppression de ce contrôle négatif par une perception continue des NFs serait ainsi nécessaire non seulement pour l'initiation de l'infection mais aussi pour la progression des cordons d'infection dans le cortex de la racine et dans le nodule mature.

7) Perspectives de recherche

Le modèle présenté précédemment peut servir de base de travail dans la définition d'axes de recherche futurs.

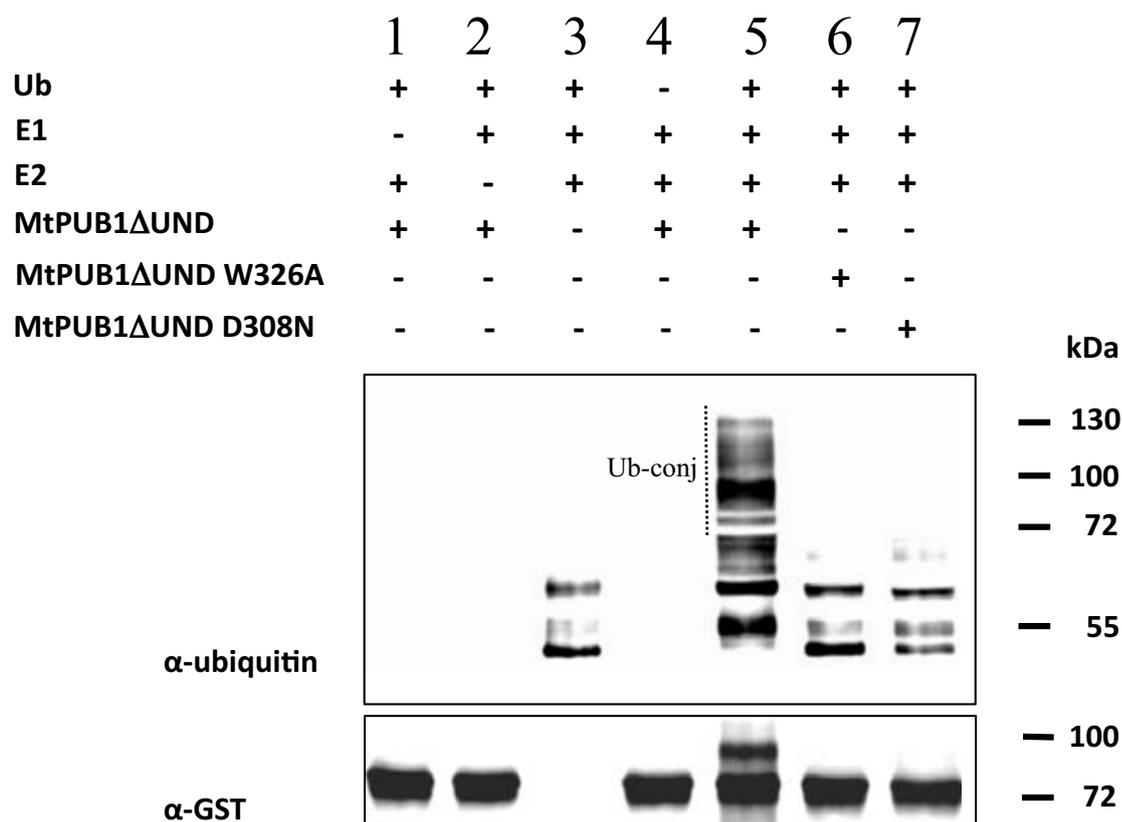


Figure 44. Activité E3 ubiquitine ligase de MtPUB1 *in vitro*

MtPUB1 possède une activité E3 ubiquitine ligase *in vitro*. L'activité E3 ubiquitine ligase de GST-MtPUB1ΔUND a été testée en présence ou en absence de E1 de levure, de E2 d'*A. thaliana* (AtUBC8) and d'ubiquitine. Des anticorps Anti-Ub et anti-GST ont été utilisés pour détecter les protéines ubiquitinées et GST-MtPUB1ΔUND, respectivement. Une gamme de protéines conjuguées à l'ubiquitine (Ub-conj) est détectée en présence de GST-MtPUB1ΔUND et pas en présence de GST-MtPUB1ΔUND-W326A ou MtPUB1ΔUND-D308N, deux variantes inactives du domaine U-Box.

De façon similaire à d'autres protéines UND-PUB-ARM (Yang et al., 2006), MtPUB1 possède une activité E3 ubiquitine ligase *in vitro*. Tirant partie de cette activité enzymatique, il est proposé dans le modèle que MtPUB1 pourrait exercer sa fonction grâce à son activité E3 ubiquitine ligase. Cependant, cela n'a pas été montré par mes travaux de recherche. Lier l'activité E3 ubiquitine ligase de MtPUB1 à son rôle symbiotique est donc un axe de recherche à explorer. Il a été montré que la surexpression d'une forme sauvage de MtPUB1 induit un délai dans la nodulation. Un moyen de lier l'activité E3 ubiquitine ligase de MtPUB1 à son rôle symbiotique consisterait à surexprimer chez *M. truncatula* le mutant inactif de MtPUB1 testé *in vitro* (MtPUB1W326A). En absence de délai induit dans la nodulation, un lien direct entre l'activité enzymatique de MtPUB1 et son rôle symbiotique serait alors établi.

La recherche de mutants de *M. truncatula* pour le gène *MtPUB1* n'a pas permis d'isoler un allèle nul pour le gène. Cependant, un mutant homozygote pour une mutation ponctuelle dans le domaine U-Box (D³⁰⁸N) a en revanche été identifié. *In vitro*, la protéine MtPUB1 portant cette mutation (MtPUB1 Δ UND D308N) ne possède plus d'activité E3 ubiquitine ligase (**Figure 44**). Ce résultat suggère donc que la plante mutante produit une protéine MtPUB1 sans activité E3 ubiquitine ligase. Le succès, seulement très récent, du rétrocroisement entre ce mutant et une plante sauvage permettra prochainement de déterminer le phénotype symbiotique des descendants homozygotes pour cette mutation.

Il a aussi été fait l'hypothèse que le rôle de MtPUB1 peut passer par la dégradation d'un régulateur positif de la nodulation ou l'activation d'un régulateur négatif. Une stratégie de recherche de partenaires de MtPUB1 par criblage pourrait donc être envisagée. La recherche de tels substrats de MtPUB1 pourrait aussi se diriger vers les protéines de la voie de signalisation NFs connues pour jouer un rôle positif. En premier lieu, il serait ainsi important de déterminer si LYK3 est un substrat de MtPUB1 chez *M. truncatula*. Pour le montrer, des expériences ont déjà été suggérées (Cf. § 5). Cependant, il est à noter que l'abondance du récepteur LYK3 chez *M. truncatula* est faible et jusqu'à présent, la forme endogène de LYK3 n'a pas été détectée par Western Blot dans l'équipe.

In vitro, MtPUB1 est phosphorylé par LYK3 et il est proposé dans le modèle que cette phosphorylation inhibe le rôle négatif de MtPUB1 dans la nodulation. Il serait intéressant de connaître plus en détail le ou les résidus phosphorylés sur MtPUB1 pour étudier plus avant la fonction de cette phosphorylation. Ainsi, la mutagenèse dirigée de ces sites chez MtPUB1 couplée

à l'étude de sa localisation et de son activité enzymatique permettrait de déterminer quelle voie est utilisée pour inhiber le rôle de MtPUB1 dans la nodulation.

Les données présentées dans le premier chapitre de cette thèse suggèrent l'existence d'une interaction entre MtPUB1 et DMI2 dans la levure. Les tests d'interaction entre MtPUB1 et DMI2 dans la levure ont aussi montré que l'oligomère formé est sensible à une modification de séquence de l'extrémité C-terminale de DMI2. En effet, une interaction a été détectée entre la région cytosolique de DMI2 et MtPUB1 uniquement lorsque DMI2 est cloné avec son codon Stop original. L'utilisation d'un clonage par technologie Gateway, sans la conservation du codon Stop original et ajoutant une extension de 18 acides aminés, abolit cette interaction. Une étude préliminaire, focalisée sur le rôle de cette région C-terminale de DMI2 dans l'interaction avec MtPUB1 et effectuée dans le groupe par C. Hervé, semble confirmer cette observation. Il est tentant de faire un rapprochement entre ces résultats et le phénotype symbiotique altéré (nod+/- ; myc +/-) observé chez les mutants TR89 et TRV9 du gène *DMI2*. En effet chez ces deux mutants, une délétion dans la séquence de *DMI2* induit un changement du cadre de lecture dans l'extrémité C-terminale de la protéine (Morandi et al., 2005 ; A. Bersoult, Thèse). L'exploration de la fonction de l'extrémité C-terminale de DMI2 dans la nodulation pourrait ainsi impliquer MtPUB1. A la manière de ce qui a été fait dans le fond génétique *lyk3-4*, il est envisageable de tester si la sous-régulation de *MtPUB1* par RNAi peut, au moins partiellement, restaurer la nodulation dans les fond génétiques mutants TR89 et TRV9. Aussi, de manière similaire à ce qui a été tenté avec LYK3, des tests d'ubiquitination de DMI2 par MtPUB1 ou de phosphorylation de MtPUB1 par DMI2 pourraient être effectués *in vitro* et chez *N. benthamiana*.

Chez *M. truncatula*, la symbiose fixatrice d'azote et la symbiose endomycorhizienne partagent plusieurs déterminant moléculaires dans leur voie de signalisation (Catoira et al., 2000), dont le récepteur DMI2. Des données d'expression de *MtPUB1* obtenues par micro-array (Benedito et al., 2008) indiquent que ce gène est induit durant la symbiose fixatrice d'azote et aussi à un niveau plus faible durant la symbiose AM (**Article – Tableau Supp. 1**). Ces données d'expression couplée à l'existence d'une interaction MtPUB1/DMI2 dans la levure suggèrent que *MtPUB1* pourrait jouer un rôle dans les deux endosymbioses. Il serait donc intéressant de déterminer plus avant l'implication de MtPUB1 dans la symbiose AM.

II) MtSYMREM1 et la signalisation NFs

1) Les remorines

L'existence des remorines a été rapportée pour la première fois lors de cribles effectués chez les plantes pour identifier des protéines de la membrane plasmique phosphorylées après application d'oligogalacturonides (Farmer et al., 1989). Ces protéines sont spécifiques au règne végétal et leur distribution taxonomique suggère que leur apparition coïncide avec la colonisation terrestre (Raffaele et al., 2007). Les remorines étudiées jusqu'à ce jour sont localisées à la membrane plasmique, certaines ayant aussi été localisées dans des sous-domaines de la membrane plasmique appelés radeaux lipidiques (ou plus récemment Membrane Rafts) (Lefebvre et al., 2007; Raffaele et al., 2009b; Raffaele et al., 2009a). Cette localisation à la membrane plasmique ne peut s'expliquer par la structure des remorines qui ne présentent aucun domaine transmembranaire et à priori pas de modifications post-traductionnelles permettant l'ajout d'un lipide. Il a donc été proposé que les remorines soient produites dans le cytosol, avant d'être modifiées et associées à la membrane plasmique par un processus encore inconnu (Reymond et al., 1996). Une analyse phylogénétique de 85 remorines, issues pour la plupart des plantes modèles séquencées, a révélé l'existence de six groupes phylogénétiques distincts. Cette ségrégation phylogénétique des remorines est expliquée en grande partie par une divergence des séquences dans les régions N-terminales des protéines. Cette variété de N-terminal suggère que ce domaine confère une spécificité fonctionnelle aux remorines des différents groupes. Par conséquent il est attendu des remorines qu'elles possèdent des fonctions variées, bien que ces fonctions soient mal connues pour l'instant (Raffaele et al., 2007). A ce jour, seul un rôle a été démontré pour une remorine dans l'altération de la propagation cellule à cellule du *Potato virus X* (PVX) chez *Solanum lycopersicum* (Raffaele et al., 2009b). Cette fonction serait assurée par la capacité de cette remorine à interagir avec une protéine de mouvement du virus (Raffaele et al., 2009b).

Chez *M. truncatula*, dix gènes codant des remorines ont été identifiés dans la partie du génome séquencée (Raffaele et al., 2007). *MtSYMREM1* (anciennement *MtREM2.2*), dont le groupe phylogénétique ne contient que des séquences de légumineuses ou du peuplier, présente un profil d'expression restreint aux nodules. Ce profil d'expression remarquable a amené à se demander quelle fonction pouvait remplir ce gène durant la symbiose fixatrice d'azote.

2) Quel rôle et quelle fonction pour MtSYMREM1 dans la signalisation NFs ?

Le travail de caractérisation fonctionnelle de *MtSYMREM1* effectué sur un mutant nul *mtsymrem1* et par RNAi a permis de montrer que ce gène joue un rôle positif dans la symbiose fixatrice d'azote. Le profil d'expression symbiotique de *MtSYMREM1*, sa localisation à la membrane des cordons d'infection et les phénotypes d'infection du mutant *mtsymrem1* comme des lignées *MtSYMREM1*-RNAi suggèrent que *MtSYMREM1* joue un rôle durant les événements d'infection précoces et tardifs. De manière similaire à d'autres remorines, *MtSYMREM1* est enrichie dans des sous domaines de la membrane plasmique résistants aux détergents. Enfin, des tests d'interactions effectués dans le système Split-Ubiquitine de levure et par BiFC chez *N. benthamiana* ont montré que *MtSYMREM1* interagit avec LYK3, NFP et DMI2. Rien n'est encore connu sur la fonction de ces interactions. Des travaux chez *M. truncatula* mettant en lumière le rôle d'une nouvelle classe de protéines permettent de formuler une hypothèse quant à la fonction de *MtSYMREM1*.

S'intéressant aux mécanismes d'infection durant la symbiose fixatrice d'azote chez *M. truncatula*, Haney et al (2010) ont postulé que des protéines identiques à celles impliquées dans l'infection des cellules animales par un pathogène pouvaient jouer un rôle important (Haney and Long, 2010). Ces protéines animales, nommées flotillines, sont présentes sur la membrane de l'hôte entourant le pathogène (Watarai et al., 2002). Elles constituent un marqueur des radeaux lipidiques et jouent un rôle dans un mécanisme d'endocytose clathrine et cavéoline-indépendant (Glebov et al., 2006). Haney et al (2010) ont identifiés plusieurs flotillines chez *M. truncatula*, et ont montré par génétique inverse le rôle positif joué par deux flotillines (FLOT2 et FLOT4) dans le mécanisme d'infection durant la symbiose fixatrice d'azote. Une étude de leur localisation subcellulaire par microscopie fluorescente a montré que FLOT2 et FLOT4 sont localisés dans des micro domaines de la membrane plasmique des poils absorbants, possiblement des radeaux lipidiques. FLOT4 est aussi présente à la membrane des cordons d'infection durant les étapes tardives d'infection et d'endocytose du symbiote bactérien (Haney and Long, 2010). La fonction des flotillines chez *M. truncatula* n'est pas connue.

Il a récemment été montré chez *M. truncatula* que FLOT4 et le récepteur LYK3, tous deux fusionnés à une protéine fluorescente, sont localisés dans des zones séparées du poil absorbant avant inoculation bactérienne et relocalisent tous les deux à l'extrémité apicale du poil absorbant après inoculation. Durant la croissance du cordon d'infection, les deux protéines co-localisent sur

la membrane du cordon d'infection. Le récepteur LYK3 n'est ensuite plus visible dans les cellules du cortex racinaire. (S. Long et D. Cook, communication personnelle). Ces données suggèrent donc la présence de LYK3 au niveau des radeaux lipidiques pendant les étapes précoces d'infection. Cette hypothèse est renforcée par le fait que MtSYMREM1, qui peut interagir *in planta* avec les trois RLKs symbiotiques, est aussi enrichie dans ces sous-domaines de la membrane plasmique. On peut imaginer que MtSYMREM1 favorise la présence des RLKs symbiotiques dans les radeaux lipidiques à l'extrémité apicale du poil absorbant, favorisant ainsi les événements de signalisation menant à l'infection.

Afin de déterminer si les LYK3 agit en complexe avec les autres protéines membranaires NFP, DMI2 et DMI1 pour la perception des NFs, des tests d'interactions dans le système Split-Ubiquitine de levure ont été menés. De façon similaire à ce qui a été décrit chez *A. thaliana* pour le récepteur BRI1 des brassinostéroïdes, la détection d'un homo-oligomère de LYK3 suggère l'existence d'un homo-dimère de ce récepteur chez *M. truncatula* avant liaison des NFs.

Aucune interaction n'a été détectée entre les couples LYK3/NFP et LYK3/DMI2 dans le système Split-Ubiquitine, suggérant que ces RLKs n'interagissent pas ensemble chez *M. truncatula*. Cependant, il est possible que la perception des NFs soit un pré requis pour former ces hétéro-oligomères. Ce cas de figure existe chez *A. thaliana* où il a été montré que l'interaction entre BRI1 et son co-récepteur BAK1 dépend de la perception préalable des BR (Cf. Introduction). Dans cette hypothèse, le système d'expression hétérologue de levure ne semble pas le plus indiqué pour pouvoir montrer ces interactions. Alternativement, il est possible chez *M. truncatula* que MtSYMREM1, de part sa capacité d'homo-oligomérisation et d'hétéro-oligomérisation avec les RLKs symbiotiques, joue un rôle de protéine d'échafaudage entre ces différents RLKs. Ainsi, un complexe entre les quatre protéines serait formé à la membrane et relocaliserait à l'apex du poil absorbant grâce à la MtSYMREM1.

Les études biochimiques de la perception des NFs ont montré que les gènes *DMI1* et *DMI2* sont nécessaires à la formation du site de liaison NFBS3 à haute affinité pour les NFs (Hogg et al., 2006). L'emploi du système Split-Ubiquitine a permis de montrer une interaction entre LYK3 et DMI1. De manière intéressante, les travaux effectués dans le cadre d'une thèse précédente ont montré l'existence d'une interaction entre DMI2 et DMI1 dans le même système Split-Ubiquitine (Anne Bersoult, Thèse). Ensemble, cela suggère que DMI1, comme MtSYMREM1, pourrait aider à la formation d'un complexe comprenant les récepteurs LYK3 et DMI2. De cette manière, un complexe LYK3/DMI1/DMI2 situé à la membrane plasmique pourrait former le site NFBS3 avec

LYK3 comme récepteur putatif des NFs. Une donnée va cependant à l'encontre de l'hypothèse de ce complexe récepteur. En effet, il a été montré que DMI1 est localisé principalement à la membrane péri-nucléaire des cellules de *M. truncatula* (Riely et al., 2007). Il est alors difficile d'accorder cette localisation de DMI1 avec sa capacité à interagir avec des protéines de la membrane plasmique.

Il n'est pas connu si le gène *LYK3* est nécessaire à la présence du site de liaison NFBS3. De manière similaire à ce qui a été entrepris lors de la caractérisation de NFBS3 chez les mutants *dmi1* et *dmi2*, il pourrait être testé sa présence ou son absence dans un fond génétique mutant *lyk3*.

III) Conclusions

Basées sur le principe d'une mutagenèse à grande échelle couplée à la recherche de mutants *nod⁻*, les études génétiques de la voie de perception et de transduction du signal NFs dans la symbiose fixatrice d'azote ont permis la découverte de nombreux gènes essentiels chez les légumineuses modèles. La découverte de plusieurs allèles mutants pour chaque gène suggère qu'aujourd'hui, ces criblages génétiques ont atteint leur niveau de saturation des génomes, rendant de moins en moins probable la découverte de nouveaux gènes essentiels. Etant acquis que tous les gènes impliqués dans la symbiose n'ont pas encore été découverts, de nombreux gènes non essentiels mais importants seraient ainsi manqués par cette méthode de criblage génétique. De plus, des gènes peuvent faire partie de familles multi géniques, impliquant une redondance fonctionnelle. Ces gènes peuvent jouer un rôle positif ou négatif, non décelable par criblage visuel non quantitatif.

Comme alternative à la génétique et afin de mieux comprendre le rôle joué par le récepteur LYK3 durant l'infection bactérienne de la symbiose fixatrice d'azote, une méthode de criblage de banques contre la protéine LYK3 en système double hybride de levure a été menée pendant ma thèse. Le gène *MtPUB1* a été identifié, et son rôle dans la symbiose fixatrice d'azote a été défini. De part son rôle négatif dans la symbiose et la manière dont ce rôle a pu être déterminé, *MtPUB1* exemplifie cette classe des gènes qui n'auraient pu être découverts par criblage génétiques. La recherche de partenaires des protéines identifiées par criblage génétique est donc une méthode validée pour approfondir notre connaissance des mécanismes de signalisation NFs et de la symbiose.

Cette meilleure connaissance de la signalisation NFs sera dans le futur probablement liée à l'élaboration d'un modèle biochimique, s'attachant à identifier des partenaires des RLKs et à décrire les modifications post-traductionnelles mises en jeu durant l'activation des voies de signalisation NFs. L'identification de *MtPUB1* et *MtSYMREM1* comme partenaires de LYK3 s'inscrit dans cette démarche et illustre la complexité des voies de signalisation activées par les récepteurs symbiotiques

BIBLIOGRAPHIE

- Amor, B.B., Shaw, S.L., Oldroyd, G.E., Maillet, F., Penmetsa, R.V., Cook, D., Long, S.R., Denarie, J., and Gough, C.** (2003). The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J* **34**, 495-506.
- Andersen, P., Kragelund, B.B., Olsen, A.N., Larsen, F.H., Chua, N.H., Poulsen, F.M., and Skriver, K.** (2004). Structure and biochemical function of a prototypical *Arabidopsis* U-box domain. *J Biol Chem* **279**, 40053-40061.
- Andriankaja, A., Boisson-Dernier, A., Frances, L., Sauviac, L., Jauneau, A., Barker, D.G., and de Carvalho-Niebel, F.** (2007). AP2-ERF transcription factors mediate Nod factor dependent Mt ENOD11 activation in root hairs via a novel cis-regulatory motif. *Plant Cell* **19**, 2866-2885.
- Ane, J.M., Kiss, G.B., Riely, B.K., Penmetsa, R.V., Oldroyd, G.E., Ajax, C., Levy, J., Debelle, F., Baek, J.M., Kalo, P., Rosenberg, C., Roe, B.A., Long, S.R., Denarie, J., and Cook, D.R.** (2004). *Medicago truncatula* DM11 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* **303**, 1364-1367.
- Ardourel, M., Demont, N., Debelle, F., Maillet, F., de Billy, F., Prome, J.C., Denarie, J., and Truchet, G.** (1994). *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell* **6**, 1357-1374.
- Arrighi, J.F., Barre, A., Ben Amor, B., Bersoult, A., Soriano, L.C., Mirabella, R., de Carvalho-Niebel, F., Journet, E.P., Gherardi, M., Huguet, T., Geurts, R., Denarie, J., Rouge, P., and Gough, C.** (2006). The *Medicago truncatula* lysin [corrected] motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant Physiol* **142**, 265-279.
- Azevedo, C., Santos-Rosa, M.J., and Shirasu, K.** (2001). The U-box protein family in plants. *Trends Plant Sci* **6**, 354-358.
- Bach, I., and Ostendorff, H.P.** (2003). Orchestrating nuclear functions: ubiquitin sets the rhythm. *Trends Biochem Sci* **28**, 189-195.
- Barnett, M.J., Fisher, R.F., Jones, T., Komp, C., Abola, A.P., Barloy-Hubler, F., Bowser, L., Capela, D., Galibert, F., Gouzy, J., Gurjal, M., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R.W., Kahn, D., Kahn, M.L., Kalman, S., Keating, D.H., Palm, C., Peck, M.C., Surzycki, R., Wells, D.H., Yeh, K.C., Davis, R.W., Federspiel, N.A., and Long, S.R.** (2001). Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9883-9888.
- Benedito, V.A., Torres-Jerez, I., Murray, J.D., Andriankaja, A., Allen, S., Kakar, K., Wandrey, M., Verdier, J., Zuber, H., Ott, T., Moreau, S., Niebel, A., Frickey, T., Weiller, G., He, J., Dai, X., Zhao, P.X., Tang, Y., and Udvardi, M.K.** (2008). A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J* **55**, 504-513.
- Benson, D.R., and Silvester, W.B.** (1993). Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol Rev* **57**, 293-319.
- Bersoult, A., Camut, S., Perhald, A., Kereszt, A., Kiss, G.B., and Cullimore, J.V.** (2005). Expression of the *Medicago truncatula* DM12 gene suggests roles of the symbiotic nodulation receptor kinase in nodules and during early nodule development. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 869-876.

- Bersoult, A.** (2006). Rôle du récepteur kinase DMI2 dans la perception et la transduction du signal symbiotique Facteur Nod de *Sinorhizobium meliloti* chez la légumineuse *Medicago truncatula*. Thèse de Doctorat de l'Université Paul Sabatier de Toulouse.
- Besserer, A., Puech-Pages, V., Kiefer, P., Gomez-Roldan, V., Jauneau, A., Roy, S., Portais, J.C., Roux, C., Becard, G., and Sejalon-Delmas, N.** (2006). Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol* **4**, e226.
- Bhuvanewari, T.V., Bhagwat, A.A., and Bauer, W.D.** (1981). Transient susceptibility of root cells in four common legumes to nodulation by rhizobia. *Plant Physiol* **68**, 1144-1149.
- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Becard, G., Rosenberg, C., and Barker, D.G.** (2001). Agrobacterium rhizogenes-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 695-700.
- Boisson-Dernier, A., Andriankaja, A., Chabaud, M., Niebel, A., Journet, E.P., Barker, D.G., and de Carvalho-Niebel, F.** (2005). MtENOD11 gene activation during rhizobial infection and mycorrhizal arbuscule development requires a common AT-rich-containing regulatory sequence. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 1269-1276.
- Bono, J.J., Riond, J., Nicolaou, K.C., Bockovich, N.J., Estevez, V.A., Cullimore, J.V., and Ranjeva, R.** (1995). Characterization of a binding site for chemically synthesized lipo-oligosaccharidic NodRm factors in particulate fractions prepared from roots. *Plant J* **7**, 253-260.
- Brewin, N.J.** (1991). Development of the legume root nodule. *Annu Rev Cell Biol* **7**, 191-226.
- Cabrillac, D., Cock, J.M., Dumas, C., and Gaude, T.** (2001). The S-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature* **410**, 220-223.
- Callis, J., Carpenter, T., Sun, C.W., and Vierstra, R.D.** (1995). Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *Genetics* **139**, 921-939.
- Carpenter, S., and O'Neill, L.A.** (2009). Recent insights into the structure of Toll-like receptors and post-translational modifications of their associated signalling proteins. *Biochem J* **422**, 1-10.
- Catoira, R., Timmers, A.C., Maillet, F., Galera, C., Penmetsa, R.V., Cook, D., Denarie, J., and Gough, C.** (2001). The HCL gene of *Medicago truncatula* controls *Rhizobium*-induced root hair curling. *Development* **128**, 1507-1518.
- Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, R.V., Journet, E.P., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C., and Denarie, J.** (2000). Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell* **12**, 1647-1666.
- Chabaud, M., de Carvalho-Niebel, F., and Barker, D.G.** (2003). Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. *Plant Cell Rep* **22**, 46-51.
- Charpentier, M., Bredemeier, R., Wanner, G., Takeda, N., Schleiff, E., and Parniske, M.** (2008). *Lotus japonicus* CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis. *Plant Cell* **20**, 3467-3479.
- Charron, D., Pingret, J.L., Chabaud, M., Journet, E.P., and Barker, D.G.** (2004). Pharmacological evidence that multiple phospholipid signaling pathways link *Rhizobium* nodulation factor perception in *Medicago truncatula* root hairs to intracellular responses, including Ca²⁺ spiking and specific ENOD gene expression. *Plant Physiol* **136**, 3582-3593.

- Chen, X.C., Feng, J., Hou, B.H., Li, F.Q., Li, Q., and Hong, G.F.** (2005). Modulating DNA bending affects NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. *Nucleic Acids Res* **33**, 2540-2548.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., and Felix, G.** (2006). The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* **18**, 465-476.
- Chinchilla, D., Shan, L., He, P., de Vries, S., and Kemmerling, B.** (2009). One for all: the receptor-associated kinase BAK1. *Trends Plant Sci* **14**, 535-541.
- Choi, H.K., Mun, J.H., Kim, D.J., Zhu, H., Baek, J.M., Mudge, J., Roe, B., Ellis, N., Doyle, J., Kiss, G.B., Young, N.D., and Cook, D.R.** (2004). Estimating genome conservation between crop and model legume species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15289-15294.
- Chong, Y.T., Gidda, S.K., Sanford, C., Parkinson, J., Mullen, R.T., and Goring, D.R.** (2010). Characterization of the Arabidopsis thaliana exocyst complex gene families by phylogenetic, expression profiling, and subcellular localization studies. *New Phytol* **185**, 401-419.
- Clark, S.E., Running, M.P., and Meyerowitz, E.M.** (1993). CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in Arabidopsis. *Development* **119**, 397-418.
- Cleland, E.E., and Harpole, W.S.** (2010). Nitrogen enrichment and plant communities. *Ann N Y Acad Sci* **1195**, 46-61.
- Cullimore, J.V., Ranjeva, R., and Bono, J.J.** (2001). Perception of lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci* **6**, 24-30.
- d'Erfurth, I., Cosson, V., Eschstruth, A., Lucas, H., Kondorosi, A., and Ratet, P.** (2003). Efficient transposition of the Tnt1 tobacco retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J* **34**, 95-106.
- Demont-Caulet, N., Maillet, F., Tailler, D., Jacquinet, J.C., Prome, J.C., Nicolaou, K.C., Truchet, G., Beau, J.M., and Denarie, J.** (1999). Nodule-inducing activity of synthetic *Sinorhizobium meliloti* nodulation factors and related lipo-chitooligosaccharides on alfalfa. Importance of the acyl chain structure. *Plant Physiol* **120**, 83-92.
- den Hartog, M., Musgrave, A., and Munnik, T.** (2001). Nod factor-induced phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate formation: a role for phospholipase C and D in root hair deformation. *Plant Journal* **25**, 55-65.
- Den Herder, G., De Keyser, A., De Rycke, R., Rombauts, S., Van de Velde, W., Clemente, M.R., Verplancke, C., Mergaert, P., Kondorosi, E., Holsters, M., and Goormachtig, S.** (2008). Seven in absentia proteins affect plant growth and nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **148**, 369-382.
- Den Herder, J., Vanhee, C., De Rycke, R., Corich, V., Holsters, M., and Goormachtig, S.** (2007). Nod factor perception during infection thread growth fine-tunes nodulation. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 129-137.
- Denarie, J., Debelle, F., and Rosenberg, C.** (1992). Signaling and host range variation in nodulation. *Annu Rev Microbiol* **46**, 497-531.
- Denarie, J., Debelle, F., and Prome, J.C.** (1996). Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem* **65**, 503-535.
- Dickstein, R., Bisseling, T., Reinhold, V.N., and Ausubel, F.M.** (1988). Expression of nodule-specific genes in alfalfa root nodules blocked at an early stage of development. *Genes Dev* **2**, 677-687.
- Dixon, R.O.D., and Wheeler, C.T.** (1986). *Nitrogen Fixation in Plants.* (New York: Chapman et Hall Press).
- Doyle, J.J.** (1998). Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends in Plant Science* **3**, 473-478.

- Doyle, J.J., and Luckow, M.A.** (2003). The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* **131**, 900-910.
- Ehrhardt, D.W., Atkinson, E.M., and Long, S.R.** (1992). Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* **256**, 998-1000.
- Ehrhardt, D.W., Wais, R., and Long, S.R.** (1996). Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* **85**, 673-681.
- Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kalo, P., and Kiss, G.B.** (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **417**, 962-966.
- Esseling, J.J., and Emons, A.M.** (2004). Dissection of Nod factor signalling in legumes: cell biology, mutants and pharmacological approaches. *J Microsc* **214**, 104-113.
- Esseling, J.J., Lhuissier, F.G., and Emons, A.M.** (2003). Nod factor-induced root hair curling: continuous polar growth towards the point of nod factor application. *Plant Physiol* **132**, 1982-1988.
- Farmer, E.E., Pearce, G., and Ryan, C.A.** (1989). INVITRO PHOSPHORYLATION OF PLANT PLASMA-MEMBRANE PROTEINS IN RESPONSE TO THE PROTEINASE-INHIBITOR INDUCING FACTOR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 1539-1542.
- Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A., and Schultze, M.** (1995). NOD SIGNAL-INDUCED PLASMA-MEMBRANE POTENTIAL CHANGES IN ALFALFA ROOT HAIRS ARE DIFFERENTIALLY SENSITIVE TO STRUCTURAL MODIFICATIONS OF THE LIPOCHITOOLIGOSACCHARIDE. *Plant Journal* **7**, 939-947.
- Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A., and Schultze, M.** (1996). Rapid alkalinization in alfalfa root hairs in response to rhizobial lipochitooligosaccharide signals. *Plant Journal* **10**, 295-301.
- Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A., and Schultze, M.** (1998). The role of ion fluxes in Nod factor signalling in *Medicago sativa*. *Plant Journal* **13**, 455-463.
- Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A., and Schultze, M.** (1999). Elevation of the cytosolic free $[Ca^{2+}]$ is indispensable for the transduction of the Nod factor signal in alfalfa. *Plant Physiol* **121**, 273-280.
- Fernandez-Lopez, M., Goormachtig, S., Gao, M., D'Haese, W., Van Montagu, M., and Holsters, M.** (1998). Ethylene-mediated phenotypic plasticity in root nodule development on *Sesbania rostrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12724-12728.
- Fields, S., and Song, O.** (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Firmin, J.L., Wilson, K.E., Carlson, R.W., Davies, A.E., and Downie, J.A.** (1993). Resistance to nodulation of cv. Afghanistan peas is overcome by nodX, which mediates an O-acetylation of the *Rhizobium leguminosarum* lipo-oligosaccharide nodulation factor. *Mol Microbiol* **10**, 351-360.
- Fisher, R.F., Egelhoff, T.T., Mulligan, J.T., and Long, S.R.** (1988). Specific binding of proteins from *Rhizobium meliloti* cell-free extracts containing NodD to DNA sequences upstream of inducible nodulation genes. *Genes Dev* **2**, 282-293.
- Fournier, J., Timmers, A.C., Sieberer, B.J., Jauneau, A., Chabaud, M., and Barker, D.G.** (2008). Mechanism of infection thread elongation in root hairs of *Medicago truncatula* and dynamic interplay with associated rhizobial colonization. *Plant Physiol* **148**, 1985-1995.
- Gage, D.J.** (2002). Analysis of infection thread development using Gfp- and DsRed-expressing *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **184**, 7042-7046.

- Gage, D.J.** (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 280-300.
- Gagne, J.M., Downes, B.P., Shiu, S.H., Durski, A.M., and Vierstra, R.D.** (2002). The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11519-11524.
- Galibert, F., Finan, T.M., Long, S.R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M.J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R.W., Dreano, S., Federspiel, N.A., Fisher, R.F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R.W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M.L., Kalman, S., Keating, D.H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M.C., Pohl, T.M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thebault, P., Vandenberg, M., Vorholter, F.J., Weidner, S., Wells, D.H., Wong, K., Yeh, K.C., and Batut, J.** (2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**, 668-672.
- Gaworzewska, E.T., and Carlile, M.J.** (1982). POSITIVE CHEMOTAXIS OF RHIZOBIUM-LEGUMINOSARUM AND OTHER BACTERIA TOWARDS ROOT EXUDATES FROM LEGUMES AND OTHER PLANTS. *Journal of General Microbiology* **128**, 1179-1188.
- Geldner, N., and Robatzek, S.** (2008). Plant receptors go endosomal: a moving view on signal transduction. *Plant Physiol* **147**, 1565-1574.
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P., and Barker, D.G.** (2005). Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell* **17**, 3489-3499.
- Genre, A., Chabaud, M., Faccio, A., Barker, D.G., and Bonfante, P.** (2008). Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *Plant Cell* **20**, 1407-1420.
- Geurts, R., Heidstra, R., Hadri, A.E., Downie, J.A., Franssen, H., Van Kammen, A., and Bisseling, T.** (1997). Sym2 of Pea Is Involved in a Nodulation Factor-Perception Mechanism That Controls the Infection Process in the Epidermis. *Plant Physiol* **115**, 351-359.
- Gimenez-Ibanez, S., Ntoukakis, V., and Rathjen, J.P.** (2009a). The LysM receptor kinase CERK1 mediates bacterial perception in Arabidopsis. *Plant Signal Behav* **4**, 539-541.
- Gimenez-Ibanez, S., Hann, D.R., Ntoukakis, V., Petutschnig, E., Lipka, V., and Rathjen, J.P.** (2009b). AvrPtoB targets the LysM receptor kinase CERK1 to promote bacterial virulence on plants. *Curr Biol* **19**, 423-429.
- Gleason, C., Chaudhuri, S., Yang, T., Munoz, A., Poovaiah, B.W., and Oldroyd, G.E.** (2006). Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature* **441**, 1149-1152.
- Glebov, O.O., Bright, N.A., and Nichols, B.J.** (2006). Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol* **8**, 46-54.
- Godfroy, O., Debelle, F., Timmers, T., and Rosenberg, C.** (2006). A rice calcium- and calmodulin-dependent protein kinase restores nodulation to a legume mutant. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 495-501.
- Gohre, V., Spallek, T., Haweker, H., Mersmann, S., Mentzel, T., Boller, T., de Torres, M., Mansfield, J.W., and Robatzek, S.** (2008). Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Curr Biol* **18**, 1824-1832.

- Gomez-Gomez, L., Bauer, Z., and Boller, T.** (2001). Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FSL2 are required for flagellin binding and signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**, 1155-1163.
- Gonzalez-Rizzo, S., Crespi, M., and Frugier, F.** (2006). The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* **18**, 2680-2693.
- Graham, P.H., and Vance, C.P.** (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol* **131**, 872-877.
- Gressent, F., Drouillard, S., Mantegazza, N., Samain, E., Geremia, R.A., Canut, H., Niebel, A., Driguez, H., Ranjeva, R., Cullimore, J., and Bono, J.J.** (1999). Ligand specificity of a high-affinity binding site for lipochitooligosaccharidic Nod factors in *Medicago* cell suspension cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4704-4709.
- Gu, T., Mazzurco, M., Sulaman, W., Matias, D.D., and Goring, D.R.** (1998). Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the S-locus receptor kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 382-387.
- Gualtieri, G., and Bisseling, T.** (2000). The evolution of nodulation. *Plant Mol Biol* **42**, 181-194.
- Handford, P., Downing, A.K., Rao, Z., Hewett, D.R., Sykes, B.C., and Kielty, C.M.** (1995). The calcium binding properties and molecular organization of epidermal growth factor-like domains in human fibrillin-1. *J Biol Chem* **270**, 6751-6756.
- Haney, C.H., and Long, S.R.** (2010). Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 478-483.
- Harrison, M.J.** (2005). Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Microbiol* **59**, 19-42.
- Hata, S., Kobae, Y., and Banba, M.** (2010). Interactions between plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *Int Rev Cell Mol Biol* **281**, 1-48.
- Hatfield, P.M., Gosink, M.M., Carpenter, T.B., and Vierstra, R.D.** (1997). The ubiquitin-activating enzyme (E1) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **11**, 213-226.
- He, J., Benedito, V.A., Wang, M., Murray, J.D., Zhao, P.X., Tang, Y., and Udvardi, M.K.** (2009). The *Medicago truncatula* gene expression atlas web server. *BMC Bioinformatics* **10**, 441.
- Heidstra, R., Geurts, R., Franssen, H., Spaink, H.P., Van Kammen, A., and Bisseling, T.** (1994). Root Hair Deformation Activity of Nodulation Factors and Their Fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol* **105**, 787-797.
- Hester, G., Kaku, H., Goldstein, I.J., and Wright, C.S.** (1995). Structure of mannose-specific snowdrop (*Galanthus nivalis*) lectin is representative of a new plant lectin family. *Nat Struct Biol* **2**, 472-479.
- Hicke, L.** (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 195-201.
- Hink, M.A., Shah, K., Russinova, E., de Vries, S.C., and Visser, A.J.** (2008). Fluorescence fluctuation analysis of *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor-like kinase and brassinosteroid insensitive 1 receptor oligomerization. *Biophys J* **94**, 1052-1062.
- Hirsch, S., Kim, J., Munoz, A., Heckmann, A.B., Downie, J.A., and Oldroyd, G.E.** (2009). GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **21**, 545-557.

- Hogg, B.V., Cullimore, J.V., Ranjeva, R., and Bono, J.J.** (2006). The DMI1 and DMI2 early symbiotic genes of *Medicago truncatula* are required for a high-affinity nodulation factor-binding site associated to a particulate fraction of roots. *Plant Physiol* **140**, 365-373.
- Hong, G.F., Burn, J.E., and Johnston, A.W.** (1987). Evidence that DNA involved in the expression of nodulation (nod) genes in *Rhizobium* binds to the product of the regulatory gene nodD. *Nucleic Acids Res* **15**, 9677-9690.
- Huber, A.H., Nelson, W.J., and Weis, W.I.** (1997). Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* **90**, 871-882.
- Huss-Danell, K.** (1997). Actinorhizal symbioses and their N₂ fixation. *New Phytologist* **136**, 375-405.
- Ivanov, R., and Gaude, T.** (2009). Endocytosis and endosomal regulation of the S-receptor kinase during the self-incompatibility response in *Brassica oleracea*. *Plant Cell* **21**, 2107-2117.
- Ivanov, R., Fobis-Loisy, I., and Gaude, T.** (2010). When no means no: guide to Brassicaceae self-incompatibility. *Trends Plant Sci* **15**, 387-394.
- Journet, E.P., Pichon, M., Dedieu, A., de Billy, F., Truchet, G., and Barker, D.G.** (1994). *Rhizobium meliloti* Nod factors elicit cell-specific transcription of the ENOD12 gene in transgenic alfalfa. *Plant J* **6**, 241-249.
- Journet, E.P., Carreau, V., Gouzy, J., Thoquet, P., Rosenberg, C., Barker, D., Huguet, T., Denarie, J., and Gamas, P.** (2001a). The model legume *Medicago truncatula*: recent advances and perspectives in genomics. *Ocl-Oleagineux Corps Gras Lipides* **8**, 478-484.
- Journet, E.P., El-Gachtouli, N., Vernoud, V., de Billy, F., Pichon, M., Dedieu, A., Arnould, C., Morandi, D., Barker, D.G., and Gianinazzi-Pearson, V.** (2001b). *Medicago truncatula* ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 737-748.
- Kachroo, A., Schopfer, C.R., Nasrallah, M.E., and Nasrallah, J.B.** (2001). Allele-specific receptor-ligand interactions in *Brassica* self-incompatibility. *Science* **293**, 1824-1826.
- Kakita, M., Murase, K., Iwano, M., Matsumoto, T., Watanabe, M., Shiba, H., Isogai, A., and Takayama, S.** (2007). Two distinct forms of M-locus protein kinase localize to the plasma membrane and interact directly with S-locus receptor kinase to transduce self-incompatibility signaling in *Brassica rapa*. *Plant Cell* **19**, 3961-3973.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiya, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., and Shibuya, N.** (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11086-11091.
- Kalo, P., Gleason, C., Edwards, A., Marsh, J., Mitra, R.M., Hirsch, S., Jakab, J., Sims, S., Long, S.R., Rogers, J., Kiss, G.B., Downie, J.A., and Oldroyd, G.E.** (2005). Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* **308**, 1786-1789.
- Kape, R., Parniske, M., and Werner, D.** (1991). Chemotaxis and nod Gene Activity of *Bradyrhizobium japonicum* in Response to Hydroxycinnamic Acids and Isoflavonoids. *Appl Environ Microbiol* **57**, 316-319.
- Karlowski, W.M., and Hirsch, A.M.** (2003). The over-expression of an alfalfa RING-H2 gene induces pleiotropic effects on plant growth and development. *Plant Mol Biol* **52**, 121-133.
- Kemp, B.P., and Doughty, J.** (2003). Just how complex is the *Brassica* S-receptor complex? *J Exp Bot* **54**, 157-168.
- Kevei, Z., Lounnon, G., Mergaert, P., Horvath, G.V., Kereszt, A., Jayaraman, D., Zaman, N., Marcel, F., Regulski, K., Kiss, G.B., Kondorosi, A., Endre, G., Kondorosi, E., and Ane, J.M.** (2007). 3-hydroxy-3-

- methylglutaryl coenzyme a reductase 1 interacts with NORK and is crucial for nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **19**, 3974-3989.
- Kim, M., Cho, H.S., Kim, D.M., Lee, J.H., and Pai, H.S.** (2003). CHRK1, a chitinase-related receptor-like kinase, interacts with NtPUB4, an armadillo repeat protein, in tobacco. *Biochim Biophys Acta* **1651**, 50-59.
- Kim, T.W., and Wang, Z.Y.** (2010). Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annu Rev Plant Biol* **61**, 681-704.
- Kinoshita, T., Cano-Delgado, A., Seto, H., Hiranuma, S., Fujioka, S., Yoshida, S., and Chory, J.** (2005). Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature* **433**, 167-171.
- Kiss, E., Olah, B., Kalo, P., Morales, M., Heckmann, A.B., Borbola, A., Lozsa, A., Kontar, K., Middleton, P., Downie, J.A., Oldroyd, G.E., and Endre, G.** (2009). LIN, a novel type of U-box/WD40 protein, controls early infection by rhizobia in legumes. *Plant Physiol* **151**, 1239-1249.
- Kobe, B., and Deisenhofer, J.** (1994). The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci* **19**, 415-421.
- Komander, D.** (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans* **37**, 937-953.
- Kosuta, S., Hazledine, S., Sun, J., Miwa, H., Morris, R.J., Downie, J.A., and Oldroyd, G.E.** (2008). Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9823-9828.
- Kuppusamy, K.T., Endre, G., Prabhu, R., Penmetsa, R.V., Veereshlingam, H., Cook, D.R., Dickstein, R., and Vandenbosch, K.A.** (2004). LIN, a *Medicago truncatula* gene required for nodule differentiation and persistence of rhizobial infections. *Plant Physiol* **136**, 3682-3691.
- Larsson, C., Widell, S., and Kjellbom, B.** (1987). Preparation of high-purity plasma membranes. *Methods Enzymol.* **148**, 558-568.
- Laus, M.C., Logman, T.J., Lamers, G.E., Van Brussel, A.A., Carlson, R.W., and Kijne, J.W.** (2006). A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. *Mol Microbiol* **59**, 1704-1713.
- Le Signor, C., Savoie, V., Aubert, G., Verdier, J., Nicolas, M., Pagny, G., Moussy, F., Sanchez, M., Baker, D., Clarke, J., and Thompson, R.** (2009). Optimizing TILLING populations for reverse genetics in *Medicago truncatula*. *Plant Biotechnol J* **7**, 430-441.
- Lefebvre, B., Batoko, H., Duby, G., and Boutry, M.** (2004). Targeting of a *Nicotiana plumbaginifolia* H⁺-ATPase to the plasma membrane is not by default and requires cytosolic structural determinants. *Plant Cell* **16**, 1772-1789.
- Lefebvre, B., Furt, F., Hartmann, M.A., Michaelson, L.V., Carde, J.P., Sargueil-Boiron, F., Rossignol, M., Napier, J.A., Cullimore, J., Bessoule, J.J., and Mongrand, S.** (2007). Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *Plant Physiol* **144**, 402-418.
- Lefebvre, B., Timmers, T., Mbengue, M., Moreau, S., Herve, C., Toth, K., Bittencourt-Silvestre, J., Klaus, D., Deslandes, L., Godiard, L., Murray, J.D., Udvardi, M.K., Raffaele, S., Mongrand, S., Cullimore, J., Gamas, P., Niebel, A., and Ott, T.** (2010). A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 2343-2348.

- Leigh, J.A., Signer, E.R., and Walker, G.C.** (1985). Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 6231-6235.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Prome, J.C., and Denarie, J.** (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**, 781-784.
- Levy, J., Bres, C., Geurts, R., Chalhoub, B., Kulikova, O., Duc, G., Journet, E.P., Ane, J.M., Lauber, E., Bisseling, T., Denarie, J., Rosenberg, C., and Debelle, F.** (2004). A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* **303**, 1361-1364.
- Li, J., and Chory, J.** (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* **90**, 929-938.
- Libault, M., Farmer, A., Joshi, T., Takahashi, K., Langley, R.J., Franklin, L.D., He, J., Xu, D., May, G., and Stacey, G.** (2010). An integrated transcriptome atlas of the crop model *Glycine max*, and its use in comparative analyses in plants. *Plant J* **63**, 86-99.
- Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemse, J., Bisseling, T., and Geurts, R.** (2003). LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* **302**, 630-633.
- Liu, H., and Stone, S.L.** (2010). Abscisic Acid Increases Arabidopsis ABI5 Transcription Factor Levels by Promoting KEG E3 Ligase Self-Ubiquitination and Proteasomal Degradation. *Plant Cell*.
- Liu, J., Maldonado-Mendoza, I., Lopez-Meyer, M., Cheung, F., Town, C.D., and Harrison, M.J.** (2007). Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant J* **50**, 529-544.
- Long, S.R.** (1989). *Rhizobium-legume* nodulation: life together in the underground. *Cell* **56**, 203-214.
- Luo, J., Shen, G., Yan, J., He, C., and Zhang, H.** (2006). AtCHIP functions as an E3 ubiquitin ligase of protein phosphatase 2A subunits and alters plant response to abscisic acid treatment. *Plant J* **46**, 649-657.
- Madsen, E.B., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., and Stougaard, J.** (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* **425**, 637-640.
- Madsen, L.H., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J.T., Heckmann, A.B., Bek, A.S., Ronson, C.W., James, E.K., and Stougaard, J.** (2010). The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat Commun* **1**, 12.
- Magori, S., and Kawaguchi, M.** (2009). Long-distance control of nodulation: molecules and models. *Mol Cells* **27**, 129-134.
- Marsh, J.F., Rakocevic, A., Mitra, R.M., Brocard, L., Sun, J., Eschstruth, A., Long, S.R., Schultze, M., Ratet, P., and Oldroyd, G.E.** (2007). *Medicago truncatula* NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiol* **144**, 324-335.
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., and Batut, J.** (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol* **17**, 458-466.
- Maudoux, O., Batoko, H., Oecking, C., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Boutry, M., and Morsomme, P.** (2000). A plant plasma membrane H⁺-ATPase expressed in yeast is activated by phosphorylation at its

- penultimate residue and binding of 14-3-3 regulatory proteins in the absence of fusicoccin. *J Biol Chem* **275**, 17762-17770.
- Messinese, E., Mun, J.H., Yeun, L.H., Jayaraman, D., Rouge, P., Barre, A., Lougnon, G., Schornack, S., Bono, J.J., Cook, D.R., and Ane, J.M.** (2007). A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 912-921.
- Middleton, P.H., Jakab, J., Penmetsa, R.V., Starker, C.G., Doll, J., Kalo, P., Prabhu, R., Marsh, J.F., Mitra, R.M., Kereszt, A., Dudas, B., VandenBosch, K., Long, S.R., Cook, D.R., Kiss, G.B., and Oldroyd, G.E.** (2007). An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for Nod factor signal transduction. *Plant Cell* **19**, 1221-1234.
- Mitra, R.M., Shaw, S.L., and Long, S.R.** (2004a). Six nonnodulating plant mutants defective for Nod factor-induced transcriptional changes associated with the legume-rhizobia symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10217-10222.
- Mitra, R.M., Gleason, C.A., Edwards, A., Hadfield, J., Downie, J.A., Oldroyd, G.E., and Long, S.R.** (2004b). A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4701-4705.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., and Shibuya, N.** (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19613-19618.
- Morandi, D., Prado, E., Sagan, M., and Duc, G.** (2005). Characterisation of new symbiotic *Medicago truncatula* (Gaertn.) mutants, and phenotypic or genotypic complementary information on previously described mutants. *Mycorrhiza* **15**, 283-289.
- Mudgil, Y., Shiu, S.H., Stone, S.L., Salt, J.N., and Goring, D.R.** (2004). A large complement of the predicted *Arabidopsis* ARM repeat proteins are members of the U-box E3 ubiquitin ligase family. *Plant Physiol* **134**, 59-66.
- Mulligan, J.T., and Long, S.R.** (1985). Induction of *Rhizobium meliloti* nodC expression by plant exudate requires nodD. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 6609-6613.
- Murase, K., Shiba, H., Iwano, M., Che, F.S., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S.** (2004). A membrane-anchored protein kinase involved in *Brassica* self-incompatibility signaling. *Science* **303**, 1516-1519.
- Murray, J.D., Karas, B.J., Sato, S., Tabata, S., Amyot, L., and Szczyglowski, K.** (2007). A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science* **315**, 101-104.
- Nam, K.H., and Li, J.** (2002). BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* **110**, 203-212.
- Niehaus, K., and Becker, A.** (1998). The role of microbial surface polysaccharides in the *Rhizobium*-legume interaction. *Subcell Biochem* **29**, 73-116.
- Nishimura, R., Ohmori, M., Fujita, H., and Kawaguchi, M.** (2002). A Lotus basic leucine zipper protein with a RING-finger motif negatively regulates the developmental program of nodulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15206-15210.
- Oldroyd, G.E., and Long, S.R.** (2003). Identification and characterization of nodulation-signaling pathway 2, a gene of *Medicago truncatula* involved in Nod factor signaling. *Plant Physiol* **131**, 1027-1032.

- Oldroyd, G.E., and Downie, J.A.** (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 519-546.
- Ott, T., van Dongen, J.T., Gunther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P., and Udvardi, M.K.** (2005). Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr Biol* **15**, 531-535.
- Parniske, M.** (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol* **6**, 763-775.
- Patriarca, E.J., Tate, R., Ferraioli, S., and Iaccarino, M.** (2004). Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol* **234**, 201-262.
- Patterson, C.** (2002). A new gun in town: the U box is a ubiquitin ligase domain. *Sci STKE* **2002**, pe4.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., and Gygi, S.P.** (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* **21**, 921-926.
- Penmetza, R.V., Frugoli, J.A., Smith, L.S., Long, S.R., and Cook, D.R.** (2003). Dual genetic pathways controlling nodule number in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **131**, 998-1008.
- Penmetza, R.V., Uribe, P., Anderson, J., Lichtenzweig, J., Gish, J.C., Nam, Y.W., Engstrom, E., Xu, K., Sckisel, G., Pereira, M., Baek, J.M., Lopez-Meyer, M., Long, S.R., Harrison, M.J., Singh, K.B., Kiss, G.B., and Cook, D.R.** (2008). The *Medicago truncatula* ortholog of *Arabidopsis* EIN2, sickle, is a negative regulator of symbiotic and pathogenic microbial associations. *Plant J* **55**, 580-595.
- Peters, N.K., and Long, S.R.** (1988). Alfalfa Root Exudates and Compounds which Promote or Inhibit Induction of *Rhizobium meliloti* Nodulation Genes. *Plant Physiol* **88**, 396-400.
- Peters, N.K., Frost, J.W., and Long, S.R.** (1986). A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* **233**, 977-980.
- Petutschnig, E.K., Jones, A.M., Serazetdinova, L., Lipka, U., and Lipka, V.** (2010). The LysM-RLK CERK1 is a major chitin binding protein in *Arabidopsis thaliana* and subject to chitin-induced phosphorylation. *J Biol Chem*.
- Pingret, J.L., Journet, E.P., and Barker, D.G.** (1998). *Rhizobium* nod factor signaling. Evidence for a g protein-mediated transduction mechanism. *Plant Cell* **10**, 659-672.
- Pueppke, S.G., and Broughton, W.J.** (1999). *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol Plant Microbe Interact* **12**, 293-318.
- Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Jurkiewicz, A., Fukai, E., Quistgaard, E.M., Albrektsen, A.S., James, E.K., Thirup, S., and Stougaard, J.** (2007). LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range. *Embo J* **26**, 3923-3935.
- Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Felle, H.H., Umehara, Y., Gronlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., and Stougaard, J.** (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* **425**, 585-592.
- Raffaele, S., Bayer, E., and Mongrand, S.** (2009a). Upregulation of the plant protein remorin correlates with dehiscence and cell maturation: A link with the maturation of plasmodesmata? *Plant Signal Behav* **4**.
- Raffaele, S., Mongrand, S., Gamas, P., Niebel, A., and Ott, T.** (2007). Genome-wide annotation of remorins, a plant-specific protein family: evolutionary and functional perspectives. *Plant Physiol* **145**, 593-600.
- Raffaele, S., Bayer, E., Lafarge, D., Cluzet, S., German Retana, S., Boubekeur, T., Leborgne-Castel, N., Carde, J.P., Lherminier, J., Noirot, E., Satiat-Jeunemaitre, B., Laroche-Traineau, J., Moreau, P., Ott, T.,**

- Maule, A.J., Reymond, P., Simon-Plas, F., Farmer, E.E., Bessoule, J.J., and Mongrand, S.** (2009b). Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. *Plant Cell* **21**, 1541-1555.
- Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H., and Kerp, H.** (1994). Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11841-11843.
- Reyes-Prieto, A., Weber, A.P., and Bhattacharya, D.** (2007). The origin and establishment of the plastid in algae and plants. *Annu Rev Genet* **41**, 147-168.
- Reymond, P., Kunz, B., Paul-Pletzer, K., Grimm, R., Eckerskorn, C., and Farmer, E.E.** (1996). Cloning of a cDNA encoding a plasma membrane-associated, uronide binding phosphoprotein with physical properties similar to viral movement proteins. *Plant Cell* **8**, 2265-2276.
- Riely, B.K., Lougnon, G., Ane, J.M., and Cook, D.R.** (2007). The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots. *Plant J* **49**, 208-216.
- Robertson, S.C., Tynan, J., and Donoghue, D.J.** (2000). RTK mutations and human syndromes: when good receptors turn bad. *Trends Genet* **16**, 368.
- Roche, P., Lerouge, P., Ponthus, C., and Prome, J.C.** (1991). Structural determination of bacterial nodulation factors involved in the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *J Biol Chem* **266**, 10933-10940.
- Roche, P., Maillet, F., Plazanet, C., Debelle, F., Ferro, M., Truchet, G., Prome, J.C., and Denarie, J.** (1996). The common nodABC genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 15305-15310.
- Rogers, C., Wen, J., Chen, R., and Oldroyd, G.** (2009). Deletion-based reverse genetics in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **151**, 1077-1086.
- Roth, L.E., and Stacey, G.** (1989). Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources. *Eur J Cell Biol* **49**, 13-23.
- Russinova, E., Borst, J.W., Kwaaitaal, M., Cano-Delgado, A., Yin, Y., Chory, J., and de Vries, S.C.** (2004). Heterodimerization and endocytosis of *Arabidopsis* brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). *Plant Cell* **16**, 3216-3229.
- Samuel, M.A., Salt, J.N., Shiu, S.H., and Goring, D.R.** (2006). Multifunctional arm repeat domains in plants. *Int Rev Cytol* **253**, 1-26.
- Samuel, M.A., Chong, Y.T., Haasen, K.E., Aldea-Brydges, M.G., Stone, S.L., and Goring, D.R.** (2009). Cellular pathways regulating responses to compatible and self-incompatible pollen in *Brassica* and *Arabidopsis* stigmas intersect at Exo70A1, a putative component of the exocyst complex. *Plant Cell* **21**, 2655-2671.
- Samuel, M.A., Mudgil, Y., Salt, J.N., Delmas, F., Ramachandran, S., Chilelli, A., and Goring, D.R.** (2008). Interactions between the S-domain receptor kinases and AtPUB-ARM E3 ubiquitin ligases suggest a conserved signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **147**, 2084-2095.
- Sawada, H., Kuykendall, L.D., and Young, J.M.** (2003). Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J Gen Appl Microbiol* **49**, 155-179.
- Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J., and Stougaard, J.** (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* **402**, 191-195.
- Scheres, B., van Engelen, F., van der Knaap, E., van de Wiel, C., van Kammen, A., and Bisseling, T.** (1990). Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *Plant Cell* **2**, 687-700.

- Schlessinger, J.** (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-225.
- Schnabel, E., Journet, E.P., de Carvalho-Niebel, F., Duc, G., and Frugoli, J.** (2005). The *Medicago truncatula* SUNN gene encodes a CLV1-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length. *Plant Mol Biol* **58**, 809-822.
- Schnell, J.D., and Hicke, L.** (2003). Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* **278**, 35857-35860.
- Schopfer, C.R., Nasrallah, M.E., and Nasrallah, J.B.** (1999). The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* **286**, 1697-1700.
- Schultze, M., and Kondorosi, A.** (1998). Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu Rev Genet* **32**, 33-57.
- Shaw, S.L., and Long, S.R.** (2003). Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* root hair cells. *Plant Physiol* **131**, 976-984.
- Shimomura, K., Nomura, M., Tajima, S., and Kouchi, H.** (2006). LjnsRING, a novel RING finger protein, is required for symbiotic interactions between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol* **47**, 1572-1581.
- Shinya, T., Osada, T., Desaki, Y., Hatamoto, M., Yamanaka, Y., Hirano, H., Takai, R., Che, F.S., Kaku, H., and Shibuya, N.** (2009). Characterization of receptor proteins using affinity cross-linking with biotinylated ligands. *Plant Cell Physiol* **51**, 262-270.
- Shiu, S.H., and Bleecker, A.B.** (2001a). Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10763-10768.
- Shiu, S.H., and Bleecker, A.B.** (2001b). Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Sci STKE* **2001**, re22.
- Sieberer, B.J., Timmers, A.C., and Emons, A.M.** (2005a). Nod factors alter the microtubule cytoskeleton in *Medicago truncatula* root hairs to allow root hair reorientation. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 1195-1204.
- Sieberer, B.J., Ketelaar, T., Esseling, J.J., and Emons, A.M.** (2005b). Microtubules guide root hair tip growth. *New Phytol* **167**, 711-719.
- Sieberer, B.J., Chabaud, M., Timmers, A.C., Monin, A., Fournier, J., and Barker, D.G.** (2009). A nuclear-targetedameleon demonstrates intranuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* root hairs in response to rhizobial nodulation factors. *Plant Physiol* **151**, 1197-1206.
- Smalle, J., and Vierstra, R.D.** (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 555-590.
- Smit, G., Kijne, J.W., and Lugtenberg, B.J.** (1987). Involvement of both cellulose fibrils and a Ca²⁺-dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *J Bacteriol* **169**, 4294-4301.
- Smit, P., Raedts, J., Portyanko, V., Debelle, F., Gough, C., Bisseling, T., and Geurts, R.** (2005). NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* **308**, 1789-1791.
- Smit, P., Limpens, E., Geurts, R., Fedorova, E., Dolgikh, E., Gough, C., and Bisseling, T.** (2007). *Medicago* LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. *Plant Physiol* **145**, 183-191.
- Spaink, H.P., Sheeley, D.M., van Brussel, A.A., Glushka, J., York, W.S., Tak, T., Geiger, O., Kennedy, E.P., Reinhold, V.N., and Lugtenberg, B.J.** (1991). A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipooligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature* **354**, 125-130.

- Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N., and te Heesen, S.** (1998). A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5187-5192.
- Steen, A., Buist, G., Horsburgh, G.J., Venema, G., Kuipers, O.P., Foster, S.J., and Kok, J.** (2005). AcmA of *Lactococcus lactis* is an N-acetylglucosaminidase with an optimal number of LysM domains for proper functioning. *FEBS J* **272**, 2854-2868.
- Steen, A., Buist, G., Leenhouts, K.J., El Khattabi, M., Grijpstra, F., Zomer, A.L., Venema, G., Kuipers, O.P., and Kok, J.** (2003). Cell wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain is hindered by cell wall constituents. *J Biol Chem* **278**, 23874-23881.
- Stone, S.L., Arnoldo, M., and Goring, D.R.** (1999). A breakdown of Brassica self-incompatibility in ARC1 antisense transgenic plants. *Science* **286**, 1729-1731.
- Stone, S.L., Anderson, E.M., Mullen, R.T., and Goring, D.R.** (2003). ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible Brassica pollen. *Plant Cell* **15**, 885-898.
- Stougaard, J.** (2001). Genetics and genomics of root symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 328-335.
- Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczyglowski, K., and Parniske, M.** (2002). A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* **417**, 959-962.
- Subramanian, S., Stacey, G., and Yu, O.** (2006). Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant J* **48**, 261-273.
- Subramanian, S., Stacey, G., and Yu, O.** (2007). Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends Plant Sci* **12**, 282-285.
- Sun, J., Miwa, H., Downie, J.A., and Oldroyd, G.E.** (2007). Mastoparan activates calcium spiking analogous to Nod factor-induced responses in *Medicago truncatula* root hair cells. *Plant Physiol* **144**, 695-702.
- Swaminathan, G., and Tsygankov, A.Y.** (2006). The Cbl family proteins: ring leaders in regulation of cell signaling. *J Cell Physiol* **209**, 21-43.
- Tadege, M., Wen, J., He, J., Tu, H., Kwak, Y., Eschstruth, A., Cayrel, A., Endre, G., Zhao, P.X., Chabaud, M., Ratet, P., and Mysore, K.S.** (2008). Large-scale insertional mutagenesis using the Tnt1 retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J* **54**, 335-347.
- Takasaki, T., Hatakeyama, K., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., and Hinata, K.** (2000). The S receptor kinase determines self-incompatibility in Brassica stigma. *Nature* **403**, 913-916.
- Tang, W., Deng, Z., Oses-Prieto, J.A., Suzuki, N., Zhu, S., Zhang, X., Burlingame, A.L., and Wang, Z.Y.** (2008a). Proteomics studies of brassinosteroid signal transduction using prefractionation and two-dimensional DIGE. *Mol Cell Proteomics* **7**, 728-738.
- Tang, W., Kim, T.W., Oses-Prieto, J.A., Sun, Y., Deng, Z., Zhu, S., Wang, R., Burlingame, A.L., and Wang, Z.Y.** (2008b). BSKs mediate signal transduction from the receptor kinase BRI1 in Arabidopsis. *Science* **321**, 557-560.
- Taylor, L.P., and Grotewold, E.** (2005). Flavonoids as developmental regulators. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 317-323.
- Thoquet, P., Gherardi, M., Journet, E.P., Kereszt, A., Ane, J.M., Prospero, J.M., and Huguet, T.** (2002). The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula*: an essential tool for comparative legume genomics and the isolation of agronomically important genes. *BMC Plant Biol* **2**, 1.

- Timmers, A.C., Auriac, M.C., and Truchet, G.** (1999). Refined analysis of early symbiotic steps of the Rhizobium-Medicago interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* **126**, 3617-3628.
- Tirichine, L., Sandal, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Albrektsen, A.S., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., and Stougaard, J.** (2007). A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science* **315**, 104-107.
- Tirichine, L., Imaizumi-Anraku, H., Yoshida, S., Murakami, Y., Madsen, L.H., Miwa, H., Nakagawa, T., Sandal, N., Albrektsen, A.S., Kawaguchi, M., Downie, A., Sato, S., Tabata, S., Kouchi, H., Parniske, M., Kawasaki, S., and Stougaard, J.** (2006). Deregulation of a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature* **441**, 1153-1156.
- Trujillo, M., Ichimura, K., Casais, C., and Shirasu, K.** (2008). Negative regulation of PAMP-triggered immunity by an E3 ubiquitin ligase triplet in Arabidopsis. *Curr Biol* **18**, 1396-1401.
- van Brussel, A.A., Bakhuizen, R., van Spronsen, P.C., Spaink, H.P., Tak, T., Lugtenberg, B.J., and Kijne, J.W.** (1992). Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipooligosaccharides of Rhizobium. *Science* **257**, 70-72.
- van Spronsen, P.C., Bakhuizen, R., van Brussel, A.A., and Kijne, J.W.** (1994). Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium Rhizobium leguminosarum is a two-step process. *Eur J Cell Biol* **64**, 88-94.
- Vance, C.P.** (2001). Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiol* **127**, 390-397.
- Vasse, J., de Billy, F., Camut, S., and Truchet, G.** (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J Bacteriol* **172**, 4295-4306.
- Vega-Sanchez, M.E., Zeng, L., Chen, S., Leung, H., and Wang, G.L.** (2008). SPIN1, a K homology domain protein negatively regulated and ubiquitinated by the E3 ubiquitin ligase SPL11, is involved in flowering time control in rice. *Plant Cell* **20**, 1456-1469.
- Vernie, T., Moreau, S., de Billy, F., Plet, J., Combier, J.P., Rogers, C., Oldroyd, G., Frugier, F., Niebel, A., and Gamas, P.** (2008). EFD Is an ERF transcription factor involved in the control of nodule number and differentiation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **20**, 2696-2713.
- Vernoud, V., Journet, E.P., and Barker, D.G.** (1999). MtENOD20, a Nod Factor-Inducible Molecular Marker for Root Cortical Cell Activation. *MPMI* **12**, 10.
- Vierstra, R.D.** (2003). The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci* **8**, 135-142.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., and Baulcombe, D.** (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* **33**, 949-956.
- Wais, R.J., Keating, D.H., and Long, S.R.** (2002). Structure-function analysis of nod factor-induced root hair calcium spiking in Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Physiol* **129**, 211-224.
- Wais, R.J., Galera, C., Oldroyd, G., Catoira, R., Penmetza, R.V., Cook, D., Gough, C., Denarie, J., and Long, S.R.** (2000). Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13407-13412.

- Wang, G.L., Ruan, D.L., Song, W.Y., Sideris, S., Chen, L., Pi, L.Y., Zhang, S., Zhang, Z., Fauquet, C., Gaut, B.S., Whalen, M.C., and Ronald, P.C. (1998). Xa21D encodes a receptor-like molecule with a leucine-rich repeat domain that determines race-specific recognition and is subject to adaptive evolution. *Plant Cell* **10**, 765-779.
- Wang, X., and Chory, J. (2006). Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. *Science* **313**, 1118-1122.
- Wang, X., Li, X., Meisenhelder, J., Hunter, T., Yoshida, S., Asami, T., and Chory, J. (2005a). Autoregulation and homodimerization are involved in the activation of the plant steroid receptor BRI1. *Dev Cell* **8**, 855-865.
- Wang, X., Kota, U., He, K., Blackburn, K., Li, J., Goshe, M.B., Huber, S.C., and Clouse, S.D. (2008). Sequential transphosphorylation of the BRI1/BAK1 receptor kinase complex impacts early events in brassinosteroid signaling. *Dev Cell* **15**, 220-235.
- Wang, X., Goshe, M.B., Soderblom, E.J., Phinney, B.S., Kuchar, J.A., Li, J., Asami, T., Yoshida, S., Huber, S.C., and Clouse, S.D. (2005b). Identification and functional analysis of in vivo phosphorylation sites of the Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase. *Plant Cell* **17**, 1685-1703.
- Wang, Y.S., Pi, L.Y., Chen, X., Chakrabarty, P.K., Jiang, J., De Leon, A.L., Liu, G.Z., Li, L., Benny, U., Oard, J., Ronald, P.C., and Song, W.Y. (2006). Rice XA21 binding protein 3 is a ubiquitin ligase required for full Xa21-mediated disease resistance. *Plant Cell* **18**, 3635-3646.
- Wang, Z.Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S., and Chory, J. (2001). BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* **410**, 380-383.
- Wasson, A.P., Pellerone, F.I., and Mathesius, U. (2006). Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. *Plant Cell* **18**, 1617-1629.
- Watarai, M., Makino, S., Fujii, Y., Okamoto, K., and Shirahata, T. (2002). Modulation of Brucella-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell Microbiol* **4**, 341-355.
- Xiang, T., Zong, N., Zou, Y., Wu, Y., Zhang, J., Xing, W., Li, Y., Tang, X., Zhu, L., Chai, J., and Zhou, J.M. (2008). *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Curr Biol* **18**, 74-80.
- Yan, J., Wang, J., Li, Q., Hwang, J.R., Patterson, C., and Zhang, H. (2003). AtCHIP, a U-box-containing E3 ubiquitin ligase, plays a critical role in temperature stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol* **132**, 861-869.
- Yang, C.W., Gonzalez-Lamothe, R., Ewan, R.A., Rowland, O., Yoshioka, H., Shenton, M., Ye, H., O'Donnell, E., Jones, J.D., and Sadanandom, A. (2006). The E3 ubiquitin ligase activity of Arabidopsis PLANT U-BOX17 and its functional tobacco homolog ACRE276 are required for cell death and defense. *Plant Cell* **18**, 1084-1098.
- Yano, K., Shibata, S., Chen, W.L., Sato, S., Kaneko, T., Jurkiewicz, A., Sandal, N., Banba, M., Imaizumi-Anraku, H., Kojima, T., Ohtomo, R., Szczyglowski, K., Stougaard, J., Tabata, S., Hayashi, M., Kouchi, H., and Umehara, Y. (2009). CERBERUS, a novel U-box protein containing WD-40 repeats, is required for formation of the infection thread and nodule development in the legume-Rhizobium symbiosis. *Plant J* **60**, 168-180.
- Yano, K., Yoshida, S., Muller, J., Singh, S., Banba, M., Vickers, K., Markmann, K., White, C., Schuller, B., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Murooka, Y., Perry, J., Wang, T.L., Kawaguchi, M., Imaizumi-

- Anraku, H., Hayashi, M., and Parniske, M.** (2008). CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20540-20545.
- Yee, D., and Goring, D.R.** (2009). The diversity of plant U-box E3 ubiquitin ligases: from upstream activators to downstream target substrates. *J Exp Bot* **60**, 1109-1121.
- Zaat, S.A., Schripsema, J., Wijffelman, C.A., van Brussel, A.A., and Lugtenberg, B.J.** (1989). Analysis of the major inducers of the *Rhizobium nodA* promoter from *Vicia sativa* root exudate and their activity with different *nodD* genes. *Plant Mol Biol* **13**, 175-188.
- Zeng, L.R., Park, C.H., Venu, R.C., Gough, J., and Wang, G.L.** (2008). Classification, expression pattern, and E3 ligase activity assay of rice U-box-containing proteins. *Mol Plant* **1**, 800-815.
- Zeng, L.R., Qu, S., Bordeos, A., Yang, C., Baraoidan, M., Yan, H., Xie, Q., Nahm, B.H., Leung, H., and Wang, G.L.** (2004). Spotted leaf11, a negative regulator of plant cell death and defense, encodes a U-box/armadillo repeat protein endowed with E3 ubiquitin ligase activity. *Plant Cell* **16**, 2795-2808.
- Zhu, H., Choi, H.K., Cook, D.R., and Shoemaker, R.C.** (2005). Bridging model and crop legumes through comparative genomics. *Plant Physiol* **137**, 1189-1196.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D., Boller, T., and Felix, G.** (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* **125**, 749-760.

Author: Malick Mbengue

Title: Transduction of the bacterial Nod factor signal in the establishment of the legume-rhizobia symbiosis: searching for partners of a putative Nod factor receptor of *Medicago truncatula*

Thesis supervisors: Julie Cullimore and Benoît Lefebvre

Abstract:

Leguminous plants can establish symbiotic interaction with nitrogen fixing soil-born bacteria collectively referred as rhizobia. Nod factors (NFs) are rhizobia produced molecules essential to the establishment of this interaction. Genetic studies of the NFs perception in *M. truncatula* led to the identification of two LysM receptor-like kinases, NFP and LYK3. NFP is necessary for all NFs induced responses while LYK3 specifically controls infection.

Signalling events downstream LYK3 are poorly understood. To decipher this signalling pathway, two different yeast two-hybrid screens using *M. truncatula* cDNAs and LYK3 kinase as bait were performed. One screen identified an E3 ubiquitin ligase of the U-Box family renamed *MtPUB1*. *MtPUB1* plays a negative role in infection and nodulation, and as for LYK3, this role relies on the NFs structure produced by the rhizobia. In parallel, a second approach based on pairwise interaction assays identified a remorin protein as partner of all three symbiotic receptor-like kinases, NFP, LYK3 and DMI2.

Key words: *Medicago truncatula*, *Sinorhizobium meliloti*, Symbiosis, Nodulation, LysM-RLK, LYK3, Nod factors, E3 ubiquitin ligase, Ubiquitination, Remorin, Infection.

Laboratory: Laboratoire des Interactions Plantes – Microorganismes CNRS/INRA 2594/441, Chemin de Borde-Rouge, BP52627, 31326, Castanet-Tolosan Cedex

