



Université
de Toulouse

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 Tom LALOUM
Le 25 mars 2013

Titre : *Etude du rôle des facteurs de transcription MtNF-YA1 et MtNF-YA2 dans les étapes précoces de la symbiose rhizobienne chez Medicago truncatula*

JURY

Matthieu ARLAT, Professeur de l'Université Paul Sabatier, Toulouse, Président du jury
Sofie GOORMACHTIG, Professeur de l'Université de Gent, Belgique, Rapporteur
Frédéric GAYMARD, Directeur de Recherche INRA, Montpellier, Rapporteur
Loïc LEPINIEC, Directeur de Recherche INRA, Versailles, Examineur
Clare GOUGH, Directrice de Recherche CNRS, Examineur
Andreas NIEBEL, Directeur de Recherche CNRS, Toulouse, Examineur

Ecole doctorale : *Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques, Bioingénieries*
Unité de recherche : *LIPM, UMR 2594, INRA-CNRS*
Directeur(s) de Thèse : *Andreas NIEBEL*
Rapporteurs : *Sofie GOORMACHTIG, Frédéric GAYMARD*

Remerciements:

Sans tomber dans une philosophie de comptoir, cette thèse a été pour moi l'école de la vie. Au cours de ces trois années, c'est grâce à beaucoup de personnes que j'ai pu grandir, murir, m'épanouir, rigoler, déconner, apprendre, douter, pour finalement me construire encore un peu plus... Alors, dans l'objectif de rester le plus naturel possible, ce sera sans adopter de style d'écriture bien distingué que j'énoncerai ici ces personnes qui ont particulièrement compté pour moi.

A Andreas:

Je te remercie pour ton encadrement et tous tes conseils qui m'ont aidé à avancer tout au long de la thèse. Même si nous n'avons pas toujours eu des points de vue convergents, je te suis très reconnaissant d'avoir respecté les miens. Tu as très largement contribué à me forger une identité de chercheur mais également de personne humaine, ce qui restera pour moi la chose la plus importante.

Au delà de la science, merci pour m'avoir fait partager ta culture musicale. Maintenant, je penserai à toi en écoutant pas mal de groupes!

A Fernanda:

Je te suis extrêmement reconnaissant de l'aide que tu m'as apportée, des conseils tout le temps utiles. Tu m'as beaucoup aidé à ne pas paniquer quand un résultat n'allait pas dans le sens que j'espérais. J'ai vraiment apprécié travailler avec les ERN girls. Des discussions toujours intéressantes, parfois spéculatives (mais à quoi sert la recherche si on ne peut pas spéculer un peu de temps en temps?!): "alors si NSP1/NSP2 agit en amont de ERN1, que NF-YA1 est induit par les NFs dans *nsp* et dans *bit1*, alors où il se trouve????!!! et NIN dans tout ça, on le place où?????!!!" En tant que spécialiste des FTs dans la voie de signalisation NF, tu m'as toujours indiqué la bonne direction à prendre, et je t'en suis très reconnaissant!

A Pascal:

Je te remercie d'avoir su être présent dans les bons moments comme dans les plus difficiles. J'ai également beaucoup apprécié nos discussions scientifiques très fructifiantes qui m'ont souvent aidé à prendre le recul nécessaire sur mes résultats, et sur les avancées scientifiques importantes dans le petit monde de la symbiose. Ta curiosité et ton ouverture d'esprit ont été pour moi exemplaires au cours de cette thèse. Merci pour ta bonne humeur et tout le reste!

A Françoise:

Qu'est ce que j'aurai pas fait sans toi ma grande!! Je ne sais pas trop par où commencer... Au niveau scientifique déjà, je te remercie pour les conseils très utiles tout au long de la thèse, pour tes analyses stats qui m'ont permis de trancher objectivement sur la qualité des résultats que j'ai produits. Merci pour les quelques caissons que tu m'as aidé à remplir, et encore plein d'autres choses... Pour ta disponibilité quoi!

Et puis au niveau humain (le plus important!), toujours dispo pour discuter quand ça ne va pas autour d'un café-clope, toujours de bonne humeur. Une femme en or et un grand kiff de te connaître miss!

A Maël:

Quand t'es arrivé au labo, je me suis dit "Cool! Un thésard trop sympa avec qui on va pouvoir aller boire des bières, écouter de la musique, et qui va contribuer à une bonne ambiance de travail". Hé ben je ne me suis pas planté sur ce coup là! Ca m'a fait beaucoup de bien de t'avoir à mes côtés tout au long de la thèse. Je retiendrai tous les fous rires qu'on a pu partager,

toutes les discussions scientifiques, tous les conseils utiles, toutes les discussions non-scientifiques, tous les conseils inutiles. Merci d'avoir contribué de près à l'avancée du projet NF-YA/signalisation NF. Je pourrai encore dire pas mal de choses, mais je vais m'arrêter là, sinon tu vas te sentir trop flatté... C'est rare une personne comme toi, alors changes pas mon vieux!

A Agnès:

Ma petite Ninou!!! Merci pour tout! Pareil, je ne sais pas trop comment te remercier pour tout ce que tu as fait et été au cours de ma thèse. Alors merci pour avoir passé des journées entières sous la hôte avec moi (mmmmhh!), merci pour les manips qui m'ont aidé à avancer beaucoup plus vite sur mon projet, merci pour nos discussions sincères, merci pour ta sensibilité touchante. Et puis surtout merci pour toujours avoir été présente. Je te souhaite plein de bonheur pour la suite ma petite Ninou!!

A Sandra:

Merci pour tout Sandra. Merci pour toutes les discussions sincères qu'on a pu avoir, merci pour ton soutien technique très utile, merci pour ta bonne humeur et ton pragmatisme qui m'ont très souvent aidé à me recadrer un peu... Merci pour avoir failli aller au ski avec moi quelques fois (on était vraiment à deux doigts dis donc!). Tu m'as énormément apporté tout au long de cette thèse, et je suis très heureux de te connaître ma petite Sandra!

A Brice:

Je sais pas à quel point le labo serait morose sans toi... Tu as souvent été mon mentor pour les bonnes blagues, même si j'espère prétendre à un humour un peu plus fin que le tiens... (faut bien se rassurer comme on peut!). Merci pour tous tes conseils scientifiques comme non-scientifiques, pour ta bonne humeur. Merci pour tous les moments qu'on a partagés, et qu'on partagera encore je l'espère!

A Justine:

Merci pour toutes ces discussions, ces soirées, ces moments passés ensemble et encore plein d'autres choses Juju. Tu as beaucoup compté pour moi.

Aux ERN girls:

Merci Marion pour m'avoir aidé dans ces préparations d'ARNs interminables, et merci également pour ta bonne humeur. Lisouille!!! Qu'est ce que je n'aurais pas fait sans ton apport technique et scientifique!! Merci pour tes manips de transactivation dans Medicago et dans Bentha. De manière générale merci pour tes travaux qui ont contribué à faire avancer mon projet. Ca va faire une bonne publi tout ça, j'en suis sûr!

A toute l'équipe DB-PG:

Merci d'avoir contribué de près ou de loin à mes travaux de recherche. Merci également pour avoir contribué à créer une atmosphère de travail très agréable. Enfin merci infiniment de l'accueil que vous m'avez accordé!

Je remercie également ma famille et mes amis sans qui ce projet de thèse n'aurait jamais pu aboutir. Votre support moral m'a été de la plus grande aide au cours de cette thèse.

Auteur : Tom Laloum

Titre : Etude du rôle des facteurs de transcription MtNF-YA1 et MtNF-YA2 dans les étapes précoces de la symbiose rhizobienne chez *Medicago truncatula*.

Directeur de thèse : Andreas Niebel

Résumé :

Les plantes de la famille des légumineuses sont capables d'établir une interaction symbiotique avec des bactéries du sol, collectivement appelées Rhizobia. Cette interaction aboutit à la formation d'un nouvel organe appelé nodule et dans lequel les bactéries différenciées fixent l'azote atmosphérique au bénéfice de la plante hôte. Les facteurs Nods (NFs) rhizobiens sont des molécules clés responsables de la spécificité d'hôte, et sont capables à eux seuls d'induire de nombreuses réponses développementales racinaires.

MtNF-YA1 est un gène dont l'expression est fortement induite au cours du processus de nodulation chez *Medicago truncatula*. Ce gène code pour une sous-unité du complexe NF-Y, également appelé « CCAAT-Binding Factor » (CBF). Le facteur de transcription NF-Y est composé de trois sous-unités différentes appelées NF-YA, NF-YB, et NF-YC. Alors que chez les animaux, chaque sous-unité n'est généralement codée que par un seul gène, une diversification structurelle et fonctionnelle s'est produite chez les plantes, menant à l'apparition de familles multigéniques. Des analyses de plantes RNAi ou de mutants *nf-ya1* ont précédemment montré que MtNF-YA1 est impliqué dans le maintien de l'activité méristématique nodulaire. Au cours de ma thèse, nous avons apporté l'évidence d'un rôle clé additionnel de MtNF-YA1 pendant l'infection rhizobienne. Nous avons de plus montré que MtNF-YA1 et son homologue MtNF-YA2 sont impliqués dans la voie de signalisation de réponse aux NFs menant à l'activation de l'expression du gène marqueur MtENOD11. En parallèle, l'étude de complexes trimériques NF-Y dans lesquels agissent NF-YA1 pour contrôler les étapes précoces de la nodulation a conduit à l'identification de partenaires potentiels NF-YB et NF-YC.

Mots clés : *Medicago truncatula*, *Sinorhizobium meliloti*, symbiose, nodulation, facteur de transcription, facteurs Nods, voie de signalisation.

Discipline administrative : Biosciences Végétales

Intitulé et adresse du laboratoire : Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes, UMR2594 INRA-CNRS, Chemin de Borde-Rouge, BP52627, 31326 Castanet-Tolosan Cedex.

Author : Tom Laloum

Title : Role of the NF-YA1 and NF-YA2 transcription factors in early steps of the rhizobial symbiosis in *Medicago truncatula*.

Thesis supervisor : Andreas Niebel

Abstract :

Plants belonging to the legume family are able to establish a nitrogen fixation symbiosis with soil bacteria called Rhizobia, resulting in the formation of new organs called root nodules, in which differentiated bacteria fix atmospheric nitrogen to the benefit of the host plant. The bacterial Nod Factors (NFs) are known as key players responsible for the host specificity, and are able, in the absence of bacteria, to trigger many early plant responses.

MtNF-YA1, in *Medicago truncatula*, is a gene whose expression is strongly up-regulated during the nodulation process. It encodes a subunit of the CCAAT-Binding Factor (CBF) also called NF-Y complex. The NF-Y transcription factor is composed of three different subunits (NF-YA, NF-YB and NF-YC). While in animals each NF-Y subunit is encoded by a single gene, a structural and functional diversification has occurred in plants, leading to the emergence of gene families. Using *RNAi* and mutant analyses, we previously showed that *MtNF-YA1* is involved in the maintenance of the nodule meristematic activity. During my PhD, we provided evidences for the involvement of *MtNF-YA1* during earlier stages of symbiotic root infection. We have also shown that *MtNF-YA1*, together with the closely-related *MtNF-YA2*, is involved in the early NF signaling pathway leading to the activation of the *MtENOD11* marker-gene. In parallel, the study of NF-Y trimeric complexes in which *MtNF-YA1* acts to control early steps of nodulation led to the identification of potential NF-YB and NF-YC partners.

Key words: *Medicago truncatula*, *Sinorhizobium meliloti*, symbiosis, nodulation, transcription factor, Nod factors, signaling pathway.

Laboratory: Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes, UMR2594 INRA-CNRS, BP52627, 31326 Castanet-Tolosan cedex.

Sommaire

CHAPITRE I : INTRODUCTION	13
1. Nutrition azotée et symbiose <i>Rhizobium</i>-légumineuses	14
1.1 Intérêts agronomiques et écologiques	14
1.2 Les différentes symbioses fixatrices d'azote chez les plantes.....	15
1.3 La symbiose <i>Rhizobium</i> -légumineuses	17
2. Bases moléculaires de la symbiose <i>Rhizobium</i>-légumineuses	23
2.1 Les flavonoïdes	24
2.2 Les facteurs Nods.....	25
2.3 Les réponses de l'hôte aux facteurs Nods	27
3. Contrôle génétique des étapes précoces de la symbiose	32
3.1 Perception des facteurs Nods	32
3.2 Transduction du signal NF	35
3.3 Les facteurs de transcription en aval de DMI3	43
3.4 Une voie parallèle	47
3.5 Cytokinines et organogénèse nodulaire	47
3.6 Autres gènes requis pour l'infection	49
3.7 L'infection rhizobienne et l'organogénèse nodulaire, une signalisation croisée	52
3.8 L'auto-régulation de la nodulation (AON)	53
4. Les facteurs de transcription NF-Y	54
4.1 Rôles décrits de <i>NF-YA1</i> au cours de la nodulation	65
4.2 Un autre membre de la famille NF-Y impliqué dans la nodulation	66
4.3 Expression des gènes <i>NF-Ys</i> dans les tissus symbiotiques de <i>Medicago truncatula</i>	67
5. Présentation du sujet de thèse	67

CHAPITRE II : COMPLEXE(S) NF-Y(S) IMPLIQUANT(S) NF-YA1 AU COURS DES ETAPES PRECOCES DE LA NODULATION CHEZ *MEDICAGO TRUNCATULA*..... 70

1. Le système double hybride de levure	71
1.1 Principe général du double hybride	71
1.2 Le système GAL4	71
2. Recherche sans à priori des interacteurs de NF-YA1.....	72
2.1 Banque d'ADNc utilisée	72
2.2 Auto-activation de la transcription des gènes rapporteurs par la protéine appât.....	73
2.3 Criblage de la banque.....	73
2.4 Spécificités d'interaction.....	75
2.5 Conclusions.....	76
3. Dynamique d'association du complexe NF-Y chez les plantes	76
3.1 Localisation subcellulaire de NF-YA1, NF-YB2, et NF-YC2.....	77
3.2 Dynamique possible d'assemblage du complexe NF-YA1/NF-YB2/NF-YC2	78
4. Conclusions générales du chapitre	78

CHAPITRE III : IMPLICATION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION MTNF-YA1 ET MTNF-YA2 AU COURS DE LA SIGNALISATION NF ET DE L'INFECTION RHIZOBIENNE..... 80

1. Profils d'expression de <i>NF-YA1</i> et <i>NF-YA2</i> au cours des étapes précoces de la nodulation chez <i>Medicago truncatula</i>	81
1.1 L'expression de <i>NF-YA1</i> est fortement liée aux étapes de pré-infection et d'infection rhizobienne	81
1.2 Analyse de l'expression spatio-temporelle de <i>NF-YA2</i>	85
1.3 Conclusions.....	86
2. Etude fonctionnelle de <i>NF-YA1</i> et <i>NF-YA2</i> au cours des étapes de pré-infection ..	87
2.1 Gènes ciblés par la construction <i>NF-YA</i> RNAi.....	87

2. 2	Expression de <i>NSP1</i> , <i>ERN1</i> et <i>ENOD11</i> en réponse aux NFs	88
2. 3	Les plantes <i>NF-YA</i> RNAi sont sévèrement affectées dans les étapes de pré-infection et d'infection par <i>Sinorhizobium meliloti</i>	89
2. 4	Initiation de l'étude fonctionnelle de <i>NF-YA2</i> en réponse aux NFs.....	90
2. 5	Conclusions.....	91
3.	NF-YA1 et NF-YA2 agissent en amont de l'activation d'<i>ENOD11</i> dans la voie de réponse aux NFs	92
3. 1	NF-YA1 et NF-YA2 activent l'expression d' <i>ENOD11</i> dans les racines de <i>Medicago truncatula</i>	92
3. 2	NF-YA1 et NF-YA2 activent l'expression de <i>ERN1</i> dans les cellules de <i>Nicotiana benthamiana</i>	93
3. 3	Conclusions.....	97

CHAPITRE IV: DISCUSSION..... 98

1.	<i>NF-YA1</i> et la voie de signalisation NF.....	99
1. 1	Rôle au cours de l'organogénèse nodulaire	99
1. 2	Rôle dans l'épiderme au cours des étapes de pré-infection	100
2.	NF-YA1 et NF-YA2, des fonctions redondantes ?	102
3.	Mode d'action de NF-YA et gènes cibles ?	105

CHAPITRE V : MATERIEL ET METHODES 110

1.	Matériel végétal et bactérien.....	111
2.	Banque d'ADNc et constructions plasmidiques utilisées	111
3.	Criblage en double hybride et interactions protéine-protéine dans la levure.....	112
4.	Expression transitoire dans les feuilles de <i>Nicotiana benthamiana</i>	113
5.	Culture des plantes de <i>Medicago truncatula</i> et traitements effectués	114
6.	Colorations GUS et β-galactosidase	115

7.	Méthodes de microscopie	115
8.	Analyses de RT-PCR quantitative.....	116

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	117
---	------------

ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

INTRODUCTION :

Figure 1. Variations morphologiques parmi les symbioses *rhizobium*-légumineuses.

Figure 2. Phylogénie des légumineuses basée sur la séquence du gène chloroplastique *rbcL*.

Figure 3. Relations de synténie entre les génomes de *Medicago truncatula* et de *Lotus japonicus*.

Figure 4. Croissance du cordon d'infection et invasion bactérienne des cellules hôtes.

Figure 5. Deux types de nodules matures.

Figure 6. Formation du primordium nodulaire.

Figure 7. Schéma représentatif des différentes étapes de la nodulation.

Figure 8. Dialogue moléculaire initiant la symbiose *Rhizobium*-légumineuses.

Figure 9. Les branches majeures de la voie de biosynthèse des flavonoïdes.

Figure 10. Biosynthèse et transport des facteurs Nods.

Figure 11. Développement des poils absorbants racinaires et réponses morphologiques à *Rhizobium*.

Figure 12. Réponses racinaires aux facteurs Nods chez les légumineuses et phases précoces de l'interaction symbiotique.

Figure 13. Déformations des poils absorbants et réarrangements du cytosquelette en réponse aux facteurs Nods.

Figure 14. Phénotypes symbiotiques précoces des mutants *nodL*, *nodFE*, et *nodFL* de *Sinorhizobium meliloti*.

Figure 15. Modèle pour le rôle des différents facteurs Nods de *Sinorhizobium meliloti* et de leurs récepteurs putatifs dans la formation du cordon d'infection.

Figure 16. *ENOD11* est un gène marqueur des étapes précoces de la symbiose entre *Sinorhizobium meliloti* et *Medicago truncatula*.

Figure 17. Le mutant *nfp* est affecté dans les premières réponses de l'hôte aux facteurs Nods.

Figure 18. Le mutant *lyk3* est spécifiquement affecté dans l'infection rhizobienne.

Figure 19. Organisation en domaines des protéines DMI2 et DMI2, et localisation subcellulaire de DMI1.

Figure 20. Modèle proposé pour les rôles de DMI1 et du couple CASTOR/POLLUX dans la génération des oscillations calciques au cours de la signalisation NF.

Figure 21. DMI3, le décodeur des oscillations calciques nucléaires.

Figure 22. Régulation de CCaMK/DMI3.

Figure 23. Deux protéines interagissent avec CCaMK et découplent les processus d'infection et de divisions cellulaires corticales.

Figure 24. Rôle des facteurs de transcription ERNs et NSPs au cours des étapes précoces de la nodulation.

Figure 25. Implications de NIN dans les réponses épidermiques aux NFs ou à *S. meliloti*.

Figure 26. Transduction du signal NF dans l'épiderme.

Figure 27. Les cytokinines et l'organogénèse nodulaire.

Figure 28. Modèle génétique des voies de signalisation impliquées dans la nodulation.

Figure 29. Auto-régulation de la nodulation et interférence avec la signalisation NF.

Figure 30. L'expression de *NF-YAI* est restreinte à la zone 1 nodulaire et permet le maintien de l'activité méristématique.

Figure 31. L'expression de *NF-YAI* est inversement corrélée aux expressions de miR169a et uORF1 au cours de l'organogénèse nodulaire.

Figure 32. Arbres phylogéniques couplés aux expressions des gènes *NF-Y* dans les zones 1, 2, et 3 de nodules de *Medicago truncatula*.

Figure 33. Implication de *MtNF-YA1* au cours des étapes précoces de la symbiose entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*.

Tableau 1. Exemples d'associations *rhizobium*-légumineuses.

Tableau 2. Outils génomiques disponibles sur internet pour *Medicago truncatula* et d'autres légumineuses modèles.

Tableau 3. Fonction biochimique des produits des gènes nod impliqués dans la synthèse et le transport des facteurs Nods.

RESULTATS :

Figure 34. Principes généraux du système de double hybride GAL4 Matchmaker (Clontech).

Figure 35. Auto-activation du gène rapporteur *HIS3* par la protéine chimérique GAL4BD-NF-YA1.

Figure 36. Représentation schématique de la stratégie utilisée pour le criblage de la banque d'ADNc en utilisant *MtNF-YA1* comme protéine appât.

Figure 37. Spécificités d'interactions entre *MtNF-YA1* et *MtNF-YC1* ou *MtNF-YC2*.

Figure 38. Localisation subcellulaire des sous-unités NF-YA1, NF-YB2, et NF-YC2 de *Medicago truncatula*.

Figure 39. Alignement des séquences protéiques *MtNF-YA1* et *MtNF-YA2*.

Figure 40. Localisation tissulaire de l'expression de *MtNF-YA1* au cours des étapes précoces de la symbiose entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*.

Figure 41. Expression de *NF-YA1* en réponse aux NFs.

Figure 42. Expression relative de *NF-YA1* en réponse aux NFs dans les racines de mutants sur des gènes de la voie de signalisation NF.

Figure 43. Expression relative des gènes *NSP1*, *ERN1* et *ENOD11* en réponse aux NFs dans les racines du mutant *nf-ya1-1*.

Figure 44. Analyses de l'expression de *MtNF-YA2* en réponse aux NFs.

Figure 45. Alignement des séquences transcrites de NF-YA1 et NF-YA2.

Figure 46. Analyse par qRT-PCR de l'expression des gènes *NF-YAs* dans des racines transgéniques *NF-YA RNAi* de *Medicago truncatula*.

Figure 47. Les racines *NF-YA RNAi* sont altérées dans les étapes précoces de la nodulation chez *Medicago truncatula*.

Figure 48. L'expression de *ERN1* et *ENOD11* en réponse aux NFs est très altérée chez les plantes *NF-YA RNAi*.

Figure 49. L'expression d'*ENOD11* et de *ERN1* n'est pas affecté dans les racines des plantes *NF-YA2 RNAi* en réponse aux NFs.

Figure 50. NF-YA1 et NF-YA2 activent la transcription d'*ENOD11* dans les racines de *Medicago truncatula*.

Figure 51. L'activation de la transcription d'*ENOD11* par NF-YA1 est dépendante de *NSP1* et *ERN1*.

Figure 52. NF-YA1, NF-YA2 et les versions mutantes de ces protéines sont localisées dans le noyau des cellules foliaires de *Nicotiana benthamiana*.

Figure 53. NF-YA1 et NF-YA2 n'activent pas l'expression d'*ENOD11* dans les feuilles de *Nicotiana benthamiana*.

Figure 54. NF-YA1 et NF-YA2 activent l'expression de *ERN1* dans les feuilles de *Nicotiana benthamiana*.

Figure 55. Modèle hypothétique décrivant l'implication de *NF-YA1* dans la voie de signalisation de réponse aux NFs pendant les étapes de pré-infection.

DISCUSSION :

Figure 55. Modèle hypothétique décrivant l'implication de *NF-YA1* et *NF-YA2* dans la voie de signalisation de réponse aux NFs pendant les étapes de pré-infection.

Figure 56. Séquence de la région promotrice de *ERN1*.

MATERIEL ET METHODES :

Tableau 4. Liste des amorces utilisées au cours de la thèse.

Chapitre I : Introduction

1. Nutrition azotée et symbiose *Rhizobium*-légumineuses

1.1 Intérêts agronomiques et écologiques

L'azote, constituant essentiel des molécules biologiques telles que les nucléotides, les acides aminés, et les protéines, est un nutriment indispensable à la croissance et au développement des plantes. Même si l'azote fait partie des éléments les plus abondants sur terre, c'est également un des principaux facteurs limitant pour la croissance des plantes (Wang et al., 2012). Dans les sols, on le trouve principalement sous sa forme gazeuse (N_2), non-assimilable par les plantes, alors que les formes assimilables comme l'ammonium (NH_4^+), le nitrate (NO_3^-), ou le nitrite (NO_2^-) y sont très peu retenues. Pour faire face à ce problème, l'utilisation de fertilisants azotés constitue, dans l'agriculture, l'un des principaux recours. Entre 1960 et 2000, elle est passée de 10 à 88 millions de tonnes, et les prévisions pour 2040 font état de l'utilisation de 120 millions de tonnes (Vance, 2001). Cependant, une grande quantité d'azote résiduel n'est pas absorbée par les cultures et reste dans le sol, engendrant de nombreux problèmes environnementaux et sanitaires tels que l'émission de gaz à effets de serre ou encore la pollution de l'air et de l'eau (Socolow, 1999). De plus, les prix d'engrais azotés ne cessent d'augmenter depuis les années 2000, compte tenu de la raréfaction des énergies fossiles et des politiques de lutte contre le changement climatique.

Les formes d'azote disponibles pour les plantes peuvent également être renouvelées dans les sols de manière naturelle, par des processus de minéralisation de la matière organique, ou par l'action de certains microorganismes spécialisés (Socolow, 1999). De plus les plantes de la famille des légumineuses peuvent établir une symbiose avec des bactéries du sol, les rhizobia, qui sont capables de fixer l'azote atmosphérique dans des excroissances racinaires appelées nodosités (ou nodules). La culture de ces plantes ne nécessite donc pas (ou très peu) de fertilisants azotés pour leur croissance. Les légumineuses sont en outre des espèces à propriétés agronomiques intéressantes : leurs graines sont riches en protéines (fève, soja, pois sec, lentilles, haricots...), et leurs parties aériennes sont utilisées dans la constitution des fourrages (luzerne, trèfle...). Cultivées sur environ 15% des terres arables dans le monde, on estime que les légumineuses couvrent 33% de nos besoins alimentaires en azote, et permettent la production de plus de 35% d'huile végétale industrielle (Graham and Vance, 2003). Au-delà des apports nutritionnels, l'introduction de légumineuses dans une rotation de cultures a des effets bénéfiques, conduisant notamment à une moindre utilisation d'engrais

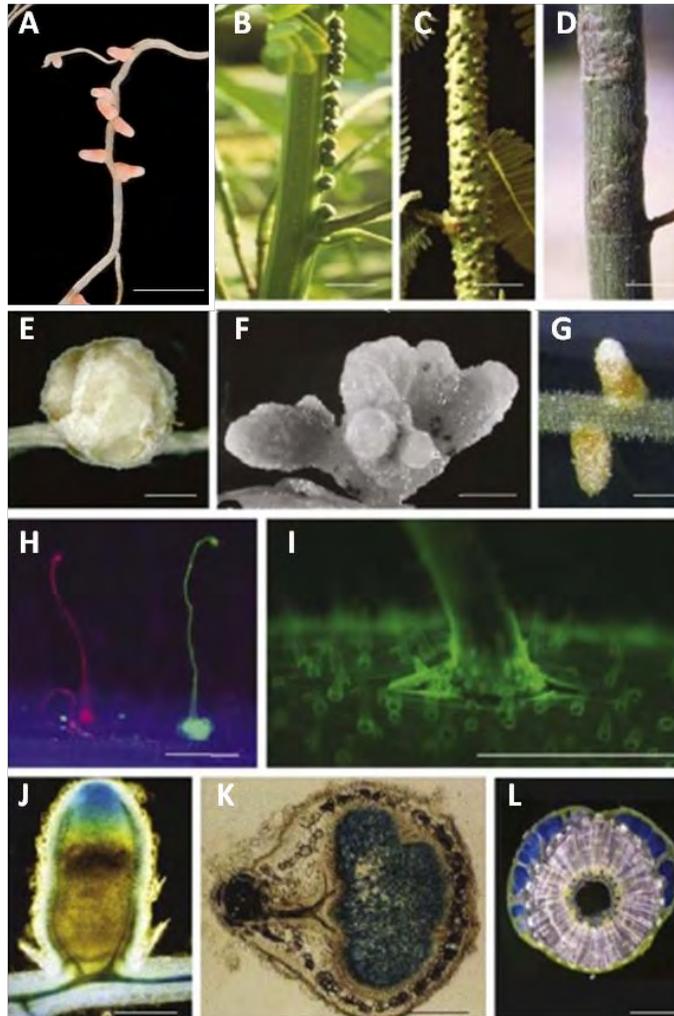


Figure 1. Variations morphologiques parmi les symbioses *rhizobium*-légumineuses.

Les rhizobia peuvent former chez les légumineuses des nodules racinaires comme dans le cas de la symbiose entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti* (A), ou dans certains cas des nodules caulinaires, comme pour les symbioses entre *Azorhizobium caulinodans* et *Sesbania rostrata* (B), *Bradyrhizobium sp.* OR322 et *Aeschynomene afraspera* (C), et *Bradyrhizobium sp.* ORS278–*Aeschynomene sensitive* (D). (E, F, G) Les nodules peuvent avoir des formes très variées. (E) *Glycine max*-*Sinorhizobium fredii* ; nodule déterminé. (F) *Methylobacterium nodulans*–*Crotalaria perrottetii* ; nodule coralloïde. (G) *Sinorhizobium meliloti*–*Medicago sativa*; nodule indéterminé. (H, I) Les modes d'infection peuvent également être différents. (H) Infection dans les poils absorbants racinaires de *Medicago sativa* par *Sinorhizobium meliloti* exprimant la RFP (Red Fluorescent Protein) ou la GFP (Green Fluorescent Protein). (I) Infection via des blessures (crack entry) d'*Aeschynomene indica* par *Bradyrhizobium sp.* ORS285 exprimant la GFP. (J, K, L) Coupes transversales de nodules *Medicago sativa* (J), *Lotus japonicus* (K), et *Aeschynomene sensitive* (L). (J) La coloration bleue est due à l'expression d'une fusion transcriptionnelle *promoteur: GUS*. (K et L) Les bactéries symbiotiques expriment le gène *LacZ*.

D'après Masson-Boivin et al., 2009.

azotés. Ainsi il est estimé que la mise en culture de 514 000 hectares supplémentaires de légumineuses sur des surfaces occupées par des céréales ou des graminées fourragères permettrait d'économiser environ 90 000 tonnes d'engrais azotés par an (Graham and Vance, 2003).

1.2 Les différentes symbioses fixatrices d'azote chez les plantes

Une grande diversité de bactéries fixatrices d'azote peut coloniser la rhizosphère et interagir avec les plantes. Les légumineuses et les plantes actinorhiziennes peuvent se fournir en azote grâce à leurs associations avec les rhizobia ou *Frankia*. Ces associations se traduisent par la différenciation d'un organe spécialisé sur l'hôte, le nodule racinaire. D'autres interactions symbiotiques mettent en jeu des cyanobactéries, que l'on trouve en association avec une grande variété de plantes, de champignons et d'algues (Meeks and Elhai, 2002).

1.2.1 La symbiose *Rhizobium*-légumineuses

La majorité des espèces de légumineuses peuvent entrer en symbiose avec des bactéries appelées rhizobia. Ces symbioses ont des phénotypes très variés, aux regards de la localisation, de la forme, et de l'anatomie des nodules engendrés (Masson-Boivin et al., 2009) (Figure 1). Les légumineuses appartiennent à la famille des *Fabaceae* (ou *Leguminosae*) (Figure 2) qui regroupe plus de 20 000 espèces, et qui est partagée en trois sous-familles : les *Caesalpinioideae*, les *Mimosoideae*, et les *Papilionidae*. La grande majorité des plantes d'intérêts agronomiques appartiennent à la sous-famille des *Papilionidae* (Franche et al, 2009 ; Doyle, 1998).

Les rhizobia sont des bactéries gram-négatives de la classe des α - et β -protéobactéries. Les bactéries capables de noduler sont retrouvées dans 13 genres (Franche et al, 2009):

- les α -protéobactéries du genre *Agrobacterium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Devosia*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum* et *Phyllobacterium*.
- Les β -protéobactéries du genre *Burkholderia* et *Cupriavidus*.

Les spécificités d'interaction entre les rhizobia et les légumineuses sont variables (Tableau 1). En effet, alors que certaines espèces de légumineuses peuvent être infectées par des rhizobia provenant de genres bactériens différents, d'autres espèces sont très restrictives,

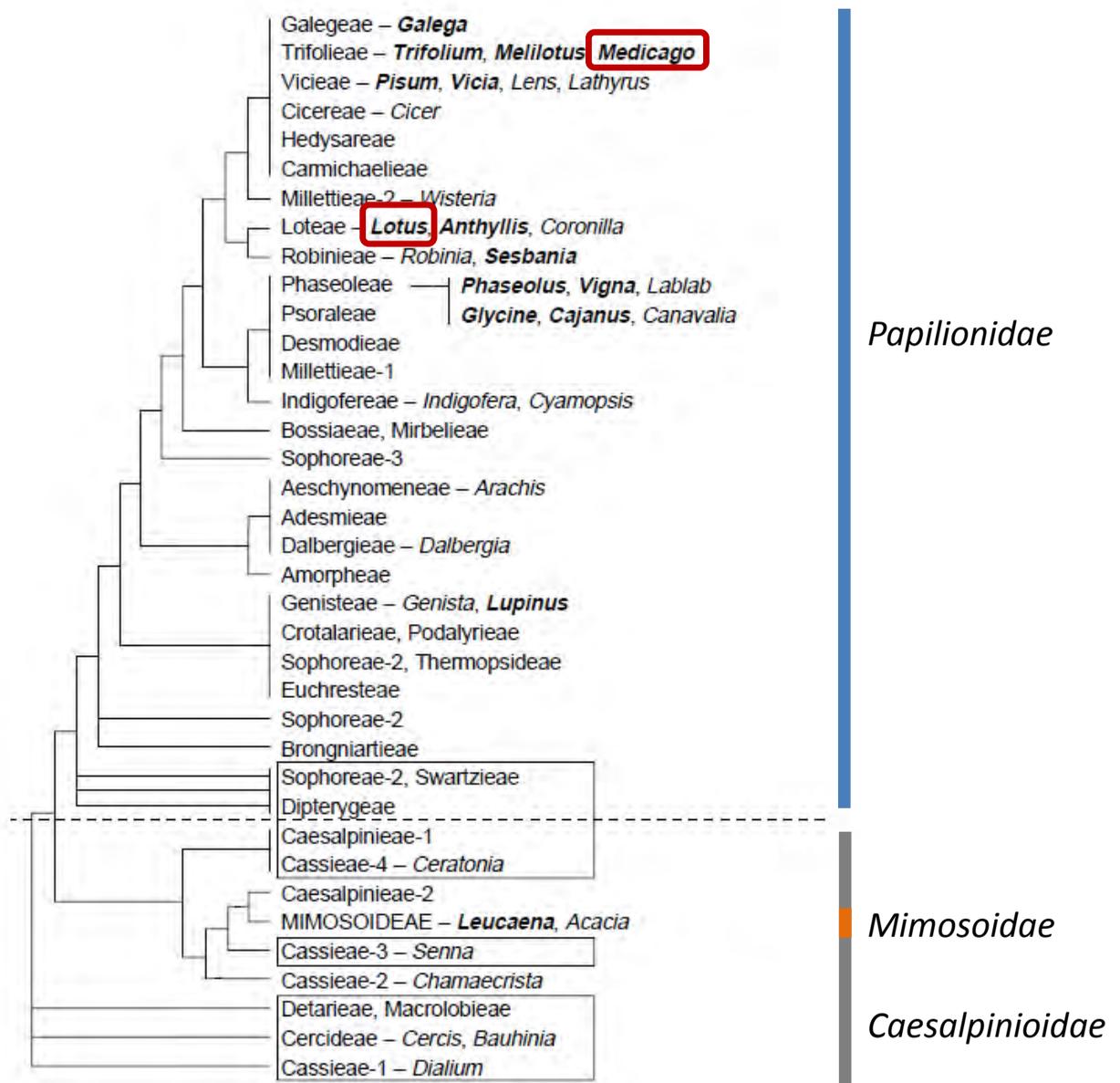


Figure 2. Phylogénie des légumineuses basée sur la séquence du gène chloroplastique *rbcL*.

Les trois sous-familles de légumineuses *Papilionoidae*, *Mimosoidae* et *Caesalpinioideae* sont représentées par les barres verticales colorées. Les tribus et genres encadrés sont incapables de noduler. Les deux genres dont sont issues les légumineuses modèles *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus* sont encadrés en rouge.

D'après Doyle, 1998.

et ne s'associent qu'avec un nombre très réduit de symbiontes. Ces spécificités d'hôte sont généralement dépendantes de la composition des exsudats racinaires, ainsi que de la nature de déterminants moléculaires secrétés par les rhizobia appelés facteurs Nods (voir 2.2) (Denarie et al., 1996; Perret et al., 2000b). De plus, la présence d'un système de sécrétion de type III a été identifiée chez certains rhizobia (Marie et al., 2001), et il a été montré que les protéines sécrétées par ce système (Nops) jouent un rôle dans l'efficacité de la nodulation et participent à la définition de la spécificité d'hôte. Afin d'illustrer la variabilité des spécificités d'interactions, nous pouvons citer comme exemples : les plantes du genre *Galega* (famille des *Papilionidae*) qui ne peuvent être nodulées que par une seule espèce de rhizobia, *Rhizobium galegae* (Franche et al, 2009), ou la légumineuse *Sesbania rostrata* qui n'établit une symbiose qu'avec *Azorhizobium caulinodans*. A l'inverse, la souche NGR234 de *Sinorhizobium* peut former des nodules sur 112 genres de plantes différents, dont une seule non-légumineuse *Parasponia andersonii*. Ce dernier cas s'explique par la capacité qu'a cette souche bactérienne à produire un cocktail de facteurs Nods très divers, et à synthétiser des protéines Nops sécrétées par la suite via son système de sécrétion de type III (Franche et al, 2009).

1.2. 2 La symbiose actinorhizienne

En contraste avec la symbiose rhizobienne qui se limite, à une exception près, aux plantes de la famille des Fabaceae, les plantes actinorhiziennes sont distribuées dans plus de 200 espèces appartenant à 24 genres de huit familles d'angiospermes (Franche et al, 2009) : *Casuarinaceae*, *Coriariaceae*, *Eleagnaceae*, *Datisticaceae*, *Myricaceae*, *Betulaceae*, *Rhamnaceae* et *Rosaceae*. Toutes les plantes actinorhiziennes sont des arbres ou des arbustes, mis à part *Datisca* qui est une plante à fleurs. Des exemples de plantes actinorhiziennes bien étudiées sont les genres *Alnus* (aulne) et *Casuarina*. Ces plantes établissent une interaction symbiotique avec des actinomycètes du genre *Frankia* (Benson and Dawson, 2007). Ces bactéries filamenteuses gram positives sont capables de se différencier en deux structures développementales différentes essentielles à leur survie : les vésicules sont les structures qui permettent la fixation azotée lors de la symbiose actinorhizienne, alors que les spores contenues dans les sporanges sont les structures de reproduction.

1.2. 3 Autres bactéries fixatrices d'azote

Les cyanobactéries constituent un des groupes les plus vastes et variés de bactéries filamenteuses gram-négatives, capables de photosynthèse, et souvent de fixation azotée. Parmi ces bactéries, les genres *Nostoc* et *Anabaena* peuvent s'associer aux végétaux et

Tableau 1. Exemples d'associations *rhizobium*-légumineuses.

Rhizobia	Plantes hôtes
<i>Rhizobium meliloti</i>	Luzerne (<i>Medicago</i>), <i>Melilotus</i> , et <i>Trigonella sp.</i>
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Trifolii</i>	Trèfle (<i>Trifolium sp.</i>)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Phaseoli</i>	Haricôt (<i>Phaseolus vulgaris</i>)
<i>Rhizobium loti</i>	Lotier (<i>Lotus sp.</i>)
<i>Rhizobium sp.</i> souche NGR234	Légumineuses tropicales (large spectre) et <i>Parasponia</i> (non-légumineuse)
<i>Rhizobium tropici</i>	Haricôt (<i>Phaseolus vulgaris</i>), Faux Mimosa (<i>Leucaena sp.</i>), <i>Macroptilium sp.</i>
<i>Rhizobium etli</i>	Haricôt (<i>Phaseolus vulgaris</i>).
<i>Rhizobium fredii</i>	Soja (<i>Glycine max</i>), <i>Glycine soja</i> , et d'autres légumineuses.
<i>Bradirhizobium japonicum</i>	Soja (<i>Glycine max</i>), <i>Glycine soja</i> , et d'autres légumineuses.
<i>Bradirhizobium elkanii</i>	Soja (<i>Glycine max</i>), <i>Glycine soja</i> , et d'autres légumineuses.
<i>Bradyrhizobium sp.</i> souche <i>Parasponia</i>	<i>Parasponia sp.</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania sp.</i>

D'après Van Rhijn and Vanderleyden, 1995.

présentent un très large spectre d'hôtes : algues, bryophytes, ptéridophytes, gymnospermes et angiospermes (Franche et al, 2009). Dans des conditions de carence azotée, elles peuvent se différencier en cellules spécialisées appelées hétérocystes. Cette différenciation est associée à une réduction de l'activité photosynthétique, et à la création d'un environnement anaérobique, nécessaire au bon fonctionnement de leur nitrogénase. Le type d'associations symbiotiques avec les plantes hôtes peut être extracellulaire ou intracellulaire, mais ces bactéries n'induisent pas la différenciation d'organes spécifiques.

Enfin, certaines bactéries endophytiques sont capables de fixer l'azote atmosphérique et ont des effets positifs sur la croissance des plantes, et sur la résistance à certaines maladies (Franche et al, 2009). Les espèces du genre *Azospirillum* sont des bactéries rhizosphériques associées à une grande variété de végétaux, comprenant des plantes d'intérêts agronomiques comme le blé, le riz ou encore le maïs (Steenhoudt and Vanderleyden, 2000). Bien qu'il ait été montré pour certaines souches d'*Azospirillum* qu'elles peuvent coloniser les espaces intercellulaires de l'épiderme racinaire, aucune structure symbiotique n'a été observée.

1.3 La symbiose *Rhizobium*-légumineuses

1.3.1 Les légumineuses modèles

Les légumineuses d'intérêts agronomiques sont généralement des systèmes difficiles d'utilisation en tant que plantes modèles (Udvardi et al., 2005). En effet, certaines légumineuses cultivées sont tétraploïdes (e.g. cacahuète), d'autres ont de grands génomes (e.g. pois, fève), et beaucoup d'entre elles sont récalcitrantes à la transformation ou difficiles à régénérer (e.g. haricot, pois, soja). La plupart des légumineuses à grains produisent peu de graines par plante, et ont un système végétatif volumineux et encombrant pour pouvoir être cultivées dans des conditions de laboratoire (e.g. pois chiche, vigne, haricot, soja). De plus certaines légumineuses comme le soja ont subi des duplications de génomes, alors que d'autres sont auto-incompatibles, ou ont des temps de génération assez longs. Dans ce contexte, deux légumineuses de la sous-famille des *Papilionoideae*, *Lotus japonicus* (lotier) et *Medicago truncatula*, font l'objet de modèles d'étude. Ces deux plantes modèles ont été choisies pour la petite taille de leur génome (entre 470 et 550 Mb), leurs caractères diploïdes et autogames, et leur faible encombrement spatial. De plus, dans le but de faciliter les études moléculaires sur ces deux plantes, de nombreux outils génétiques et génomiques ont été générés (Tableau 2). Des études de comparaison des génomes de *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus* ont mis en évidence la présence de nombreuses régions synténiques entre ces

Tableau 2. Outils génomiques disponibles sur internet pour *Medicago truncatula* et d'autres légumineuses modèles.

Sites internet sur les données génomiques des légumineuses modèles

Séquences génomiques de *Medicago*

Medicago Genom Sequence Resources

<http://www.medicago.org>

TIGR *Medicago* Databse

<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/mta1>

University of Oklahoma Sequencing Project

<http://www.genome.ou.edu/medicago.html>

European *Medicago* Genome Database

<http://mips.gsf.de/proj/plant/jsf/medi/index.jsp>

Sites de génomique fonctionnelle chez *Medicago*

Noble foundation *Medicago* Gene Expression Atlas

<http://bioinfo.noble.org/gene-atlas/>

Noble foundation *Medicago* Mutant Database

<http://bioinfo4.noble.org/mutant/>

Noble Foundation *Medicago* Metabolic Pathways

<http://medicccyc.noble.org/>

Medicago Handbook

<http://www.noble.org/MedicagoHandbook/>

Sites de génomique comparative de légumineuses

Legume Information System (LIS)

<http://www.comparative-legumes.org/>

INRA/CNRS Integrative Legume Resources

<http://www.legoo.org/>

Legume Genome Website Links at US

http://www.comparative-legumes.org/lis/lis_links.html

Autres sites internet

Lotus japonicus Genome Browser

<http://www.kazusa.or.jp/lotus/>

Lotus japonicus Legume Base

<http://www.shigen.nig.ac.jp/bean/lotusjaponicus/top/top.jsp>

Phytozome *Glycine max* Genome

<http://www.phytozome.net/soybean>

Soybase and Soybean Breeders Toolbox

<http://soybase.org/>

Tree and Life: Fabaceae

<http://www.tolweb.org/Fabaceae>

International Legume Database

<http://www.ildis.org>

D'après Young and Udvardi, 2009.

deux espèces (Udvardi et al., 2005; Cannon et al., 2006; Young et al., 2011) (Figure 3). En outre, ces deux plantes ont des modes de développement nodulaires différents qui peuvent rendre leurs études complémentaires. Ces deux modes de développement sont expliqués de manière plus détaillée dans la partie 1.3.3.

1.3.2 La plante modèle *Medicago truncatula*

Medicago truncatula s'apparente à la plante fourragère *Medicago sativa* (luzerne), et fait partie de l'espèce des *Trifolieae*. C'est la légumineuse modèle choisie par le Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes. Son génome est composé de huit groupes de liaison (chromosomes), et sa couverture de séquençage est estimée à près de 95% (Young et al., 2011). De plus, de nombreuses ressources génétiques et génomiques sont disponibles. En effet des populations de mutants Tnt1 (Tadege et al., 2008), FNB (Fast Neutron Bombardment) (Starker et al., 2006), et TILLING (Le Signor et al., 2009) permettent d'étudier des gènes impliqués dans la nodulation par génétique directe ou inverse. D'un point de vue génomique, près de 250 000 EST (Expressed Sequence Tags) ont été déposés dans Genbank. Des données de transcriptomique provenant de micro-arrays (Benedito et al., 2008; Moreau et al., 2011) ou de séquençage d'ARNs (Pascal Gamas, communication personnelle), ainsi que des données de protéomique (Rose et al., 2012), ont de plus été générées ces dernières années. En ce qui concerne *Sinorhizobium meliloti*, son symbiote, le génome est entièrement séquencé (Barnett et al., 2001; Galibert et al., 2001), et de nombreux mutants défectifs à différentes étapes de l'interaction symbiotique sont disponibles.

1.3.3 La nodulation

L'association symbiotique entre les rhizobia et les légumineuses aboutit à la formation d'un nouvel organe, le nodule, dans lequel les bactéries différenciées en bactéroïdes sont internalisées dans des compartiments intracellulaires appelés symbiosomes. Les nodules et les symbiosomes associés sont les structures qui permettent une fixation azotée optimale (Oldroyd et al., 2011). En effet, dans ces structures, la plante maintient un environnement dans lequel la pression partielle en oxygène est suffisamment faible pour permettre l'expression et l'activité de la nitrogénase, et donc la fixation azotée. Dans ce processus, une enzyme de la plante hôte joue un rôle clé, la leghémoglobine. Cette enzyme est exprimée dans le cytoplasme des cellules contenant les bactéroïdes. Elle permet à la fois de tamponner la concentration en oxygène libre (7-11 nM) pour le maintien de l'activité nitrogénase, et de transporter l'oxygène pour une respiration bactérienne optimale (Downie, 2005).

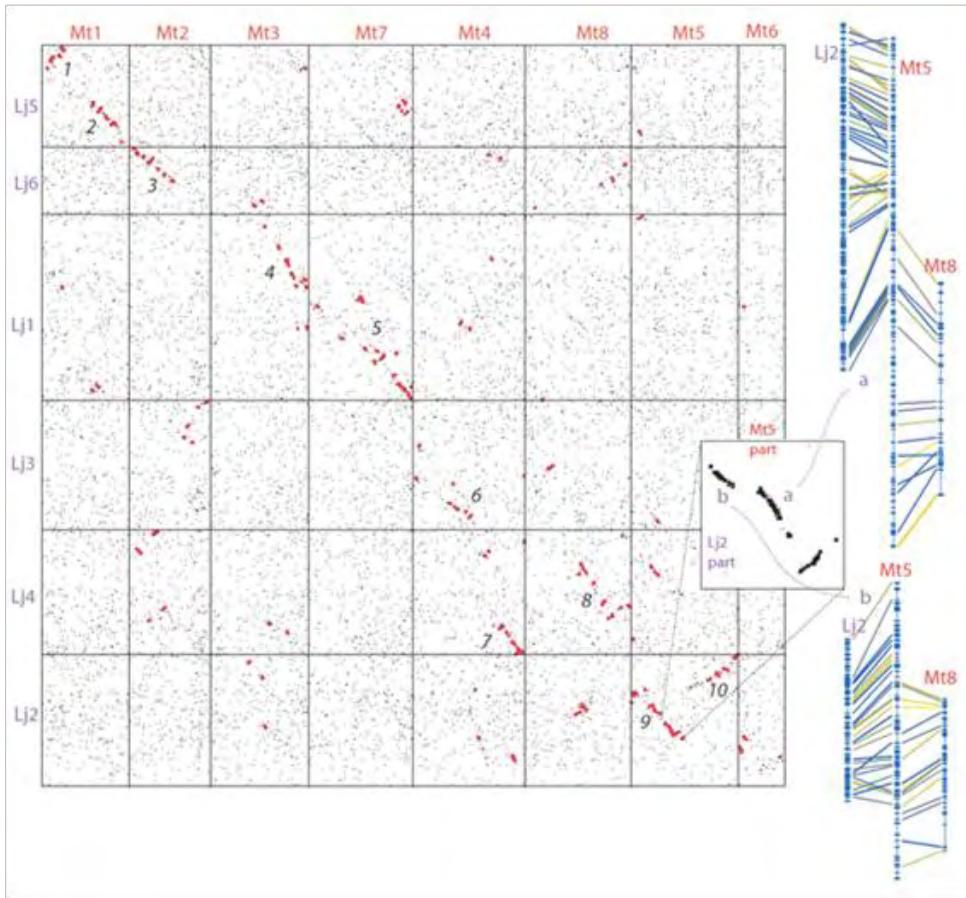


Figure 3. Relations de synténie entre les génomes de *Medicago truncatula* et de *Lotus japonicus*.

Chaque point noir représente l'homologie la plus proche après un BLASTP entre une paire de gènes de *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus*. Les points rouges montrent les régions de synténie entre les deux génomes analysés. Une vue d'ensemble de la synténie est représentée sur la droite de la figure, entre les chromosomes Mt5/Mt8 et Lj2. Les lignes nuancées du bleu au jaune indiquent les « E-values » ; bleu pour la meilleure correspondance (E-value = 0) et jaune pour la moins bonne (E-value = 0.01).

D'après Cannon et al., 2006.

Alors que dans la plupart des cas, les nodules sont des organes racinaires (e.g. *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula*), on trouve également des nodules caulinaires comme dans le cas de l'association entre *Sesbania rostrata* et *Azorhizobium caulinodans* (Goormachtig et al., 1998). Cet exemple de nodulation ne sera pas détaillé par la suite.

L'entrée des bactéries dans les cellules de l'hôte nécessite la reconnaissance de molécules signales bactériennes appelées facteurs Nods, et cette reconnaissance active une série de changements développementaux chez la plante. Une réorientation de la croissance du poil absorbant permet la formation d'une structure communément appelée « crosse de berger », puis une invagination de la membrane du poil absorbant est associée à l'infection bactérienne. De manière concomitante à l'infection dans l'épiderme racinaire, les cellules corticales entrent en divisions pour permettre l'organogénèse nodulaire. Le nodule mature est la structure qui permet la fixation de l'azote par les rhizobia. Les grandes étapes de formation du nodule sont détaillées ci-dessous.

i. L'infection bactérienne

L'infection rhizobienne peut se produire via les poils absorbants racinaires, via des lésions dans l'épiderme racinaire, ou via des infections interstitielles entre les cellules épidermiques (Oldroyd and Downie, 2008). Cependant le mode d'infection le plus commun est la formation de cordons d'infections dans les poils absorbants en croissance, qui sera plus détaillé par la suite.

L'attachement des bactéries aux poils absorbants racinaires constitue la première étape de leur association avec la plante hôte. Afin d'éviter d'éventuelles compétitions avec d'autres bactéries et d'optimiser l'infection, les rhizobia ont développé une capacité spécifique d'interaction avec les poils absorbants. En effet, elles présentent à leur surface des polysaccharides spécifiques appelés glucomannanes qui peuvent se lier aux lectines de plantes exprimées à proximité de l'apex du poil absorbant (De Hoff et al., 2009). Il a ainsi été montré que des souches mutantes de *Rhizobium leguminosarum* qui ne produisent pas de glucomannanes ne peuvent plus infecter le pois lorsqu'on les co-inocule avec des rhizobia sauvages (Laus et al., 2006). Cependant, aucune liaison directe entre les lectines et les glucomannanes n'a pu être mise en évidence lors de cette symbiose.

Suite à l'attachement des bactéries, on observe une déformation des poils absorbants. Cette déformation se traduit généralement par un gonflement dans la partie apicale du poil,

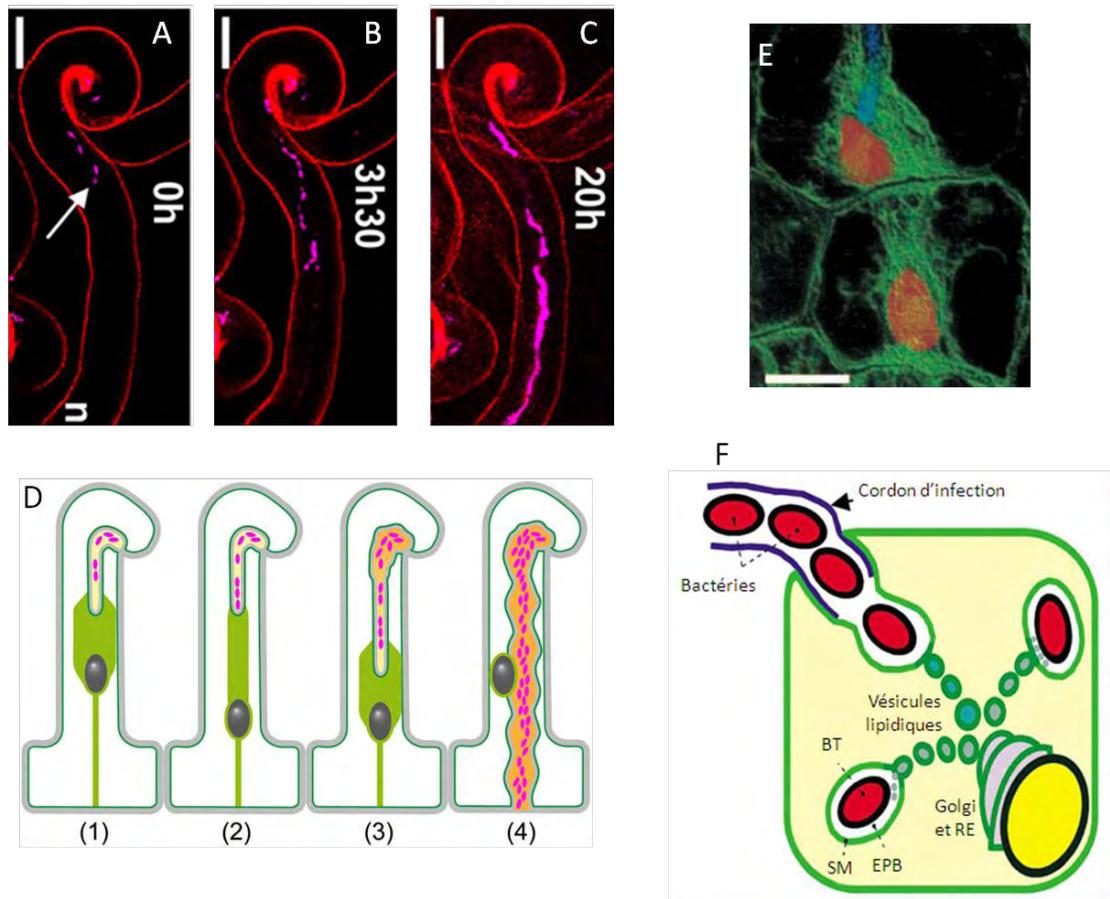


Figure 4. Croissance du cordon d'infection et invasion bactérienne des cellules hôtes.

(A- C) Trois stades successifs de croissance du cordon d'infection dans un poil absorbant. Les bactéries expriment la cCFP (magenta). L'auto-fluorescence de la paroi cellulaire est visualisée en rouge. (A) A ce stade de développement, il y a très peu de bactéries dans le cordon d'infection, et quelques espaces vides sont visibles dans la file de bactéries, que l'on retrouve dans des stades de croissance du cordon plus avancés (B, C). Barres = 10 μ m. (D) Représentation schématique de la croissance du cordon d'infection dans le poil absorbant chez *M. truncatula*. La croissance polaire de l'enveloppe apoplastique crée un espace en face des premières bactéries du cordon d'infection (1, 3). Le glissement des bactéries le long du cordon d'infection ainsi que les divisions cellulaires à différentes positions du cordon d'infection contribuent à la colonisation du cordon (2, 3). Un pont cytoplasmique épais connecte l'apex du cordon au noyau en migration (1, 3). Il est supposé que le noyau dicte la croissance du cordon d'infection. De ce fait, en fonction du stade de croissance du cordon, la distance cordon-noyau est variable, et l'éloignement du noyau se traduit généralement par un affinement du pont cytoplasmique (2). A un stade plus avancé de l'infection, les bactéries se divisent radialement (3, 4), et la surface du cordon devient irrégulière et plus épaisse (4). De plus la position du noyau ne précède plus le cordon d'infection. Gris foncé, noyau ; vert clair, ponts cytoplasmiques ; vert foncé, membrane plasmique ; gris clair, paroi cellulaire ; jaune, matrice du cordon d'infection ; magenta, bactéries. (E) Réorganisation du cytosquelette dans les cellules du cortex externe et formation du cordon de pré-infection. La file de bactérie (bleu) présente dans le cordon d'infection suit le cordon de pré-infection formé par le cytosquelette (vert). Barres = 15 μ m. (F) Représentation schématique de l'invasion intracellulaire et de la différenciation des symbiosomes. BT, bactéroïdes ; SM, membrane du symbiosome ; EPB, espace péri-bactéroïdien ; RE, réticulum endoplasmique.

D'après Fournier et al., 2008 ; Timmers et al., 1999 ; Patriarca et al., 2004.

accompagné d'une courbure qui aboutit à la formation d'une structure en « crosse de berger », dans laquelle les bactéries sont piégées, formant une « poche d'infection ». Les rhizobia piégées continuent de se diviser et s'accumulent sous la forme de micro-colonies (Oldroyd et al., 2011). Il s'en suit une dégradation localisée de la paroi cellulaire végétale nécessaire à l'initiation du cordon d'infection. Cette dégradation de la paroi est probablement la conséquence de l'action d'enzymes à la fois bactériennes et végétales (Oldroyd et al., 2011). De manière intéressante, plusieurs gènes de légumineuses codant pour des enzymes de dégradation de la paroi, comme des pectine-méthylestérases (Lievens et al., 2002) ou des poly-galacturonases (Munoz et al., 1998), sont induits au cours de l'infection. De plus, l'action d'une pectate lyase (LjNPL) a été montrée comme essentielle dans le processus d'infection chez le lotier, et des plantes mutées sur le gène *LjNPL* présentent un arrêt de l'infection au stade de micro-colonies. Ces données confirment que la dégradation des parois cellulaires végétales est requise pour l'infection pendant l'initiation de l'interaction symbiotique *rhizobium*-légumineuses (Xie et al., 2012).

Le noyau du poil absorbant migre à proximité de la micro-colonie, et le cytosquelette s'aligne le long du poil absorbant sous forme de pont cytoplasmique, induisant une structure de pré-infection (Timmers, 2008). Cette structure permet le processus d'invagination de la membrane plasmique du poil absorbant, et guide la croissance interne du cordon d'infection. Cette croissance soutenue du cordon d'infection requiert une déposition permanente de matériel membranaire et pariétal, transporté par des vésicules issues de l'appareil de Golgi, au niveau de l'extrémité du cordon d'infection. Le transport de ces vésicules vers l'extrémité du cordon d'infection est assuré par des filaments de F-actine. De plus le noyau du poil absorbant précède la croissance du cordon d'infection, et est lié à l'extrémité de ce dernier. Il permet ainsi de dicter la direction de croissance du cordon à travers le poil absorbant (Fournier et al., 2008), et son positionnement est également stabilisé par des filaments d'actine. La croissance du cordon d'infection est un processus discontinu dirigé par la plante (Figure 4).

Lorsque le cordon d'infection atteint la base du poil absorbant, le noyau de la cellule corticale adjacente se repositionne, et induit la formation d'une nouvelle structure de pré-infection dans cette cellule (Timmers et al., 1999) (Figure 4E). Cette structure est alignée avec le cordon d'infection en croissance dans le poil absorbant, et une nouvelle dégradation localisée de la paroi cellulaire végétale permet au cordon de poursuivre sa croissance à travers le cortex sur le point d'être traversé.

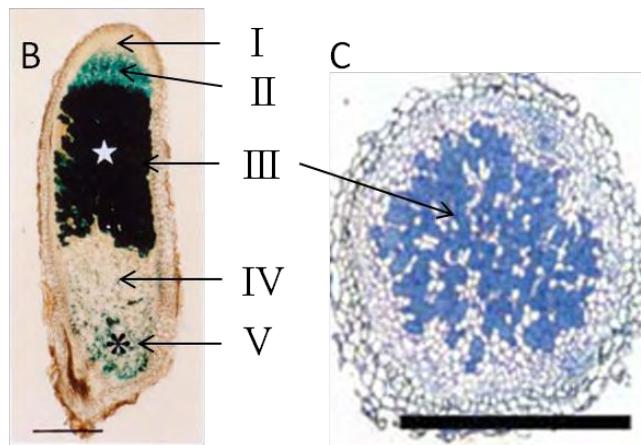
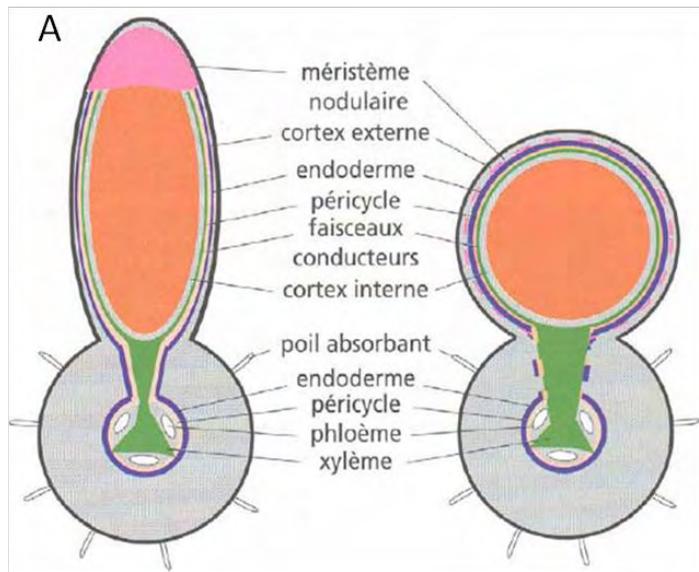


Figure 5. Deux types de nodules matures.

(A) Représentation schématique de nodules indéterminés et déterminés. (B) Coupe longitudinale d'un nodule indéterminé mature de *Medicago sativa*, montrant la différenciation en cinq zones : la zone méristématique (I), la zone d'infection (II), la zone de fixation (III), la zone de sénescence (IV), et la zone saprophytique (V). Barre = 50µm. (C) Coupe transversale de nodule déterminé mature de *Lotus japonicus* montrant une organisation homogène avec une zone unique de fixation. Barres = 50 µm (B), 1mm (C).

D'après Duhoux and Nicole, 2004, Timmers et al., 2000, Ott et al., 2005.

ii. L'organogénèse nodulaire

De manière concomitante à l'infection dans les poils absorbants, les cellules du cortex racinaire se différencient et subissent des cycles de mitoses menant à la formation d'un primordium nodulaire (Brewin, 1991; Patriarca et al., 2004).

Il existe deux types majeurs de morphologie nodulaire chez les légumineuses. Les légumineuses tempérées (pois, luzerne, trèfle...) forment généralement des nodules indéterminés, alors que les légumineuses tropicales (soja, haricot...) forment des nodules déterminés. Les différences entre ces deux types de nodules sont liées aux sites des premières divisions cellulaires associées au primordium nodulaire, au maintien d'une région méristématique, et à la forme des nodules matures (Ferguson et al., 2010) (Figure 5). Les nodules indéterminés (e.g. *Medicago truncatula*) ont un méristème actif persistant, ce qui leur confère une forme allongée et cylindrique. Les nodules déterminés (e.g. *Lotus japonicus*) ont un méristème non persistant, leur conférant une forme sphérique. Ces deux types de nodules sont issus de deux processus développementaux différents au niveau racinaire. Les nodules indéterminés sont formés à partir des cellules du péricycle et du cortex interne, alors que les nodules à croissance déterminée proviennent des cellules du cortex moyen ou du cortex externe (Oldroyd and Downie, 2008).

Chez *Medicago* sp., les premières divisions cellulaires se produisent dans le péricycle entre 16 et 18 heures après inoculation. Elles sont constituées de divisions anticlinales, puis périclinales, et permettent la formation d'un péricycle à deux assises cellulaires qui serait à l'origine de la vascularisation du futur nodule (Kondorosi et al., 2005). Il a été observé chez *Medicago sativa* que les premières divisions des cellules du cortex interne apparaissent entre 18 et 24 heures après inoculation (Timmers et al., 1999) (Figure 6). Ces divisions vont induire la formation du primordium initial. Une activation des cellules du cortex moyen et externe débute immédiatement après la formation du primordium initial (entre 24 et 48 heures après inoculation) (Figure 6). Le primordium nodulaire est ainsi formé à partir du primordium initial et des divisions cellulaires du cortex moyen et externe (Timmers et al., 1999). Les cordons d'infection en croissance atteignent les cellules du cortex interne en division, alors que les cellules du cortex moyen et externe forment le méristème nodulaire. L'utilisation de mutants bactériens affectés dans l'infection n'abolit pas la formation du méristème nodulaire (Ferguson et al., 2010), ce qui laisse supposer que les cellules du cortex interne en divisions servent de réceptacles aux cordons d'infections pendant la formation du méristème nodulaire.

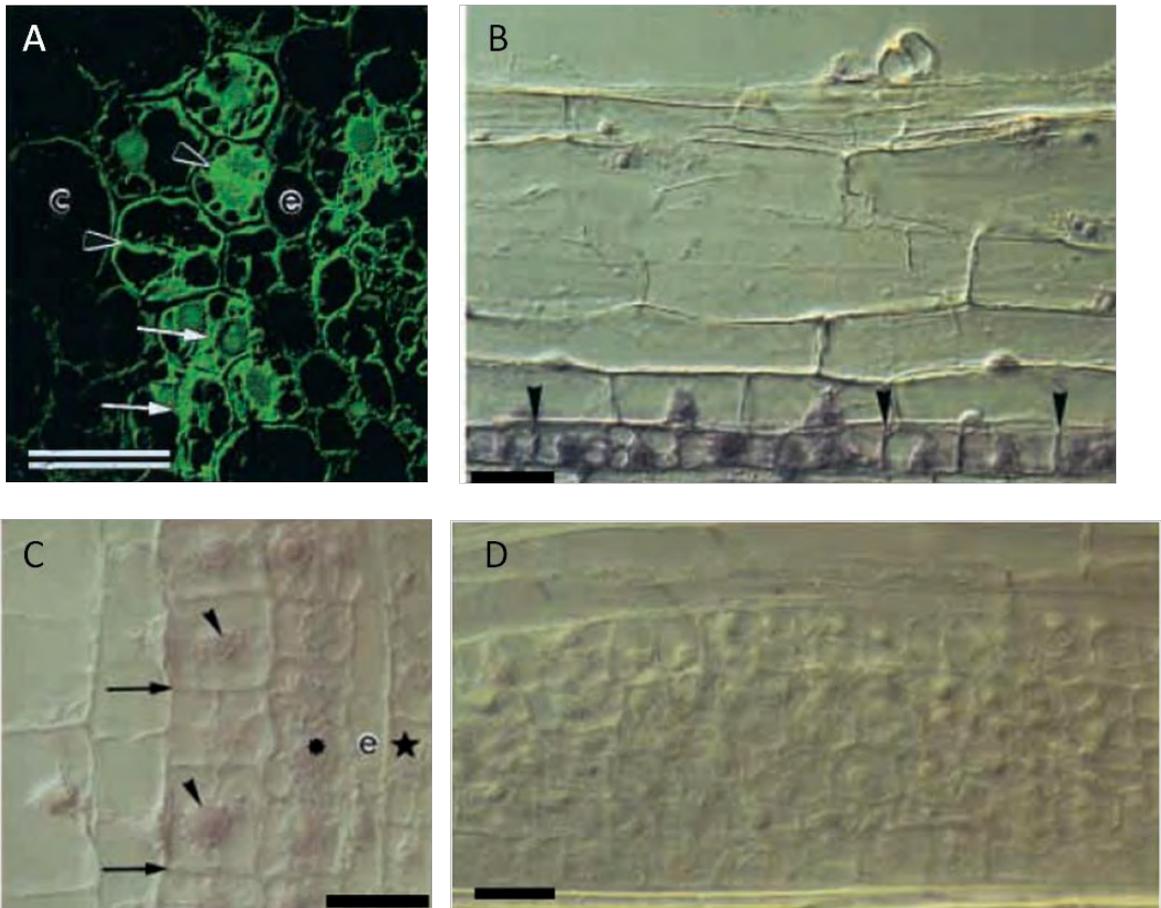


Figure 6. Formation du primordium nodulaire.

(A, B) Activation du cortex interne et formation du primordium initial. (A) Coupe transversale de racines de *Medicago sativa* montrant les divisions cellulaires anticlinales (têtes de flèches noires) et périclinales (flèches blanches) dans le cortex interne. (B) Coupe longitudinale montrant les divisions anticlinales (têtes de flèches) dans le cortex racinaire interne. e, endoderme ; c, cortex racinaire. Barres = 25µm. (C, D) Formation du primordium. (C) Coupe longitudinale de racine montrant l'activation (organisation isodiamétrique du cytoplasme autour du noyau) (têtes de flèches), et la division (flèches) des cellules corticales adjacentes au primordium initial (astérisque). Etoile, péricycle ; e, endoderme. (D) Coupe longitudinale montrant un primordium nodulaire chez *Medicago sativa*. Barres = 25µm. D'après Timmers et al., 1999.

De plus, l'étude de mutants défectifs dans la nodulation a permis de montrer que les réponses épidermiques et corticales peuvent être séparées : l'infection bactérienne peut se produire en absence d'organogénèse nodulaire (Murray et al., 2007b), et inversement, l'organogénèse nodulaire peut se produire en absence d'infection bactérienne (Tirichine et al., 2006b; Tirichine et al., 2006a; Tirichine et al., 2007), suggérant l'existence d'un signal entre l'épiderme racinaire et les couches plus internes, signal non connu à ce jour.

Bien qu'il n'y ait pas d'évidence expérimentale concernant la provenance des différents tissus nodulaires, il est très probable que ceux-ci dérivent de l'activité méristématique du nodule. Le nodule mature est composé de tissus périphériques et centraux (Figure 5). La région périphérique est composée, de l'extérieur vers l'intérieur, du cortex externe, de l'endoderme, et du cortex interne (parenchyme nodulaire), qui contient les faisceaux vasculaires (Patriarca et al., 2004). La région centrale du nodule indéterminé est différenciée en quatre ou cinq zones, selon l'âge du nodule :

- La zone méristématique (zone I) est composée de petites cellules riches en cytoplasme.
- La zone d'infection (zone II) est constituée d'une quinzaine d'assises cellulaires (Vasse et al., 1990). C'est dans cette zone que les bactéries sont relâchées depuis les cordons d'infection, et sont internalisées dans le cytoplasme des cellules végétales par un processus d'endocytose. Dans la partie distale, les cellules végétales envahies subissent une différenciation morphologique, passant par des cycles d'endoréplication et un élargissement des cellules (Foucher and Kondorosi, 2000), pour devenir quasi sphériques dans la partie proximale (Timmers et al., 1998). Les rhizobia internalisés dans les cellules de l'hôte sont appelés bactéroïdes. La vésicule qui contient les bactéroïdes est appelée symbiosome. Au cours de cette différenciation, les bactéroïdes s'agrandissent d'environ 30 fois et deviennent plus allongés.
- L'interzone II-III s'étend sur une à trois assises cellulaires (Vasse et al., 1990). Dans cette zone, les cellules envahies sont remplies d'amyloplast. Avec le cortex nodulaire, cette zone constitue une barrière étanche qui empêche la diffusion d'oxygène vers la zone de fixation (Soupene et al., 1995).
- La zone de fixation (zone III) est composée de cellules géantes polyploïdes en phase terminale de différenciation, et qui possèdent une grande vacuole centrale. Ces cellules sont remplies de bactéroïdes disposés perpendiculairement à la membrane des cellules

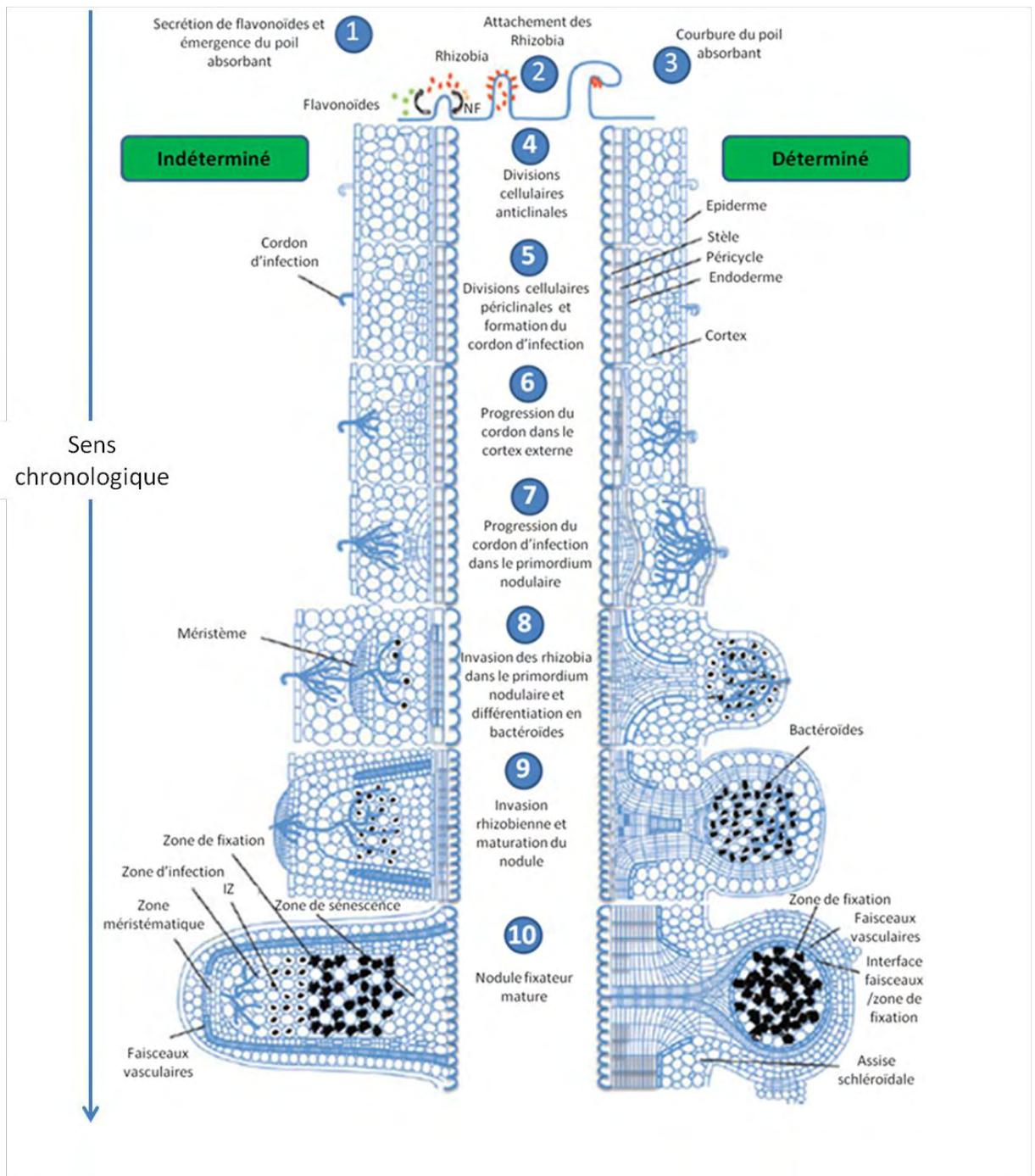


Figure 7. Schéma représentatif des différentes étapes de la nodulation.

L'ordre chronologique des processus développementaux menant à la formation du nodule mature est indiqué par des numéros. NF, facteurs Nods ; IZ, interzone II-III.

D'après Ferguson et al., 2010.

végétales (disposition en rayons de bicyclette) (Timmers et al., 1998). C'est dans cette zone qu'a lieu la conversion du diazote (N_2) en ammonium. La disposition des bactéroïdes en rayons de bicyclette est progressivement perdue dans la partie proximale de la zone III. De plus, les cellules non-envahies sont petites et diploïdes (Timmers et al., 1998).

- La zone de sénescence (zone IV) comprend les cellules de l'hôte et les cellules bactériennes en fin de cycle qui dégènèrent (Timmers et al., 1998).
- La zone saprophytique (zone V) est présente dans des nodules âgés de plus de 6 semaines (Timmers et al., 2000). Elle contient des bactéries non-différenciées libérées des cordons d'infection restants, qui envahissent les cellules sénescents du nodule. Cette zone constituerait une niche écologique où les bactéries vivraient comme des organismes saprophytes.

De manière intéressante, il a été récemment montré que le processus de différenciation des bactéroïdes dans les nodules indéterminés est dicté par la production chez l'hôte de peptides anti-microbiens appelés NCRs (Nodule-specific Cystein Rich) spécifiquement exprimés dans les cellules symbiotiques (Van de Velde et al., 2010). Ces peptides ciblent les bactéries et provoquent chez elles une amplification du génome, une forte élongation cellulaire, une perméabilité membranaire accrue, et une perte de la capacité de division cellulaire. Il a ainsi été proposé que les NCR interfèrent avec le métabolisme bactérien dans le but d'optimiser la fixation azotée.

Finalement, la structure du nodule mature confère un environnement favorable au bon fonctionnement de la symbiose *Rhizobium*-légumineuses. Il a été montré en particulier que l'organisation tissulaire du cortex nodulaire confère un environnement de micro-aérobie approprié à l'activité de la nitrogénase (Minchin, 1997).

Une reproduction schématique du processus de nodulation dans le temps est présentée dans la Figure 7.

2. Bases moléculaires de la symbiose *Rhizobium*-légumineuses

L'établissement de la symbiose entre les rhizobia et les légumineuses requiert un échange de signaux entre la plante hôte et la bactérie symbiotique (Figure 8). Les rhizobia peuvent percevoir des composés phénoliques présents dans les exsudats racinaires appelés

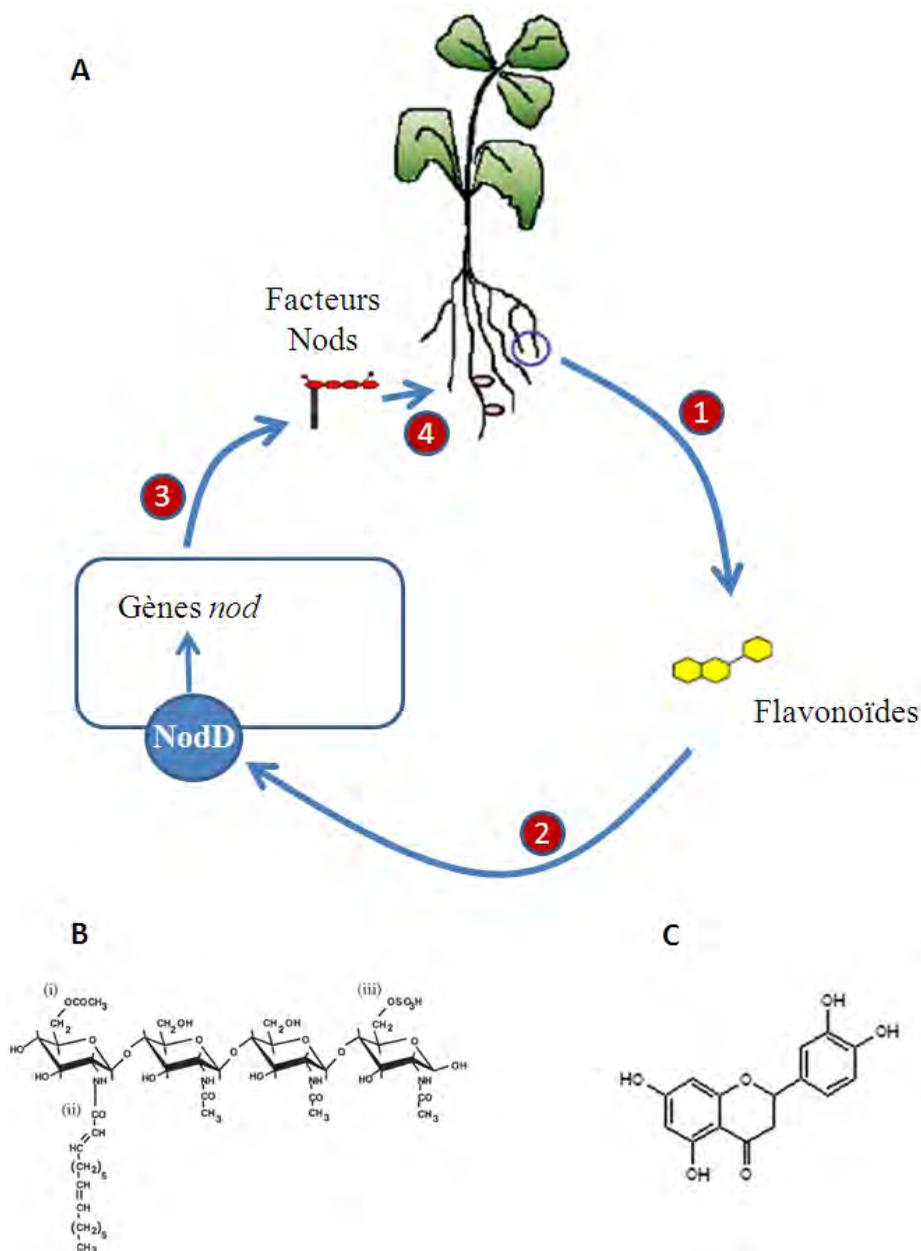


Figure 8. Dialogue moléculaire initiant la symbiose *Rhizobium*-légumineuses.

(A) (1) Les racines de la plante hôte sécrètent des flavonoïdes. (2) Les flavonoïdes sont perçus par les rhizobia, activant la protéine NodD responsable de la régulation positive de l'expression des gènes *nod* bactériens. (3) Les rhizobia sécrètent en retour des facteurs Nods. (4) Les facteurs Nods sont perçus par la plante au niveau des poils absorbants racinaires et activent l'initiation du programme symbiotique. (B) Structure du facteur Nod majoritaire sécrété par *Sinorhizobium meliloti*. Le squelette de N-acétylglucosamine et le groupement N-Acyl (ii) sont communs à tous les facteurs Nods. La protéine NodL est responsable de l'ajout du groupement O-acétyl (i), et la protéine NodF est responsable de l'ajout du groupement acyl (ii). La présence du groupement O-sulfate (iii) est essentielle à la spécificité d'hôte de ce facteur Nod. (C) Structure de la lutéoline, flavonoïde sécrété par *Medicago truncatula*.
D'après Oldroyd, 2001, Hassan and Mathesius, 2012.

flavonoïdes. Ceux-ci sont en partie responsables de la spécificité d'interaction symbiotique, puisque chaque espèce de *rhizobium* répond à des flavonoïdes spécifiques. La perception des flavonoïdes attire les bactéries par chimiotactisme vers la racine de la plante hôte, et active l'expression des gènes *nod* bactériens. Ces gènes sont à l'origine de la production et de la sécrétion de lipo-chitooligosaccharides appelés facteurs Nods (NFs). Au même titre que les flavonoïdes, les NFs jouent un rôle clé dans la spécificité d'interaction (Denarie et al., 1996) et leurs structures moléculaires sont dépendantes de la souche productrice. Il est tout de même intéressant de noter que certaines souches de *Bradyrhizobium* pouvant induire le développement nodulaire ne possèdent pas dans leur génome de gènes *nodABC* requis pour la biosynthèse des NFs (Giraud et al., 2007). Les rhizobia concernés utilisent un mode d'infection rudimentaire, appelé « crack entry », au cours duquel les bactéries pénètrent dans les tissus racinaires internes via des blessures généralement causées par l'émergence de racines latérales. Ce cas de figure reste néanmoins une exception. Le plus souvent, les NFs sont reconnus par la plante au niveau des poils absorbants racinaires, induisant une cascade de signalisation responsable de l'initiation du programme développemental à l'origine de la formation du nodule.

2.1 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires synthétisés à partir des voies des phénylpropanoïdes et de l'acétate-malonate (Cooper, 2007). De plus, ils partagent leurs précurseurs avec ceux de la voie de biosynthèse des lignines. A ce jour, plus de 10 000 flavonoïdes différents ont été identifiés chez les plantes (Ferrer et al., 2008). Leur diversité provient de la génération d'un grand nombre de structures basales incluant les flavones, les flavonoles, les flavan-3-ols, les flavonones, les isoflavonoïdes, les isoflavanes et les ptérocarpanes (Figure 9). Le squelette flavonoïdique peut de plus être modifié par glycosylation, malonylation, méthylation, hydroxylation, acylation, prénylation, ou polymérisation, ce qui apporte une grande diversité de produits finaux. Ces substitutions ont des effets importants sur la solubilité, la mobilité, la dégradation, et la fonction des flavonoïdes. En ce qui concerne leurs rôles au cours de l'interaction *rhizobium*-légumineuses, les flavonoïdes activent ou inhibent l'expression des gènes *nod* ainsi que d'autres gènes rhizobiens, ils attirent les rhizobia par chimiotactisme, et ils déterminent la spécificité d'hôte (Cooper, 2004).

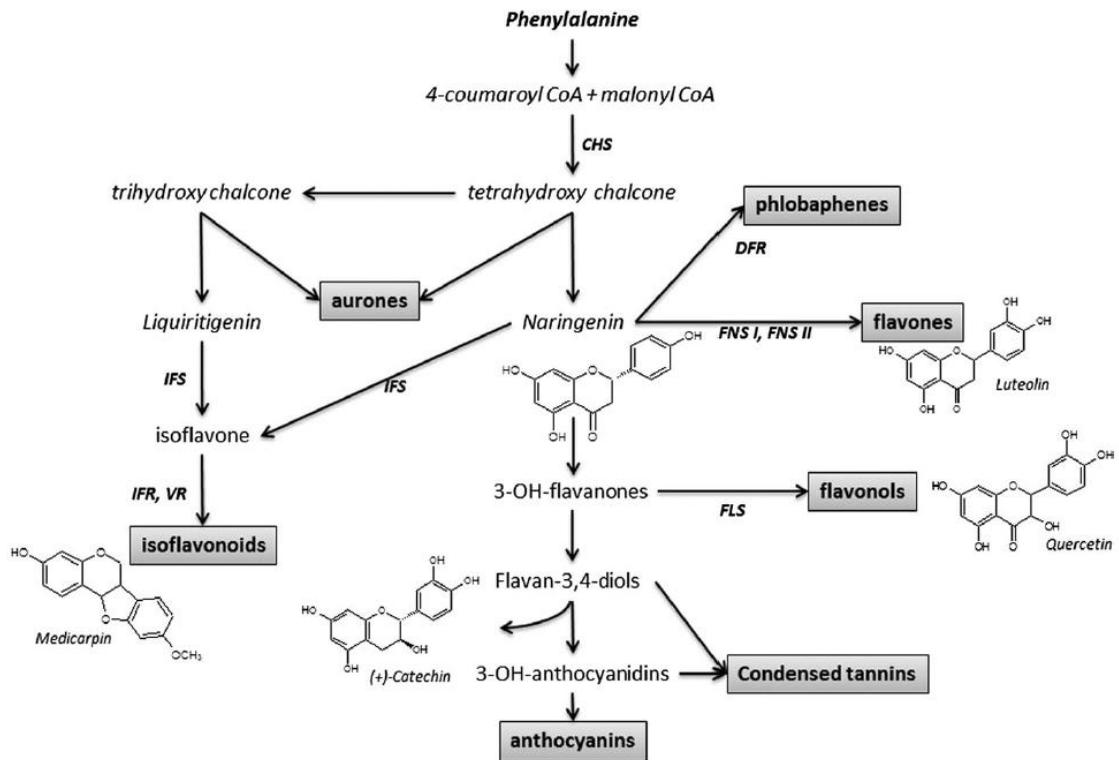


Figure 9. Les branches majeures de la voie de biosynthèse des flavonoïdes.

Certaines enzymes essentielles sont mentionnées en caractères gras et en abrégés. CHS, chalcone synthase ; DFR, dihydroflavonol 4-réductase ; FLS, flavonol synthase ; IFS, isoflavone synthase ; IFR, isoflavone réductase ; LCR, leucoanthocyanidine réductase ; VR, vestitone réductase. Les classes de produits finaux majeurs sont encadrées. D'après Hassan et Mathesius, 2011.

Le rôle des flavonoïdes dans le contrôle de l'expression des gènes *nod* rhizobiens a été largement étudié. La perception des flavonoïdes par les rhizobia est liée à une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, permettant l'activation de la protéine NodD et de l'expression subséquente des gènes *nod* (Moscatiello et al., 2010). Au cours de ce processus, la protéine NodD bactérienne agit à la fois comme un récepteur des flavonoïdes, et un activateur transcriptionnel des gènes *nod* (Li et al., 2008; Hassan and Mathesius, 2012). NodD fait partie de la famille des régulateurs transcriptionnels de type LysR. En réponse à des flavonoïdes appropriés, cette protéine peut se lier à des séquences d'ADN spécifiques appelées « *nod* boxes », que l'on retrouve dans les régions promotrices des gènes *nod*. Cette liaison faciliterait l'accès de l'ARN polymérase et augmenterait l'activité transcriptionnelle des gènes *nod* sur le site promoteur où NodD est présent (Peck et al., 2006). Les premiers flavonoïdes ayant été montrés comme jouant un rôle inducteur de l'expression des gènes *nod* sont les lutéolines (Figures 8C et 9), isolées chez *Medicago sativa*, et les DHF (dihydroxyflavones), isolées chez *Trifolium repens* (Peters et al., 1986; Redmond et al., 1986). Depuis, de nombreux autres flavonoïdes ont été impliqués dans ce processus (Cooper, 2004). La présence d'un mélange spécifique de flavonoïdes dans les exsudats racinaires de légumineuses ainsi que la perception de ces flavonoïdes par les protéines NodD des différents rhizobia jouent également un rôle dans la spécificité d'hôte (Hassan and Mathesius, 2012). De manière intéressante, certains flavonoïdes induisent la répression de l'expression des gènes *nod*. C'est par exemple le cas de la médicarpine (Figure 9) et du coumestrole qui contrôlent négativement la production de NFs chez *Sinorhizobium meliloti* (Hassan and Mathesius, 2012). On pense que l'activation et la répression des gènes *nod* sont deux mécanismes importants pour le maintien d'une production de NFs en quantité optimale, et empêchent les réponses de défense chez la plante hôte.

2.2 Les facteurs Nods

Les facteurs Nods sont des molécules symbiotiques de nature lipochitooligosaccharidique (LCO) produits par les rhizobia (Lerouge et al., 1990). Ils consistent en un squelette oligomérique de chitine, constitué de résidus N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) liés en β -1,4. Une chaîne d'acide gras est ajoutée à l'extrémité non-réductrice de l'oligomère de chitine par N-acylation (Denarie et al., 1996). Les variations dans la structure des NFs proviennent de différentes sources : la longueur du squelette oligosaccharidique (entre deux et six résidus GlcNAc), le type d'acide gras ajouté à l'extrémité non-réductrice

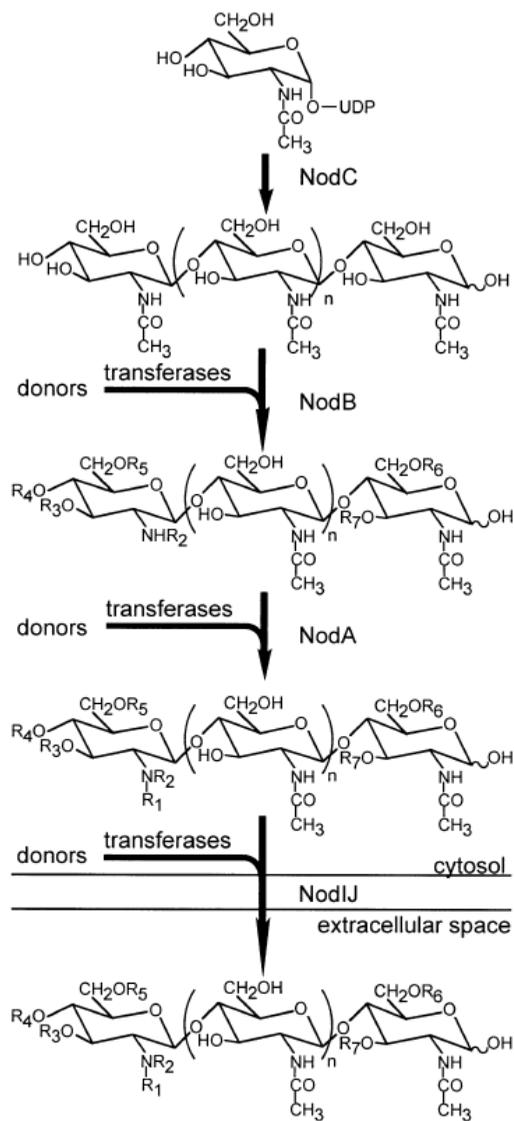


Figure 10. Biosynthèse et transport des facteurs Nods.

Les protéines NodC, NodB, et NodA sont au cœur de la voie de biosynthèse des facteurs Nods. En fonction de la souche de *Rhizobium*, différentes modifications souches-spécifiques sont catalysées par des transférases. Ces transférases peuvent interférer à n'importe quelle étape de la voie NodCBA. Comme exemples, la fucosyltransférase NodZ (R6) agit en aval de NodC ; la méthyltransférase NodS (R2) et l'acétyltransférase NodL (R5) agissent en aval de NodB ; la sulphydrosyltransférase NodH (R6) agit en aval de NodA. Une fois que la synthèse des facteurs Nods est achevée, les LCOs sont sécrétés par un complexe protéique impliquant NodI et NodJ. D'après Mergaert et al., 1997.

(saturé, mono-insaturé, ou poly-insaturé), et le nombre et les types de décorations portées par la molécule (e.g. acétylé, arabinosyle, fucosyle, mannosyle, sulfate, etc...) (Perret et al., 2000a). La structure du NF majoritaire de *Sinorhizobium meliloti* est décrite dans la figure 8B.

L'organisation, la régulation, et la fonction des gènes *nod* impliqués dans la synthèse des NFs ainsi que dans leurs structures et leurs propriétés ont été largement étudiées. Ils sont divisés en deux classes distinctes. Les gènes *nodABC*, également appelés gènes structuraux, sont communs à tous les rhizobia, et sont responsables de la synthèse du squelette lipochitooligosaccharidique (Denarie et al., 1996) (Figure 10, Tableau 3). Le gène *nodC* code pour une N-acetyl-glucosaminyl transférase responsable de la première étape d'assemblage des GlcNAc. Son rôle est de former la chaîne chitooligosaccharidique à partir du précurseur UDP-GlcNAc. Ensuite le sucre de l'extrémité non-réductrice de l'oligomère de GlcNAc est N-dé-acétylé par le produit du gène *nodB*. Finalement, le carbone C-2 de l'extrémité non-réductrice de l'oligomère est acylé par le produit du gène *nodA*. Alors que les gènes *nodABC* sont absolument requis pour la synthèse de dimères, trimères, tétramères ou pentamères de chitine, les gènes *nod* non-communs sont impliqués dans la décoration des LCOs. Le tableau 3 résume les fonctions biochimiques des produits des gènes *nod* dans la synthèse et le transport des NFs.

Toutes les souches de *rhizobium* ne produisent pas qu'un seul type de NF mais un cocktail de molécules différentes. De manière fréquente, les NFs d'une souche donnée ont plusieurs N-acylations différentes au niveau de l'extrémité non-réductrice (Denarie et al., 1996). On pense que ces variations sont causées par la relativement faible spécificité de l'enzyme NodA chez certaines espèces. Chez *Rhizobium* sp. NGR234, les NFs produits ont zéro, un ou deux groupements carbamoyls, ainsi qu'un acide gras palmitoylique ou stéaroylique à l'extrémité non-réductrice. De plus, l'extrémité réductrice peut avoir plusieurs décorations différentes (le groupement 2-O-méthylfucosyle peut être non-décoré, sulfaté ou acétylé) (Mergaert et al., 1997). Il a été proposé que cette diversité de structures contrôle l'inhabituel large spectre d'hôtes de la souche NGR234. Cependant, même si l'on dispose de beaucoup d'informations quant à l'influence de la structure des NFs sur la spécificité d'hôte, il n'y a pas de corrélation stricte entre les types de LCOs produits par les rhizobia et les plantes que ceux-ci nodulent. Par exemple, bien que les NFs produits par *Rhizobium etli* et *Rhizobium loti* soient identiques, les deux espèces ont des spectres d'hôtes distincts (*Phaseolus* sp. et *Lotus* sp., respectivement) (Perret et al., 2000). A l'inverse, *Rhizobium*

Tableau 3. Fonction biochimique des produits des gènes nod impliqués dans la synthèse et le transport des facteurs Nods.

Gène nod	Espèce	Fonction
<u>Régulation de l'expression des gènes nod</u>		
<i>nodD</i>	Commun	Régulateur transcriptionnel de type LysR
<i>nodV</i>	Bj	Récepteur à double-composantes
<i>nodW</i>	Bj	Récepteur à double-composantes
<i>nolA</i>	Bj	Régulateur transcriptionnel de type MerR
<i>nolR</i>	Rm	Régulateur transcriptionnel de type LysR
<i>syrM</i>	Rm	Régulateur transcriptionnel de type LysR
<u>Synthèse du squelette oligosaccharidique</u>		
<i>nodM</i>	Rm, Rlv, Rlt	D-glucosamine synthase
<i>nodC</i>	Commun	UDP-GlcNAc transférase
<i>nodB</i>	Commun	Dé-N-acétylase
<u>N-substitutions à l'extrémité non-réductrice</u>		
<i>nodE</i>	Rm, Rlv, Rlt	β -kétolactyl synthase
<i>nodF</i>	Rm, Rlv, Rlt	Transporteur de groupement acyl
<i>nodA</i>	Commun	N-acyltransférase
<i>nodS</i>	Rn, Rt, Ac, Bj, Rf	S-adenosyl méthionine méthyltransférase
<u>O-substitutions à l'extrémité non-réductrice</u>		
<i>nodL</i>	Rm, Rlv, Rlt	6-O-acétyltransférase
<i>nodU</i>	Rn, Rt, Ac, Bj, Rf	6-O-carbamoyltransférase
<u>O-substitutions à l'extrémité réductrice</u>		
<i>nodP</i>	Rm, Rt	ATP sulfurylase
<i>nodQ</i>	Rm, Rt	ATP sulfurylase, APS kinase
<i>nodH</i>	Rm, Rt	Sulfotransférase
<i>nodZ</i>	Bj, Rn	Fucosyltransférase
<i>nodZ</i>	Ac	Glycosyltransférase
<i>nolK</i>	Ac	Sucre épimérase
<i>nodX</i>	Rlv TOM	Acétyltransférase
<u>Sécrétion des facteurs Nods</u>		
<i>nodI</i>	Commun	Protéine de liaison à l'ATP
<i>nodJ</i>	Commun	Protéine membranaire
<i>nodT</i>	Rlv, Rlt	Protéine de la membrane externe
<i>nolFGHI</i>	Rm	Protéines membranaires

Ac, *Azorhizobium caulinodans* ; Bj, *Bradirhizobium japonicus* ; Rf, *Rhizobium fredii* ; Rl, *Rhizobium loti* ; Rlt, *Rhizobium loti* bv *trifolii* ; Rlv, *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* ; Rm, *Rhizobium meliloti* ; Rn, *Rhizobium* sp. NGR234 ; Rt, *Rhizobium tropici*.

D'après Dénarié et al., 1996.

tropici et *Rhizobium etli* nodulent la même plante hôte alors qu'elles produisent des NFs sulfatés et acétyfucosylés, respectivement. Ces données montrent que les structures des NFs ne peuvent pas expliquer à elles seules la spécificité d'hôtes. Les quantités de NFs secrétés par les rhizobia sont également impliquées dans la spécificité d'hôtes. Dans ce sens, il a été montré que le transfert des gènes *nodSU* de la souche NGR234 à la souche de *Rhizobium fredii* USDA257 augmente quantitativement la production de NFs et permet un élargissement du spectre d'hôtes de *Rhizobium fredii*. Ainsi le rôle des NFs dans la spécificité d'hôtes serait très probablement une résultante de la structure, de la quantité absolue, et des proportions relatives de ces molécules secrétées par les rhizobia (Perret et al., 2000a).

2.3 Les réponses de l'hôte aux facteurs Nods

En fonction du stade de développement des poils absorbants racinaires, on peut définir trois zones différentes, réparties de la pointe racinaire vers les parties les plus âgées de la racine (Figure 11). La zone I, à proximité de la pointe racinaire, contient les poils absorbants en croissance active. La zone II, également appelée « zone de susceptibilité » ou « zone de pré-infection », contient les poils absorbants qui initient leur terminaison de croissance. Enfin la zone III contient les poils absorbants matures ayant achevé leur croissance. Beaucoup d'évènements apparentés aux étapes précoces de la nodulation sont induits par les NFs, particulièrement dans la zone de susceptibilité, où les poils absorbants répondent aux NFs des rhizobia par des changements morphologiques particuliers (déformations et courbures des poils absorbants). En plus des réponses épidermiques, les NFs sont capables dans de nombreux cas d'activer la division des cellules corticales, et d'induire la formation de cordons de pré-infection. Les réponses racinaires de la plante aux NFs sont détaillées dans cette section, et résumées dans la figure 12.

2.3.1 Flux ioniques et oscillations calciques

Les toutes premières réponses des poils absorbants aux NFs sont une alcalinisation suivie d'une dépolarisation membranaire (Figure 12A). Les mouvements ioniques responsables de ces réponses électrophysiologiques ont été suivis dans le temps de manière détaillée à l'aide de micro-électrodes sélectives pour les ions Ca^{2+} , K^+ , et Cl^- , chez *Medicago sativa* (Felle et al., 1998, 1999b, a). De manière quasi immédiate, une diminution de la concentration en Ca^{2+} dans le milieu de croissance (Felle et al., 1998) est associée à une augmentation de sa concentration dans le cytoplasme des poils absorbants racinaires (Felle et al., 1999b, a). Cet influx de Ca^{2+} a également été visualisé chez *Phaseolus vulgaris* (Cardenas

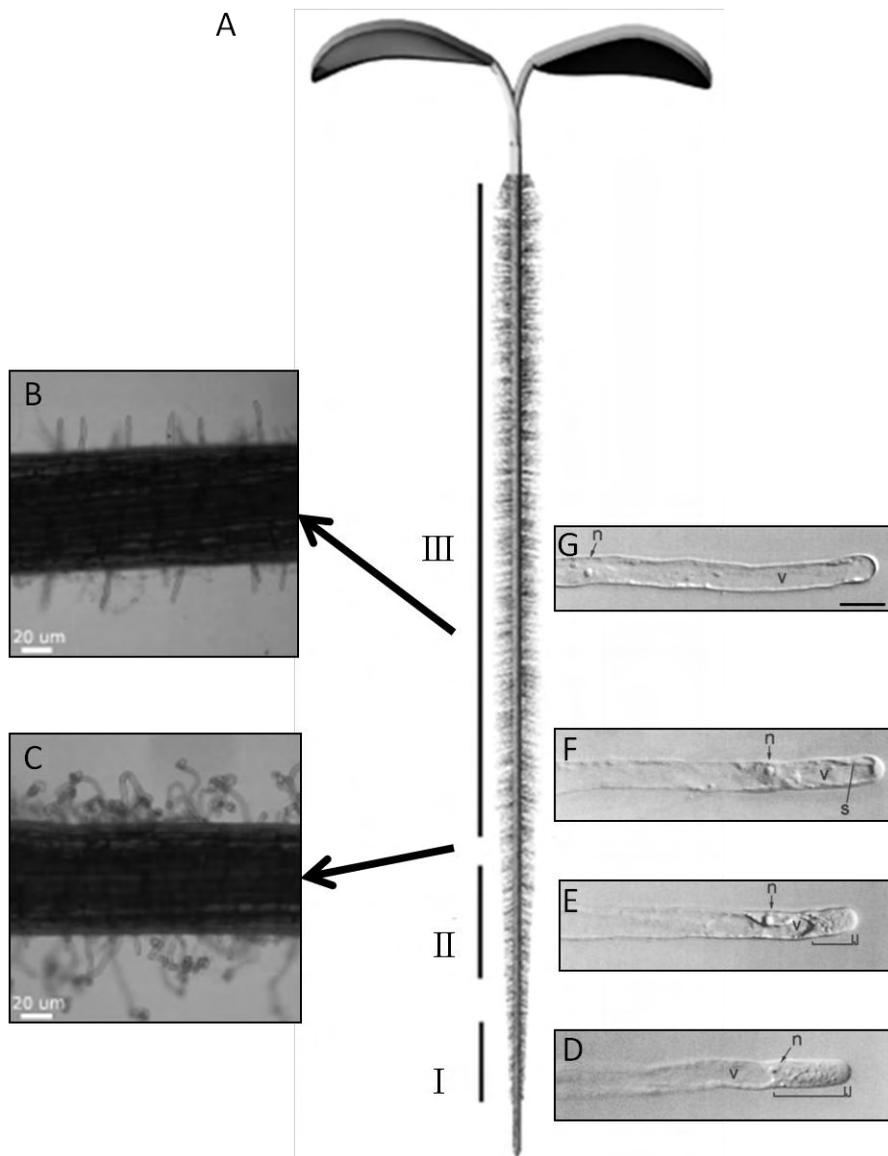


Figure 11. Développement des poils absorbants racinaires et réponses morphologiques à *Rhizobium*.

(A-C) Diagramme montrant la localisation des zones I, II et III de développement des poils absorbants racinaires chez *Medicago sativa* (A). Les réponses des poils absorbants à *Sinorhizobium meliloti* varient le long d'une racine (B, C). Les Had et Hac ne sont visibles que sur les poils en terminaison de croissance (B). (D-G) Architecture des poils absorbants en développement chez *Medicago truncatula*. (D) Poil absorbant en croissance. La région sub-apicale est riche en cytoplasme (crochet large) et est occupée à sa base par le noyau. Le reste de la cellule est occupé par la vacuole et le cytoplasme cortical. Une région claire (petit crochet) est observée à l'apex du poil, correspondant à une zone riche en vésicules provenant du Golgi, et en direction de la membrane plasmique. (E) Poil absorbant en début de terminaison de croissance. La vacuole englobe le noyau et progresse vers l'apex du poil, alors que le volume de la région riche en cytoplasme (grand crochet) se réduit. La zone claire est encore présente à l'apex du poil (petit crochet). (F) Poil absorbant en fin de terminaison de croissance. La vacuole occupe la quasi-totalité du poil. (G) Poil absorbant mature. La vacuole occupe tout le volume du poil, et reste entourée par une fine couche de cytoplasme. Le noyau est positionné de manière aléatoire. n, noyau ; s, trace cytoplasmique ; v, vacuole. Barres = 20μm.

D'après Gage 2004 ; Sieberer and Emons, 2000.

et al., 1999) et *Medicago truncatula* (Shaw and Long, 2003), sous la forme d'une augmentation de la concentration en Ca^{2+} cytosolique dans la partie apicale des poils absorbants de la zone de susceptibilité (Figure 12A). Felle et al. (1998) ont également mesuré une augmentation de la concentration en Cl^- dans le milieu de culture quelques millisecondes après l'influx calcique, expliquée par un efflux d'ions Cl^- . Ensemble, l'influx d'ions Ca^{2+} et l'efflux d'ions Cl^- mènent à une dépolarisation membranaire du poil absorbant (Ehrhardt et al., 1992; Felle et al., 1995; Kurkdjian, 1995). Suite à cette dépolarisation, des efflux d'ions K^+ associés à l'activité de pompes à protons seraient responsables d'une re-polarisation membranaire (Felle et al., 1998).

Des oscillations calciques dans les poils absorbants racinaires apparaissent environ dix minutes après ajout de NFs, et font suite à la dépolarisation membranaire (Ehrhardt et al., 1996) (Figure 12A). Ces oscillations se produisent à la fois dans le nucléoplasme et dans le cytoplasme périnucléaire (Sieberer et al., 2009), et proviendraient de l'enveloppe nucléaire (Capoen et al., 2011). Elles ont une périodicité d'une minute (Ehrhardt et al., 1996), et sont caractérisées par des pics asymétriques, dont la phase croissante est bien plus rapide que la phase décroissante. Une fois initiées, ces oscillations calciques durent généralement entre 20 et 60 minutes (Esseling et al., 2003).

2.3.2 Déformation des poils absorbants racinaires

La déformation des poils absorbants racinaires est la réponse morphologique aux NFs la plus précoce (environ 1 heure après ajout de NFs), et concerne particulièrement les poils absorbants de la zone de susceptibilité (Figure 13). Chez *Vicia sativa*, cette déformation se traduit par un gonflement isodiamétrique au niveau de l'apex du poil absorbant (Has : Hair swelling) (Heidstra et al., 1994) (Figure 13A-E). Chez *Medicago truncatula*, l'application d'un spot de NFs à 1 nM provoque une réorientation de l'axe de croissance du poil absorbant en direction du site d'application (Esseling et al., 2003) (Figure 13F-M). De plus, une application de NFs répétée dans le temps et de manière très localisée permet d'obtenir des courbures de 180 degrés qui ressemblent étroitement aux structures de crosses de berger (Esseling et al., 2003) (Figure 13K). Esseling et al. (2003) ont également observé des branchements (Hab : Hair branching) en réponse à une application de NFs entre 30 et 60 μm sous l'extrémité du poil absorbant. Le groupement sulfate sur le sucre réducteur des NFs s'est avéré être une décoration importante pour induire la déformation des poils absorbants. En

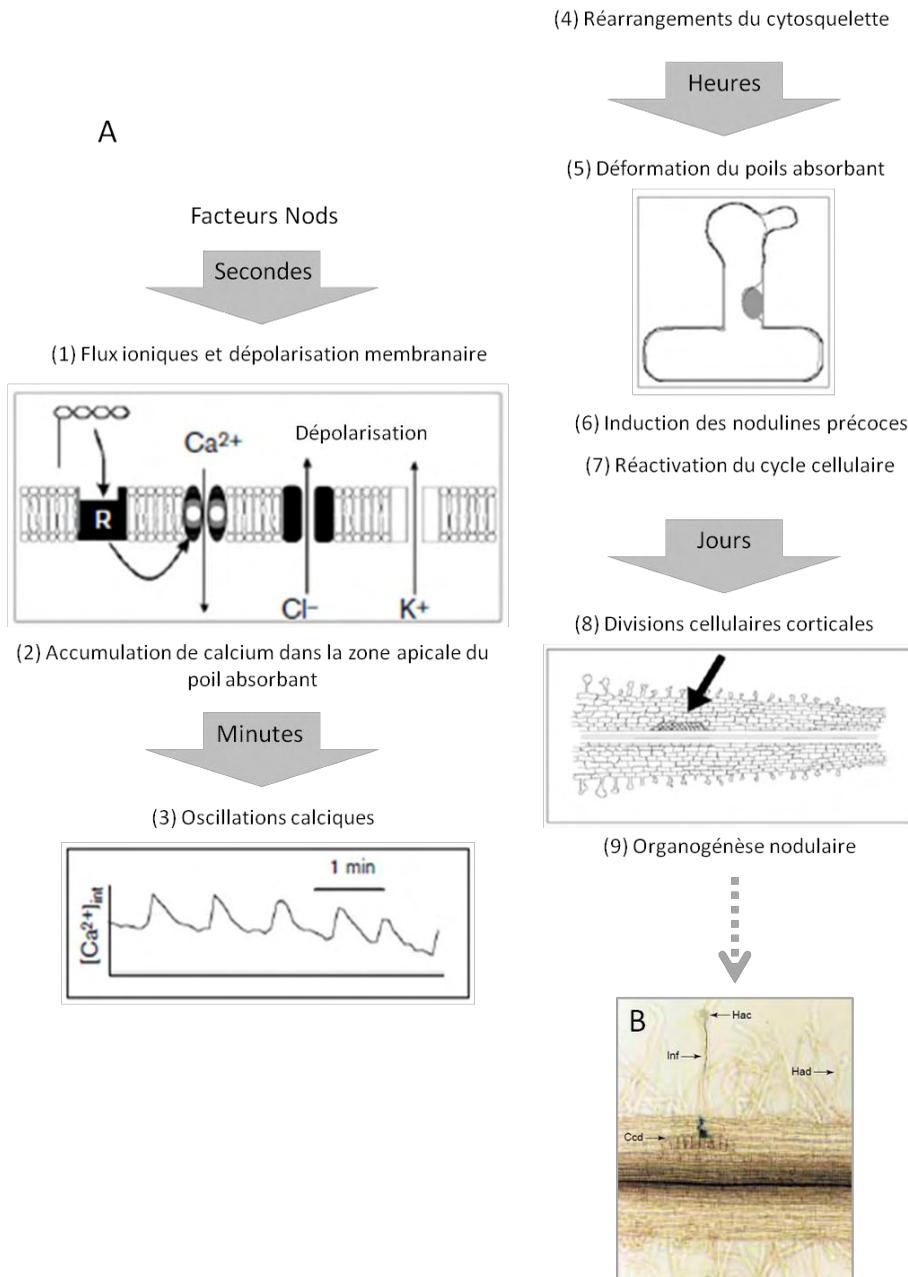


Figure 12. Réponses racinaires aux facteurs Nods chez les légumineuses et phases précoces de l'interaction symbiotique.

(A) Ordre chronologique des réponses physiologiques et cytologiques racinaires à une application de facteurs Nods. (B) L'inoculation rhizobienne provoque une déformation des poils absorbants racinaires (Had) et la division des cellules corticales (Ccd), menant à la formation d'un primordium nodulaire. Les rhizobia expriment constitutivement le gène *LacZ*. Inf, cordon d'infection.

D'après Downie and Walker, 1999 ; Truchet et al., 1991.

effet, les composés non-sulfatés sont 1000 fois moins actifs que les composés sulfatés pour l'élicitation de cette réponse chez *Medicago sativa* (Roche et al., 1991) (Figure 13L-M).

Les cytosquelettes d'actine et de microtubules jouent un rôle essentiel dans la croissance des poils absorbants, et sont également une cible de la signalisation en réponse aux NFs (Esseling and Emons, 2004; Sieberer et al., 2005). En effet, dès que la croissance du poil absorbant est ré-initiée à partir d'un gonflement, environ 1 heure après un traitement aux NFs, un fin réseau d'actine est bâti. Une étude approfondie des réarrangements du cytosquelette d'actine a été effectuée sur des poils absorbants de *Vicia sativa* (de Ruijter et al., 1999). Dans cette étude, les auteurs ont pu montrer qu'une application de NFs sur les poils absorbants de *V. sativa* induit une augmentation du nombre de réseaux fins de F-actine dans la région subapicale des poils absorbants, après 3 minutes de traitement (Figure 13N-P). En conditions non-symbiotiques, la configuration particulière de l'actine dans les poils en croissance permettrait de guider et de libérer les vésicules provenant de l'appareil de Golgi grâce à un fin réseau en élongation vers l'apex du poil (Miller et al., 1999). Il semblerait ainsi que la redirection de croissance du poil en réponse aux NFs soit une conséquence de la fragmentation du réseau d'actine préexistant, puis de son réarrangement à un nouveau site sélectionné par le réseau de microtubules, lui-même réarrangé en réponse aux NFs. Le réseau d'actine reformé permettrait la nouvelle direction de croissance du poil en organisant la libération des vésicules provenant de l'appareil de Golgi.

2.3.3 Réponses cytologiques

Chez certaines espèces telles que *Medicago sativa*, *Lotus japonicus* ou encore le pois, les NFs peuvent induire la formation de primordia nodulaires, voire de nodules vides (Figure 12). Chez *Medicago sativa*, un mélange de NFs de *S. meliloti* élicite des divisions cellulaires qui aboutissent à la formation de structures dont l'organisation tissulaire est comparable à celle de véritables nodules (Truchet et al., 1991). De plus cette fonction requiert la présence du groupement sulfaté à l'extrémité réductrice, comme l'ont montré des expériences d'inoculations avec des NFs modifiés chimiquement. Un mélange de NFs produits par *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 induit des structures nodulaires complètes sur des racines de *Glycine soja* (Stokkermans and Peters, 1994). Dans ce cas, l'utilisation de NFs et de dérivés synthétiques de NFs a montré que le groupement méthylfucosyle à l'extrémité réductrice est requis pour cette activité biologique (Stokkermans et al., 1995).

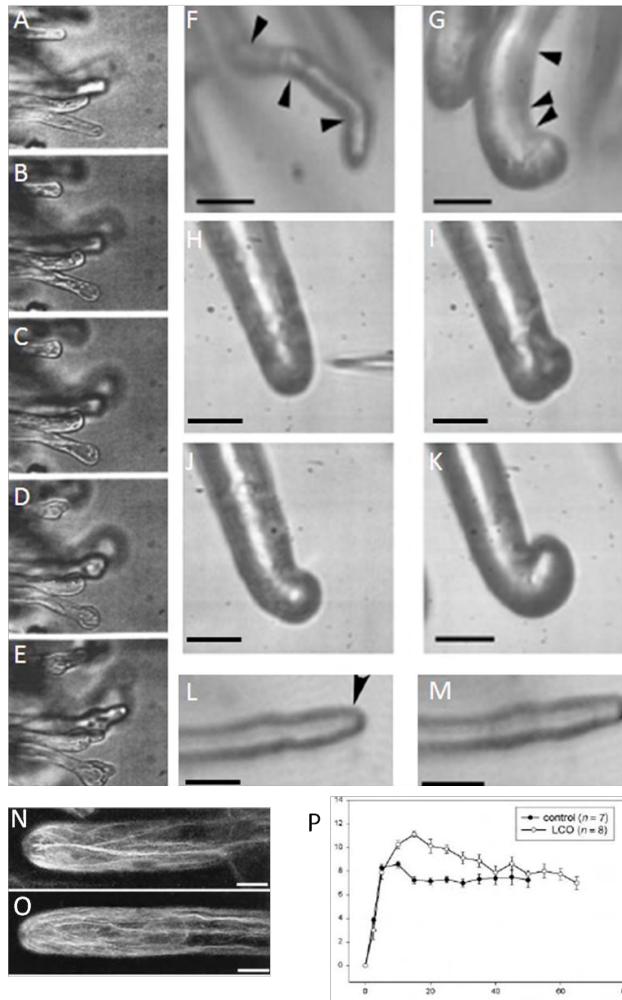


Figure 13. Déformations des poils absorbants et réarrangements du cytosquelette en réponse aux facteurs Nods.

(A-E) Déformation des poils absorbants de *Vicia sativa* en réponse à des NFs purifiés de son symbionte *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* 0 h (A), 1 h (B), 1 h 30 (C), 2 h (D), et 3 h (E) après traitement. Après environ 1 h, l'apex des poils absorbants commence à gonfler (Has) (B) et ce gonflement est encore plus prononcé après 1 h 30 (C). Après 2 h, la croissance polaire de l'apex est ré-initiée à partir d'un gonflement (D), et après 3 h, les poils absorbants montrent une réorientation de la croissance apicale (E).

(F-M) Réponses morphologiques des poils absorbants à des spot-inoculations répétées de NFs. (F) Poil absorbant de type II après trois applications successives de NFs de chaque côté du poil chez *Medicago truncatula*. Chaque application a été suivie d'une réorientation de croissance. (G) Poil absorbant de type II après trois applications successives de NFs du même côté du poil. Les réorientations de croissance ont provoqué une courbure partielle du poil. Les flèches désignent les zones de spot-inoculations. (H-K) Cinétique de courbure d'un poil absorbant après une seule application de NFs (H, pointe de micropipette). Après 25 minutes, une réorientation de la croissance du poil est observée (J), et une courbure en crosse de berger est partiellement formée après 50 minutes (K). (L, M) Réponse morphologique du poil absorbant au moment (L) et 25 minutes après application de NFs non-sulfatés provenant d'un mutant bactérien *nodH* (M). La réorientation de la croissance du poil n'est pas observée. Barres = 30µm (F, L, M) et 18µm (G-K).

(N-P) Augmentation du réseau de filaments de F-actine en réponse aux NFs chez *Vicia sativa*. (N,O) Densité de filaments d'actine avec (O) ou sans (N) application de NFs. (P) Densité moyenne de faisceaux de filaments d'actine en fonction de la distance au pôle dans un poil en fin de croissance avec ou sans application de NFs. Barres = 10µm.

D'après Heidstra et al., 1994 ; Esseling et al., 2003 ; Esseling and Emons, 2004 ; de Ruijter et al., 1999.

En plus de leurs capacités à induire des primordia nodulaires, dans de nombreux cas, les NFs sont également capables à eux seuls d'induire la formation de cordons de pré-infection. Chez *Vicia sativa* par exemple, des ponts cytoplasmiques ont été observés dans les cellules du cortex externe en réponse aux NFs de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* purifiés (10^{-7} M) (Vanbrussel et al., 1992). De manière équivalente, il a été montré que la souche JRL501 de *Mesorhizobium loti* induit la formation de cordons de pré-infection dans les cellules du cortex externe de *Lotus japonicus* (Niwa et al., 2001). L'utilisation de mutants de *S. meliloti* produisant des NFs altérés a démontré l'importance des décorations portées sur le sucre non réducteur dans l'initiation de l'infection rhizobienne (Ardourel et al., 1994) (Figure 14). En effet, les mutants *nodL* (pas de groupement acétate) et *nodFE* (acide gras modifié) ont une capacité d'infection très réduite chez *Medicago sativa*. Le double mutant *nodFL*, produisant des NFs modifiés sur les deux groupements du sucre non réducteur, est incapable de former des cordons d'infection (Figure 14E-F). Cependant, ce mutant est toujours capable d'éluciter une activation à distance des cellules corticales (Ardourel et al., 1994). Il a ainsi été proposé que les structures de NFs requises pour l'infection bactérienne sont bien plus stringentes que celles requises pour l'induction du primordium nodulaire. Ce travail ainsi que ceux d'autres laboratoires ont permis de découpler l'infection bactérienne de l'activation de réponses plus précoces aux NFs. Il y aurait deux spécificités différentes dans la reconnaissance des NFs : une reconnaissance peu stringente nécessaire aux stades plus précoces de la symbiose, et une forte stringence nécessaire à l'infection bactérienne (Figure 15).

2.3.4 Expression génique

L'addition de facteurs Nods purifiés ou l'inoculation de racines par *Rhizobium* induit l'expression de gènes codant pour des nodulines. Deux types de nodulines ont été caractérisés. Les nodulines précoces (ENOD : early nodulins) sont induites quelques heures après ajout de NFs ou dès les premiers jours de l'infection et de la mise en place du primordium (Figure 16). Les nodulines tardives sont induites lors de la maturation du nodule. Bien que la fonction de la plupart de ces nodulines ne soit pas connue, leur expression est associée à la symbiose. Des analyses transcriptomiques ont mis en évidence de nombreux gènes de nodulines induits par les NFs (Mitra et al., 2004b). Dans cette section, la description de l'expression génique induite par les NFs se focalisera principalement sur *ENOD11* et *ENOD12*, deux gènes plus directement corrélés à mon sujet d'étude.

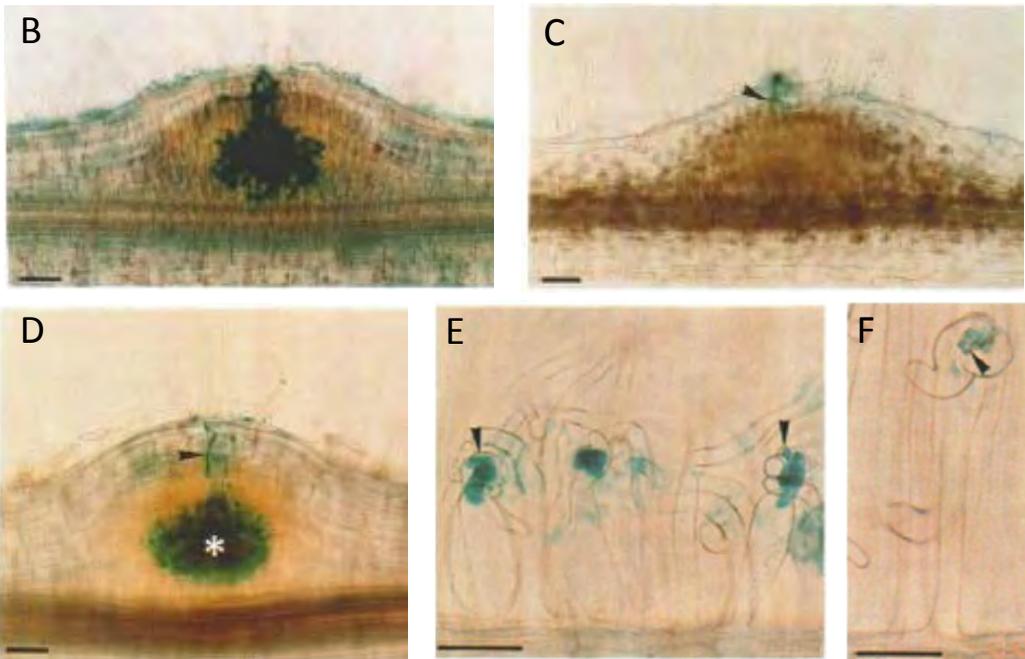
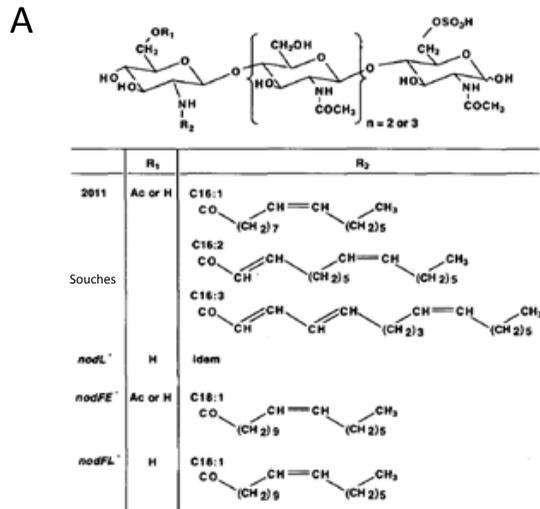


Figure 14. Phénotypes symbiotiques précoces des mutants *nodL*, *nodFE*, et *nodFL* de *Sinorhizobium meliloti*.

(A) Structures des NFs provenant de rhizobia sauvages (souche 2011), ou de mutants *nodL*, *nodFE* et *nodFL*. (B) *S. meliloti nodL* / *M. sativa*. Bien que la fréquence de formation des nodules soit altérée pour le mutant bactérien *nodL*, leur morphologie est comparable à des nodules formés par la souche sauvage de *S. meliloti* (D). (C) *S. meliloti nodFE* / *M. sativa*. Le cordon d'infection ne progresse pas dans les tissus internes, mais le primordium nodulaire se développe normalement. (E, F) *S. meliloti nodFL* / *M. truncatula*. Après formation des crosses de berger, les micro-colonies ne parviennent pas à initier la croissance du cordon d'infection. Barres = 50µm.

D'après Ardourel et al., 1994.

ENOD11 et *ENOD12* sont deux nodulines largement étudiées pour leur implication au cours des étapes précoces de la symbiose. Ces deux gènes codent pour des protéines pariétales riches en prolines. Dans les heures qui suivent l'inoculation de racines de *Medicago* sp. par *Sinorhizobium meliloti*, l'expression des gènes Mt*ENOD11* et Mt*ENOD12* est activée dans les tissus épidermiques en différenciation, localisés à proximité de la pointe racinaire, et correspondants à la zone d'émergence et de développement des poils absorbants (Pichon et al., 1992; Journet et al., 1994; Journet et al., 2001). L'expression de ces deux nodulines en réponse à des NFs purifiés a également été suivie à l'aide de fusions transcriptionnelles promoteur : *GUS* (Journet et al., 1994; Charron et al., 2004; Boisson-Dernier et al., 2005). Dès 2 heures de traitement, l'activité *GUS* (glucuronidase) correspondant à l'expression des deux gènes est détectable. Cette réponse dite de pré-infection est observée dans les tissus épidermiques correspondant à la zone d'émergence et de développement des poils absorbants racinaires, où les infections se produisent entre 36 et 48 heures plus tard. En plus de cette réponse rapide, leur expression se retrouve associée au processus d'infection rhizobienne, à la fois dans les tissus racinaires et nodulaires (Pichon et al., 1992; Journet et al., 2001). Il a été montré que l'expression d'*ENOD11* au cours des réponses de pré-infection et pendant l'infection rhizobienne sont conduites par deux éléments *cis*-régulateurs distincts dans la région promotrice de ce gène (Boisson-Dernier et al., 2005) (Figure 16C-G). En particulier, une région de 257 paires de bases en amont du codon d'initiation de la traduction d'*ENOD11* est suffisante pour son expression au cours de l'infection rhizobienne, mais ne conduit pas la transcription de ce gène en réponse aux NFs. En effet, l'activation de l'expression d'*ENOD11* pendant les étapes de pré-infection (réponse aux NFs) est sous le contrôle d'une région promotrice située entre les positions -411 et -257 (Boisson-Dernier et al., 2005).

La nature des NFs est également importante pour l'activité transcriptionnelle d'*ENOD11* et *ENOD12*. En effet, le groupement sulfate à l'extrémité réductrice, ainsi que la nature de la chaîne lipidique de l'extrémité non-réductrice, sont requis pour une induction correcte de l'expression de ces gènes (Journet et al., 1994; Charron et al., 2004). Les modes d'action d'*ENOD11* et d'*ENOD12* au cours de la symbiose n'ont pas été caractérisés à ce jour. Cependant, il est probable que les protéines correspondantes soient impliquées dans la modification de la paroi des poils absorbants, ou dans la synthèse de nouveaux composants requis dans la matrice du cordon d'infection (Journet et al., 2001). En effet, la progression du cordon d'infection dans le poil requiert une augmentation de la plasticité pariétale. Enfin, l'induction de l'expression des nodulines précoces est dépendante d'une voie de signalisation

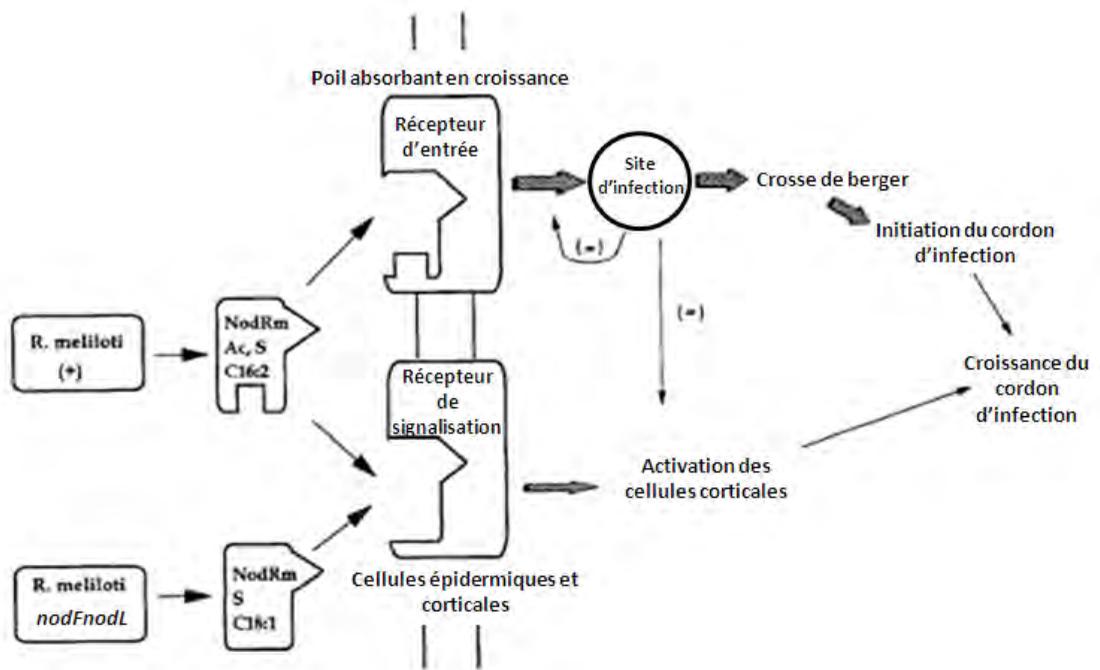


Figure 15. Modèle pour le rôle des différents facteurs Nods de *Sinorhizobium meliloti* et de leurs récepteurs putatifs dans la formation du cordon d'infection.

Au moins deux types de récepteurs seraient impliqués dans la perception des NFs. Les récepteurs d'entrée servant à l'initiation du cordon d'infection seraient stringents pour le groupement acétate et l'acide gras C16 :2. Le récepteur de signalisation, moins stringent pour ces décorations, serait impliqué dans l'activation des divisions corticales et la croissance du cordon d'infection.

D'après Ardourel et al., 1994.

déclenchée en réponse aux NFs. Ainsi, les gènes *ENOD11* et *ENOD12* sont souvent utilisés comme outils, en tant que gènes marqueurs des étapes précoces de la symbiose, dans le but de caractériser de nombreux mutants symbiotiques.

3. Contrôle génétique des étapes précoces de la symbiose

L'induction de l'expression des nodulines précoces dans l'épiderme résulte de la perception des NFs, et d'une cascade de signalisation déclenchée par cette perception (Oldroyd and Downie, 2008). Les oscillations calciques décrites précédemment sont un composant essentiel de la transduction du signal NF. Bien que la perception initiale des NFs se produise dans l'épiderme racinaire, la signalisation engendrée reste importante au cours de l'infection bactérienne dans le cortex racinaire, et de la libération des bactéries dans le nodule (Capoen et al., 2005; Limpens et al., 2005; Den Herder et al., 2007). Cependant, l'affinité dans la perception des NFs diffère selon les stades de la symbiose. En accord avec le modèle d'Ardourel et al. (1994), il a été montré que les déformations des poils absorbants, les oscillations calciques, et l'induction des gènes *ENODs* ont une affinité moins forte pour les NFs que celle requise pour l'infection bactérienne (Ardourel et al., 1994; Walker and Downie, 2000).

Les phénotypes de réponses aux NFs décrits dans la partie 2.3 ont été utilisés dans le but d'étudier des mutants affectés dans les étapes précoces de la symbiose. La caractérisation phénotypique de ces mutants a permis de positionner la plupart des gènes correspondants dans une cascade de signalisation de réponse aux NFs. De manière intéressante, ces gènes sont également requis pour établir la symbiose endomycorhizienne à arbuscules et auraient été recrutés par les légumineuses pour établir l'interaction rhizobienne (Kouchi et al., 2010). Cette voie de signalisation, appelée CSP (commun signaling pathway), sera détaillée par la suite.

3.1 Perception des facteurs Nods

Des criblages de mutants chez *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus*, et *Pisum sativum* ont permis d'identifier des récepteurs probables impliqués dans la perception des NFs chez les légumineuses, à travers l'identification de mutants pour lesquels les réponses inductibles par les NFs sont perdues. Chez *L. japonicus*, deux gènes appelés *NFR1* et *NFR5* (*nod factor receptor*) ont été montrés comme essentiels dans la perception des NFs (Madsen

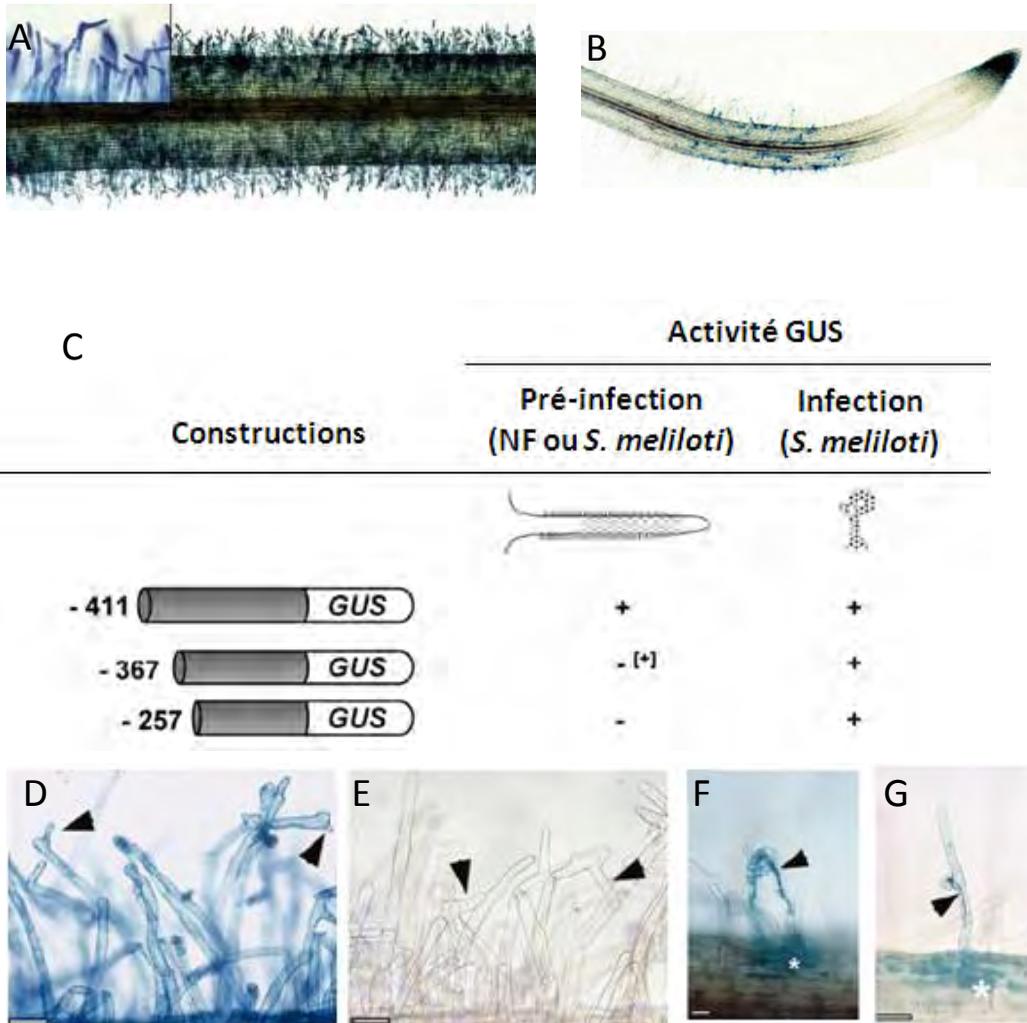


Figure 16. *ENOD11* est un gène marqueur des étapes précoces de la symbiose entre *Sinorhizobium meliloti* et *Medicago truncatula*.

(A-B) Expression de la fusion transcriptionnelle *pMtENOD11-GUS* en réponse aux facteurs Nods. Une forte activité GUS est observée dans l'épiderme racinaire après 6h (A) et 12h (B) de traitement aux NFs. L'activité GUS est localisée dans la zone d'émergence et de développement des poils absorbants (B). (C-G) Des régions distinctes sur le promoteur d'*ENOD11* contrôlent son expression au cours des étapes de pré-infection et d'infection. (C) Expression des différentes constructions *pMtENOD11-GUS* au cours des étapes de pré-infection (en réponse aux NFs ou à *S. meliloti*) ou d'infection. + = activité GUS détectée ; - = pas d'activité GUS détectée. Les phénotypes de pré-infection après 16 h de traitement aux NFs (D, E) et d'infection à 3 jours après inoculation (F, G) sont représentés pour des plantes exprimant la construction -411 (A, C) et -257 (B, D). Une région promotrice localisée entre les positions -411 et -257 contrôlerait l'expression épidermique d'*ENOD11* en réponse aux NFs, alors qu'une autre région localisée en aval de la position -257 contrôlerait son expression au cours de l'infection par *S. meliloti*.
D'après Charron et al., 2004 ; Boisson-Dernier et al., 2005.

et al., 2003; Radutoiu et al., 2003; Broghammer et al., 2012). Des mutants pour les gènes *NFR1* ou *NFR5* perdent toutes les réponses aux NFs purifiés, telles que la déformation des poils absorbants, la dépolarisation membranaire ou encore l'induction de l'expression des nodulines précoces (Radutoiu et al., 2003). Seul le mutant *nfp* de *Medicago*, muté sur le gène orthologue de *LjNFR5*, voit toutes ces réponses perdues (Ben Amor et al., 2003; Arrighi et al., 2006) (Figure 17). Le génome de *Medicago* présente plusieurs homologues de *NFR1*. Des études de mutants et la caractérisation de lignées ARN interférents (RNAi) ont montré que deux d'entre eux, *LYK3* et *LYK4*, sont affectés dans l'infection par *S. meliloti*, mais pas dans l'induction des réponses précoces aux NFs (Catoira et al., 2001; Limpens et al., 2003; Smit et al., 2007) (Figure 18). L'un des mutants *hcl* (hair curling : mutation sur le gène *LYK3*) analysés, *hcl-4*, présente un niveau de transcrits *LYK3* réduit. Cependant, alors que les mutants « knock-out » *hcl-1*, *hcl-2*, et *hcl-3* sont bloqués dans l'initiation de l'infection rhizobienne, le niveau résiduel de transcrits *LYK3* chez *hcl-4* permet encore la formation de micro-colonies, même si la progression des cordons d'infection est très altérée. Chez ce mutant le nombre de nodules formés est très réduit en réponse à des mutants bactériens *nodL* et *nodFE* (Smit et al., 2007), contrairement à une inoculation par une souche sauvage de *S. meliloti*. Ce travail laisse penser que *LYK3* est impliqué dans la reconnaissance des décorations du sucre non réducteur sur les NFs de *S. meliloti*. Il a en effet permis de consolider le modèle proposé par Ardourel et al., 1994 (Figure 15): au sein de ce modèle, NFP serait le récepteur de signalisation, impliqué dans l'induction des réponses précoces aux NFs, et dont l'affinité pour les NFs serait relativement faible. *LYK3*, le récepteur d'entrée, aurait une très forte affinité pour les NFs et serait requis pour l'infection par *S. meliloti*.

Les gènes décrits précédemment codent pour des récepteurs kinases, également appelés RLK (receptor like kinase), composés d'une répétition de trois domaines LysM (Lysin Motif) dans leur région extracellulaire, d'un domaine transmembranaire, et d'un domaine sérine/thréonine kinase cytoplasmique (Ben Amor et al., 2003; Limpens et al., 2003; Madsen et al., 2003; Radutoiu et al., 2003; Arrighi et al., 2006) (Figures 17 et 18). Les domaines LysM seraient responsables de la liaison à des oligomères de N-acétylglucosamines que l'on trouve entre autres dans le peptidoglycane bactérien, la chitine, et le squelette des NFs (Bateman and Bycroft, 2000; Limpens et al., 2003; Radutoiu et al., 2003; Steen et al., 2005; Arrighi et al., 2006). Alors qu'*Arabidopsis* et le riz ne possèdent que 5 et 6 LysM-RLKs, respectivement, l'analyse du génome de *Medicago truncatula* a mis en évidence l'existence d'au moins 17 gènes (Arrighi et al., 2006). Cela pourrait suggérer que l'expansion

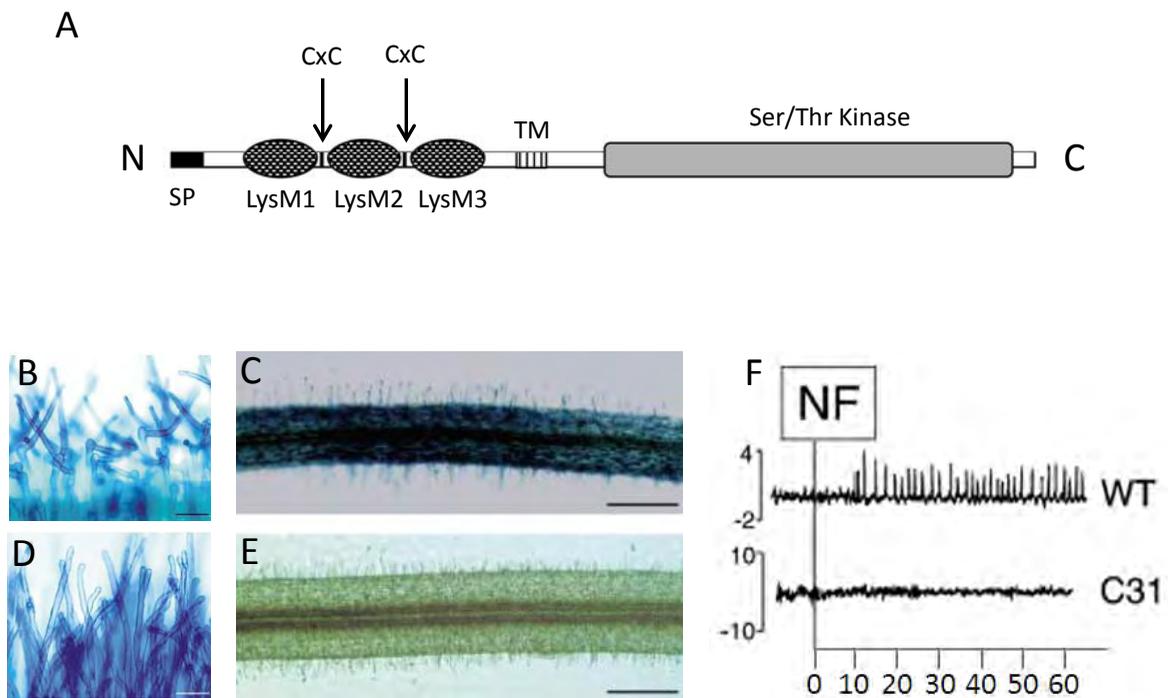


Figure 17. Le mutant *nfp* est affecté dans les premières réponses de l'hôte aux facteurs Nods.

(A) Structure schématique du récepteur kinase NFP de *Medicago truncatula* (595 acides aminés). NFP est composé d'un peptide signal (SP) suivi de trois domaines LysM entrecoupés par deux motifs riches en cystéines (CxC), suivis d'un domaine transmembranaire (TM) et d'un domaine sérine/thréonine kinase dans lequel la boucle d'activation est absente. (B, D) Réponses des poils absorbants de *Medicago truncatula* après un traitement aux NFs (10^{-8} M) et traités au bleu de méthylène. Les poils absorbants de plantes sauvages montrent les phénotypes Hab (B) et les poils absorbants du mutant C31 (*nfp*) ne montrent pas de déformation des poils absorbants (D). (C, E) Expression d'une fusion transcriptionnelle *pENOD11::GUS* en réponse à 6 heures de traitement aux NFs (10^{-8} M), dans des racines de *Medicago truncatula* sauvages (C), ou de mutants C31 (E). (F) Oscillations calciques chez des plantes de *Medicago truncatula* sauvages (WT) ou mutants C31 en réponse aux NFs. Abscisse : temps après ajout de NFs (en minutes). Barres = $65\mu\text{m}$ (B, D) et $180\mu\text{m}$ (C,E).

D'après Ben Amor et al., 2003 ; Arrighi et al., 2006.

de cette famille multigénique chez les légumineuses est en lien avec la capacité à noduler. Parmi ces gènes, sept ont un profil d'expression racinaire (*NFP* et *LYK3* inclus), et seraient ainsi de bons candidats pour une implication dans la perception des NFs au cours des étapes précoces de la symbiose (Arrighi et al., 2006).

Chez *Arabidopsis* ou le riz, les protéines contenant des domaines LysM ont été montrées comme pouvant directement lier la chitine produite par des champignons pathogènes (Kaku et al., 2006), et sont indispensables à l'activation des réponses élicitées par la chitine (Miya et al., 2007). Ces données ont renforcé l'idée que les LysM-RLK lient directement les NFs via leurs domaines LysM. Ce n'est que très récemment qu'une liaison directe entre les LysM-RLKs NFR1/5 et les NFs de *M. loti* a été identifiée, apportant la preuve définitive du rôle de récepteur de ces protéines (Broghammer et al., 2012).

Le domaine kinase de NFP/NFR5 est dépourvu d'une boucle d'activation, normalement présente sur les protéines kinases actives (Madsen et al., 2003; Arrighi et al., 2006) (Figure 17). Il a de plus été démontré que ces protéines n'ont pas d'activité kinase *in vitro*. Chez *Lotus japonicus*, tout comme NFR5, NFR1 est requis pour la majorité des réponses induites par les NFs (Radutoiu et al., 2003). NFR1 contient trois domaines LysM dans sa région extracellulaire, et à l'inverse de NFR5, contient un domaine kinase intracellulaire actif dont la boucle d'activation est présente. Le fait que NFR1 et NFR5 soient tous deux requis pour l'élicitation des premières réponses aux NFs laisse penser qu'ils pourraient former un hétérodimère au sein duquel NFR1 conférerait l'activité kinase indispensable à l'activation de la voie de signalisation (Madsen et al., 2003; Radutoiu et al., 2003; Madsen et al., 2011). De plus, l'introduction de NFR1 et NFR5 dans les racines de *Medicago truncatula* permet à *M. loti* de former des nodules chez *Medicago* (Radutoiu et al., 2007). Cette formation de nodules dépend de la production de NFs par *M. loti*. L'interaction *in planta* entre NFR1 et NFR5 a été montrée récemment par une approche de BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) (Madsen et al., 2011). Dans cette étude, les auteurs ont également mis en évidence plusieurs sites d'autophosphorylation sur NFR1 et un seul résidu sur NFR5 phosphorylé par NFR1. Par analogie chez *Medicago truncatula*, l'existence d'un couple de LysM-RLKs impliqué dans la perception et les réponses précoces aux NFs chez *Lotus* pourrait indiquer que MtNFP fonctionne en complexe avec au moins un autre LysM-RLK. Cependant, aucun autre mutant affecté dans des réponses aussi précoces que celles affectées chez le mutant *nfp* n'a pu être mis en évidence à ce jour. Une des

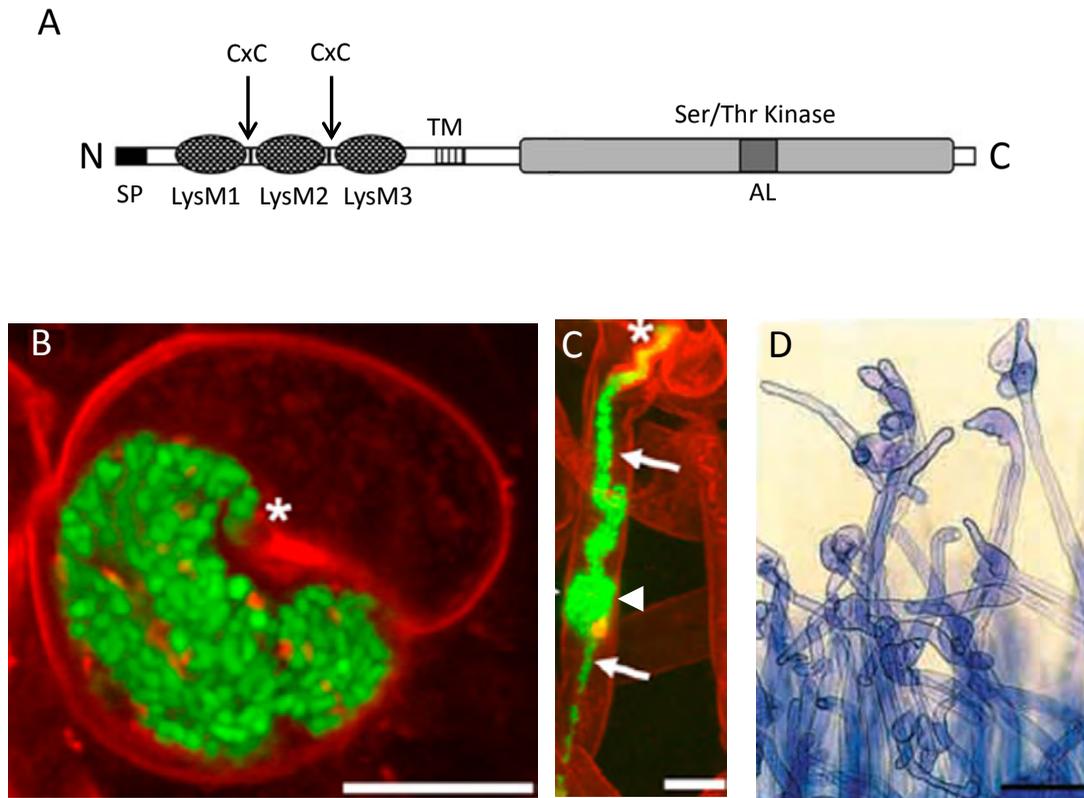


Figure 18. Le mutant *lyk3* est spécifiquement affecté dans l'infection rhizobienne.

(A) Structure schématique du récepteur kinase LYK3 de *Medicago truncatula* (620 acides aminés). LYK3 est composé d'un peptide signal (SP) suivi de trois domaines LysM entrecoupés par deux motifs riches en cystéines (CxC), suivis d'un domaine transmembranaire (TM) et d'un domaine sérine/thréonine kinase dans lequel la boucle d'activation (AL) est présente. (B, C) Images confocales de poils absorbants du mutant faible *hcl-4* de *Medicago truncatula* après inoculation par *S. meliloti* exprimant la GFP, montrant une infection de type « sac-like » initiée à partir d'une micro-colonie (B). Dans un poil absorbant dont l'infection est normalement initiée, les structures de type « sac-like » (pointe de flèche) apparaissent dans le cordon d'infection en progression à travers le poil absorbant (C). C'est à partir de ces structures sac-like qu'un nouveau cordon d'infection est initié (flèches). (D) Phénotype de déformation des poils du mutant *lyk3-1* (B56) marqués au bleu de méthylène. Astérisque = micro-colonie. Barres = 10µm (B,C) et 100µm (D).

D'après Smit et al., 2007 ; Arrighi et al., 2006 ; Catoira et al., 2001.

explications serait que l'identification par génétique directe du partenaire de NFP dans la voie de signalisation soit rendue difficile à cause de possibles redondances fonctionnelles entre les LysM-RLKs chez *Medicago*. Il a été proposé par ailleurs que chez *Medicago*, plusieurs hétérodimères contenant NFP et différentes protéines LYKs seraient formés et auraient des propriétés de liaison aux NFs et des substrats différents (Cullimore and Denarie, 2003).

3.2 Transduction du signal NF

3.2.1 Gènes impliqués dans l'activation des oscillations calciques

Les oscillations calciques jouent un rôle indispensable dans la voie de signalisation induite par les NFs; elles agiraient comme un second messenger pour transduire le signal NF. Des criblages de mutants ont pu mettre en évidence plusieurs composants requis pour l'activation de ces oscillations calciques par les NFs. En plus des LysM-RLKs, un LRR-RLK (Leucline-Rich Repeat Receptor-Like Kinase) (Endre et al., 2002; Stracke et al., 2002), au moins deux canaux cationiques (Ane et al., 2004; Edwards et al., 2007; Riely et al., 2007), et deux nucléoporines (Kanamori et al., 2006; Saito et al., 2007) sont nécessaires à l'induction des oscillations calciques. Des approches biochimiques et pharmacologiques ont de plus indiqué que la signalisation des phospholipides est liée à la voie de signalisation des NFs (den Hartog et al., 2001; Engstrom et al., 2002; Charron et al., 2004; Sun et al., 2007).

i. DMI2

En plus des LysM-RLKs, la transduction du signal NF requiert un deuxième type de récepteur kinase. Le gène *DMI2* (doesn't make infection 2) ou *NORK* (nodulation receptor kinase) de *Medicago truncatula* est l'orthologue du gène *SYMRK* de *Lotus japonicus* (Endre et al., 2002; Stracke et al., 2002). *DMI2* code pour un récepteur kinase localisé à la membrane plasmique (Limpens et al., 2005). Il possède un domaine extracellulaire de 595 acides aminés qui contient trois répétitions LRR, un domaine transmembranaire, et un domaine kinase intracellulaire (Endre et al., 2002) (Figure 19A). Les domaines LRR sont connus pour être impliqués dans les interactions protéine-protéine ou protéine-ligand. Il est donc possible que *DMI2* soit activé par un ligand généré suite à la perception des NFs, ou qu'il fasse partie du complexe comprenant les récepteurs des NFs, même si son mode d'action n'a pu être caractérisé à ce jour. *DMI2* est essentiel à l'activation des oscillations calciques et de l'expression des nodulines précoces, mais à l'inverse des LysM-RLKs, il n'est pas requis pour l'activation des flux calciques (Catoira et al., 2000; Shaw and Long, 2003; Miwa et al.,

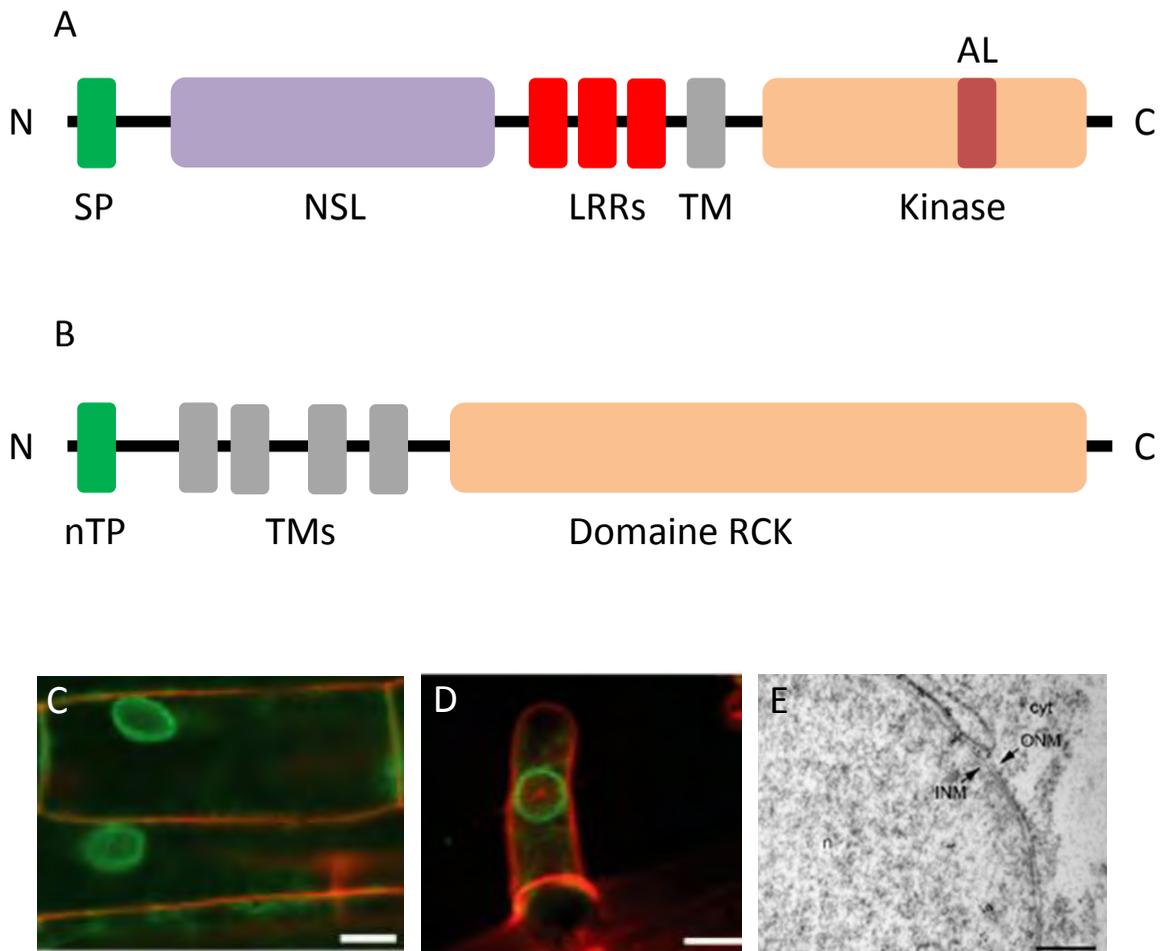


Figure 19. Organisation en domaines des protéines DMI2 et DMI1, et localisation subcellulaire de DMI1.

(A) Structure schématique du récepteur kinase DMI2 de *Medicago truncatula* (925 acides aminés). DMI2 est composé d'un peptide signal (SP), suivi d'un domaine NSL (NORK extracellular-sequense-like) de fonction inconnue, trois répétitions LRR (leucine-rich repeat), un domaine transmembranaire (TM), et un domaine kinase qui contient une boucle d'activation (AL). (B) Structure schématique de la protéine DMI1 de *Medicago truncatula* (883 acides aminés). DMI1 est composé d'un peptide d'adressage au noyau (nTP : nuclear targeting peptide), de quatre domaines transmembranaires (TM), et d'un domaine RCK (regulator of the conductance of K⁺) qui serait impliqué dans la liaison des ions Ca²⁺ et/ou d'autres ligands. (C, D, E) DMI1 est localisé à la périphérie des noyaux des cellules racinaires épidermiques de *Medicago truncatula*. Cellules épidermiques (C) ou poils absorbants (D) exprimant la construction *p35S : DMI1-GFP*. Immunolocalisation par marquage « immunogold » de DMI1-GFP à l'aide d'anticorps anti-GFP. DMI1 est préférentiellement localisé à la membrane interne du noyau. Barres = 10µm (C, D) et 500nm (E). D'après Endre et al., 2002 ; Peiter et al., 2007 ; Riely et al., 2007 ; Capoen et al., 2011.

2006a). Ces observations indiquent une bifurcation dans la voie de signalisation en réponse aux NFs, immédiatement en aval des LysM-RLKs ; un branchement mènerait aux oscillations calciques, et l'autre aboutirait aux flux calciques. Des études de fusion transcriptionnelle *promoteur : GUS* ont montré que *DMI2* est exprimé dans l'épiderme et le cortex racinaire avant l'infection, et que son expression est fortement induite dans le primordium nodulaire avant contact avec le cordon d'infection. De plus ce gène est exprimé dans la zone d'infection des nodules matures (Bersoult et al., 2005).

Les phospholipides joueraient un rôle important dans la voie de signalisation de réponse aux NFs, en aval de *DMI2*. La phospholipase C, activée par les protéines G hétérotrimériques, hydrolyse les phosphatidylinositols 4,5-bisphosphates en IP3 (1,4,5-trisphosphate) et DAG (diacylglycérole). L'IP3 libéré peut par la suite activer l'efflux de Ca^{2+} provenant d'organites cellulaires tels que le réticulum endoplasmique. Des études pharmacologiques ont pu montrer qu'une application de mastoparan, un activateur des protéines G, induit les oscillations calciques, l'expression des nodulines précoces, et la déformation des poils absorbants racinaires indépendamment de *DMI2* (Pingret et al., 1998; den Hartog et al., 2001; Charron et al., 2004; Sun et al., 2007). Ce processus est bloqué par des inhibiteurs de l'activité des phospholipases C et D. Ces résultats suggèrent que les phospholipides pourraient jouer le rôle de second messager dans la signalisation NF, entre *DMI2* et les oscillations calciques. Cependant, le lien moléculaire entre *DMI2* et la signalisation des phospholipides n'est pas encore connu.

Des expériences de criblages en double hybride chez la levure ont récemment permis de mettre en évidence plusieurs partenaires de *DMI2/SYMRK* potentiellement impliqués dans la voie de signalisation NF (Kevei et al., 2007; Zhu et al., 2008; Chen et al., 2012; Den Herder et al., 2012; Yuan et al., 2012). Chez *Medicago*, *HMGR1*, une 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase, interagît avec le domaine kinase de *DMI2* (Kevei et al., 2007). *HMGR1* fait partie d'une famille multigénique dont les protéines sont des enzymes clés de la voie de biosynthèse du mévalonate, précurseur des cytokinines et des stéroïdes. L'inhibition de l'activité de *HMGR1* par ajout de lovastatine, ou la réduction de son expression par RNAi, affectent sévèrement la nodulation, ce qui indique que *HMGR1* est une enzyme clé dans la nodulation (Kevei et al., 2007). De plus la réduction de l'expression de *HMGR1* par RNAi abolit l'induction de l'expression des nodulines précoces telles qu'*ENOD11* ainsi que les oscillations calciques en réponse aux NFs (J.M. Ané, European Nitrogen Fixation Congress

2012, Munich). Le mévalonate, quant à lui, induit les oscillations calciques sans temps de latence et active l'expression d'*ENOD11* chez des plantes sauvages et des mutants *dmi2*. Il pourrait ainsi constituer le signal qui relie la membrane plasmique aux oscillations calciques du noyau du poil absorbant racinaire. Les auteurs de cette étude ont proposé un mode d'action selon lequel DMI2 phosphoryle HMGR1 et régule négativement son activité en conditions non-symbiotiques. En conditions symbiotiques, les NFs réguleraient négativement l'activité de DMI2, rendant HMGR1 actif. Le mévalonate synthétisé par la suite activerait les oscillations calciques nucléaires et périnucléaires.

Chez *Lotus japonicus*, plusieurs interacteurs de SYMRK ont été identifiés par criblage en double hybride dans la levure, et ont permis d'élargir le nombre de composants potentiels impliqués dans la voie de signalisation NF. SYMRK interagît avec au moins deux E3 ligases, SIE3 (SYMRK-INTERACTING E3 UBIQUITIN LIGASE) et SINA4 (SEVEN IN ABSENTIA4) (Den Herder et al., 2012; Yuan et al., 2012). SIE3 est capable *in vitro* d'ubiquitiner SYMRK et jouerait un rôle important dans le maintien de la conformation correcte et de la localisation subcellulaire de SYMRK (Yuan et al., 2012). En accord avec cette hypothèse, les auteurs ont montré que la dérégulation de l'expression de *SIE3* par RNAi aboutit à une réduction de l'expression de nodulines précoces telles qu'*ENOD40* ou *NIN*, et par conséquent à une diminution du nombre de cordons d'infection et de nodules. Alors que SIE3 est un régulateur positif de la nodulation, l'ubiquitination de SYMRK par SINA4 affecterait sa stabilité, ce qui confère à SINA4 un rôle de régulateur négatif de la nodulation (Den Herder et al., 2012). Dans ce sens, les auteurs ont pu montrer qu'une expression ectopique de *SINA4* réduit le nombre de cordons d'infection et affecte sévèrement la nodulation. L'identification de SIE3 et SINA4 a permis de mettre en évidence le rôle important de la stabilisation et du « turn-over » des récepteurs membranaires au cours de la voie de signalisation en réponse aux NFs.

SIP1 (SYMRK INTERACTING PROTEIN1) est une protéine nucléaire qui interagit avec le domaine kinase de SYMRK (Zhu et al., 2008). Le motif « helix-turn-helix » (ARID) dans la région N-terminale de cette protéine joue un rôle dans la liaison à l'ADN, et des expériences de transactivation ont montré que SIP1 ciblerait le promoteur de *NIN*. Cependant, aucune évidence génétique explicitant l'importance de SIP1 dans la nodulation, ni de modèle expliquant comment cette protéine nucléaire peut interagir avec une protéine membranaire comme SYMRK ne sont apportés dans cette étude.

ii. DMI1

DMI1 (doesn't make infection 1), tout comme DMI2, est requis pour l'induction des oscillations calciques en réponse aux NFs. DMI1 code pour une protéine membranaire qui contient quatre domaines transmembranaires putatifs (Figure 19B), et partage une forte similarité avec MthK, un canal potassique calcium-dépendant (Ane et al., 2004; Peiter et al., 2007). Des études pharmacologiques ont montré que les oscillations calciques et l'induction d'*ENOD11* induites par le mastoparan ne requièrent pas DMI1 (Charron et al., 2004; Sun et al., 2007). Il est donc peu probable que DMI1 soit un transporteur de calcium (Ca^{2+}). La région C-terminale cytoplasmique de DMI1 contient un domaine RCK (regulator of the conductance of K⁺) qui serait impliqué dans le contrôle de l'activité de ce canal (Figure 19B). Des expériences de fusions traductionnelles à la GFP (green fluorescent protein) ont permis de montrer que DMI1 est localisé dans l'enveloppe nucléaire (Riely et al., 2007) (Figure 19C-D). Ces résultats ont par la suite été confirmés et précisés par des expériences d'immunolocalisation montrant que DMI1 est préférentiellement localisé dans la membrane interne du noyau (Capoen et al., 2011) (Figure 19E). Il apparaît donc que DMI2, localisé dans la membrane plasmique, activerait DMI1 dans l'enveloppe nucléaire, par l'intermédiaire d'une cascade de signalisation encore non identifiée. Cette cascade de signalisation impliquerait probablement la voie des phospholipides (den Hartog et al., 2001; Charron et al., 2004; Sun et al., 2007) et/ou HMGR1 et les mévalonates (J-M Ané, European Nitrogen Fixation Congress 2012, Munich). Chez *Lotus japonicus*, deux gènes *DMI1-like*, tous deux indispensables à l'activation des oscillations calciques induites par les NFs, ont été identifiés et appelés *CASTOR* et *POLLUX* (Imaizumi-Anraku et al., 2005; Miwa et al., 2006a). Des fusions traductionnelles de *CASTOR* et *POLLUX* à la GFP sont localisées autour du noyau dans des cellules de feuilles de *Nicotiana benthamiana*, et des expériences d'immunolocalisation ont permis de visualiser *CASTOR* dans l'enveloppe nucléaire (Charpentier et al., 2008). Les auteurs ont également montré par des expériences de compétition, des déterminations de ratios de perméabilité, ou encore des études de complémentation de mutants de levure, que *CASTOR* et *POLLUX* ont une préférence pour le transport des ions K^+ . L'existence de deux canaux ioniques chez *Lotus japonicus* à la place d'un seul chez *Medicago truncatula* a fait l'objet d'une étude récente (Venkateshwaran et al., 2012). Dans cette étude, les auteurs ont pu compléter le phénotype *nod-* de doubles mutants *castor/pollux* par l'expression d'une protéine *POLLUX* dans laquelle une sérine est remplacée par une alanine au sein du domaine de sélectivité ionique de *POLLUX*. Cette

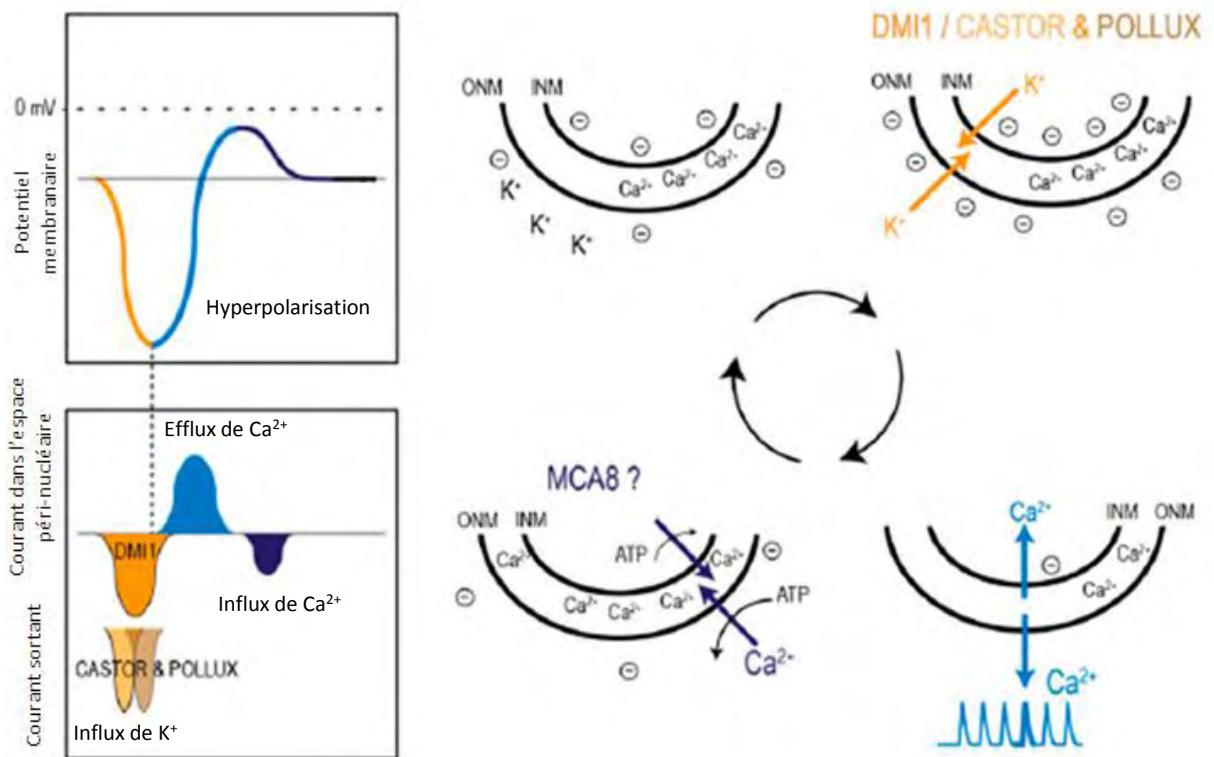


Figure 20. Modèle proposé pour les rôles de DMI1 et du couple CASTOR/POLLUX dans la génération des oscillations calciques au cours de la signalisation NF.

Un second messenger inconnu à ce jour active les canaux cationiques tels que DMI1 ou le couple CASTOR/POLLUX. DMI1 ou CASTOR/POLLUX transporteraient les ions K⁺ du cytoplasme ou du nucléoplasme vers l'espace périnucléaire. Cet influx de K⁺ dans l'espace périnucléaire engendre une hyperpolarisation des membranes nucléaires externe (ONM) et interne (INM). Lorsqu'un certain degré d'hyperpolarisation est atteint, les canaux calciques sont activés. L'efflux d'ions Ca²⁺ provenant de l'espace périnucléaire et en direction du cytoplasme et du nucléoplasme donne lieu aux oscillations calciques. L'hyperpolarisation des membranes périnucléaires est alors réduite, et les canaux calciques activés par l'hyperpolarisation se referment. Finalement, les ions Ca²⁺ sont activement réintégrés dans l'espace périnucléaire par l'action de MCA8, un canal Ca²⁺ ATPase, et le potentiel membranaire retourne à son état initial.

D'après Venkateshwaran et al., 2012.

alanine est déjà présente chez MtDMI1. Il a donc été proposé que récemment au cours de l'évolution, la substitution d'une sérine en alanine sur MtDMI1, l'orthologue putatif de LjPOLLUX, a rendu ce canal ionique auto-suffisant chez *Medicago truncatula*. Bien que cette substitution confère à DMI1 une conductance ionique moins élevée, la durée de l'état d'ouverture du canal est augmentée, ce qui le rend plus efficace dans l'activation des oscillations calciques (Venkateshwaran et al., 2012).

L'étude de Venkateshwaran et al. (2012) ainsi que d'autres études récentes ont également permis de mieux décrypter les mécanismes impliqués dans l'activation des oscillations calciques en réponse aux NFs. Ces oscillations, localisées dans et autour du noyau du poil absorbant, auraient pour origine à la fois le cytoplasme et l'enveloppe nucléaire. En plus de DMI1, une pompe à calcium ATP-dépendante appelée MCA8 localisée dans l'enveloppe nucléaire est indispensable à l'activation des oscillations calciques par les NFs, comme l'ont montré des expériences de RNAi qui dérégulent l'expression de ce gène (Capoen et al., 2011). MCA8 serait responsable de la recapture active des ions Ca^{2+} vers l'enveloppe nucléaire. Un modèle récapitulant les rôles de CASTOR/POLLUX/DMI1 et MCA8 dans l'activation des oscillations calciques a été proposé (Venkateshwaran et al., 2012) (Figure 20).

iii. Les nucléoporines

Les oscillations calciques sont également bloquées dans les mutants thermosensibles de *Lotus japonicus nup133* et *nup85* (Kanamori et al., 2006; Saito et al., 2007). *NUP133* et *NUP85* codent pour des protéines homologues des nucléoporines NUP133 et NUP85 de levure et de mammifères. Ces protéines sont des composants du complexe de pore nucléaire, qui contient environ 30 protéines, et permet le transport des ARN messagers et de certaines protéines à travers l'enveloppe nucléaire (Hoelz et al., 2011). La localisation d'une fusion traductionnelle YFP-NUP133 dans l'enveloppe nucléaire des poils absorbants confirme le fait que cette protéine fasse partie du complexe de pore nucléaire chez les plantes (Kanamori et al., 2006). Les protéines NUPs sont exprimées constitutivement dans différents organes de la plante et leur expression n'est pas induite par l'inoculation de rhizobia (Kanamori et al., 2006; Saito et al., 2007). Pour l'instant, le mécanisme par lequel les nucléoporines contrôlent les oscillations calciques n'est pas élucidé. Il est possible qu'elles affectent le potentiel membranaire de l'enveloppe nucléaire et qu'elles interfèrent avec l'activité des canaux calciques, tout comme le fait DMI1 également localisé dans l'enveloppe nucléaire. De manière intéressante, la protéine NUP96 d'*Arabidopsis* est requise pour la résistance contre

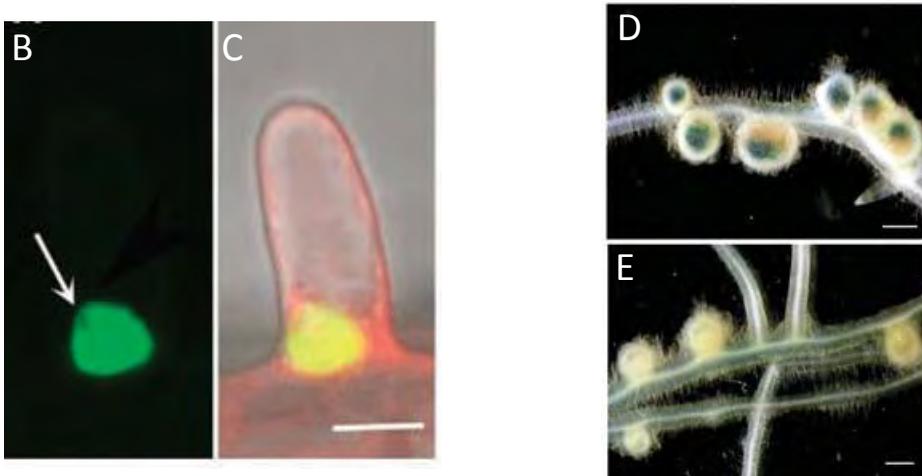
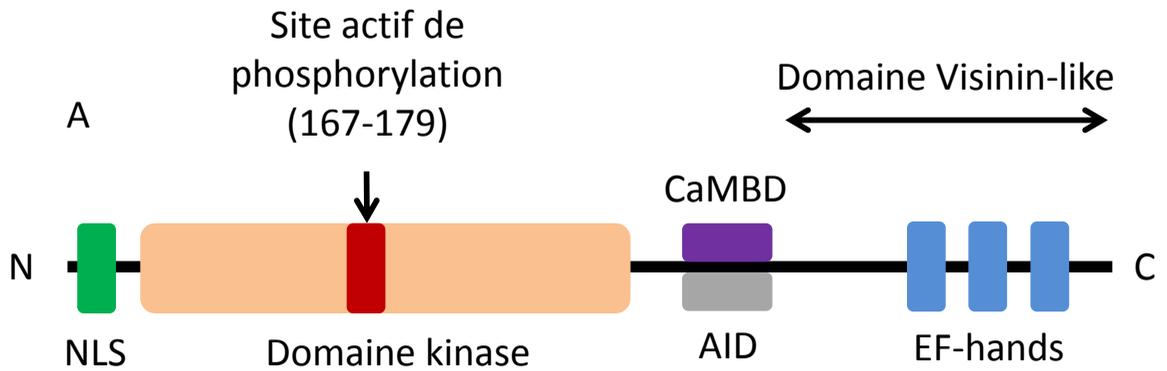


Figure 21. DMI3, le décodeur des oscillations calciques nucléaires.

(A) Structure schématique de la CCaMK DMI3 (523 acides aminés). DMI3 est composé d'un signal de localisation nucléaire (NLS), d'un domaine kinase dans lequel le site actif de phosphorylation est compris entre les acides aminés 167 et 179, d'un domaine de liaison à la calmoduline (CaMBD) superposé au domaine auto-inhibiteur de la kinase (AID), puis de trois EF-hands de liaison aux ions Ca^{2+} . (B, C) Localisation nucléaire d'une fusion traductionnelle *pDMI3 : GFP-DMI3* dans les poils absorbants racinaires d'un mutant perte de fonction *dmi3*. (D, E) Nodules après inoculation de rhizobia exprimant le gène *LacZ*. Un mutant perte de fonction *dmi3* a été complémenté par une construction *pDMI3: DMI3* (D) ou par une construction *pDMI3 : DMI3 1-311* où DMI3 est délété de son domaine d'auto-inhibition. Les nodules spontanés inductibles par cette construction ne sont pas infectés. D'après Swainsbury et al., 2012 ; Smit et al., 2005 ; Gleason et al., 2006.

des pathogènes (Zhang and Li, 2005). Chez *Lotus japonicus*, NUP133 et NUP85 sont également requis pour la symbiose mycorhizienne (Kanamori et al., 2006; Saito et al., 2007). Cela indique un rôle général des nucléoporines dans les interactions plantes-microorganismes, à la fois pathogènes et symbiotiques.

Récemment, un autre composant potentiel du complexe de pore nucléaire, NENA, a été identifié à l'issue d'un criblage de mutants chez *Lotus japonicus* (Groth et al., 2010). Des expériences de fusions traductionnelles NENA-GFP ont permis de confirmer la localisation de NENA dans l'enveloppe nucléaire, et une interaction entre NENA et NUP85 a été observée par la méthode de double hybride dans la levure. Dans le mutant *nen*, l'induction épidermique de nodulines précoces telles que *NIN* et l'activation des oscillations calciques en réponse aux NFs sont fortement altérées (Groth et al., 2010). Ces données suggèrent que NENA joue un rôle similaire à NUP133 et NUP85 dans la voie de signalisation en réponse aux NFs.

3.2. 2 DMI3, le décodeur central des oscillations calciques

Le gène *DMI3* (*doesn't make infection 3*) (=CCaMK) de *Medicago truncatula*, orthologue de *LjCCaMK* chez *Lotus japonicus*, code pour une protéine kinase Ca^{2+} /Calmoduline dépendante requise dans la symbiose rhizobienne (Levy et al., 2004; Mitra et al., 2004a) (Figure 21). Bien que CCaMK soit nécessaire à l'induction de l'expression des nodulines précoces en réponse aux NFs, cette protéine n'est pas nécessaire à l'activation des oscillations calciques (Catoira et al., 2000; Wais et al., 2000). Cela suggère que CCaMK joue un rôle en aval des oscillations calciques dans la voie de signalisation. La région N-terminale de la protéine possède un domaine kinase, suivi d'un domaine de liaison à la calmoduline, et la partie C-terminale Visinin-like est constituée de trois domaines « EF-hands » de liaison aux ions Ca^{2+} (Levy et al., 2004; Mitra et al., 2004a; Swainsbury et al., 2012) (Figure 21A). L'expression de *DMI3* est restreinte aux racines et aux nodules chez *Medicago*, et est indépendante de la présence de *S. meliloti* (Levy et al., 2004). De plus des fusions traductionnelles à la GFP ont montré que cette protéine est localisée dans le noyau des cellules de *Medicago*, indépendamment de la perception des NFs (Kalo et al., 2005; Smit et al., 2005) (Figure 21B-C).

CCaMK fait partie d'une famille de protéines spécifiques des plantes, mais son domaine de liaison à la calmoduline est similaire à la protéine CaMKII de mammifères impliquée dans le décodage des oscillations calciques (Patil et al., 1995). En général, les

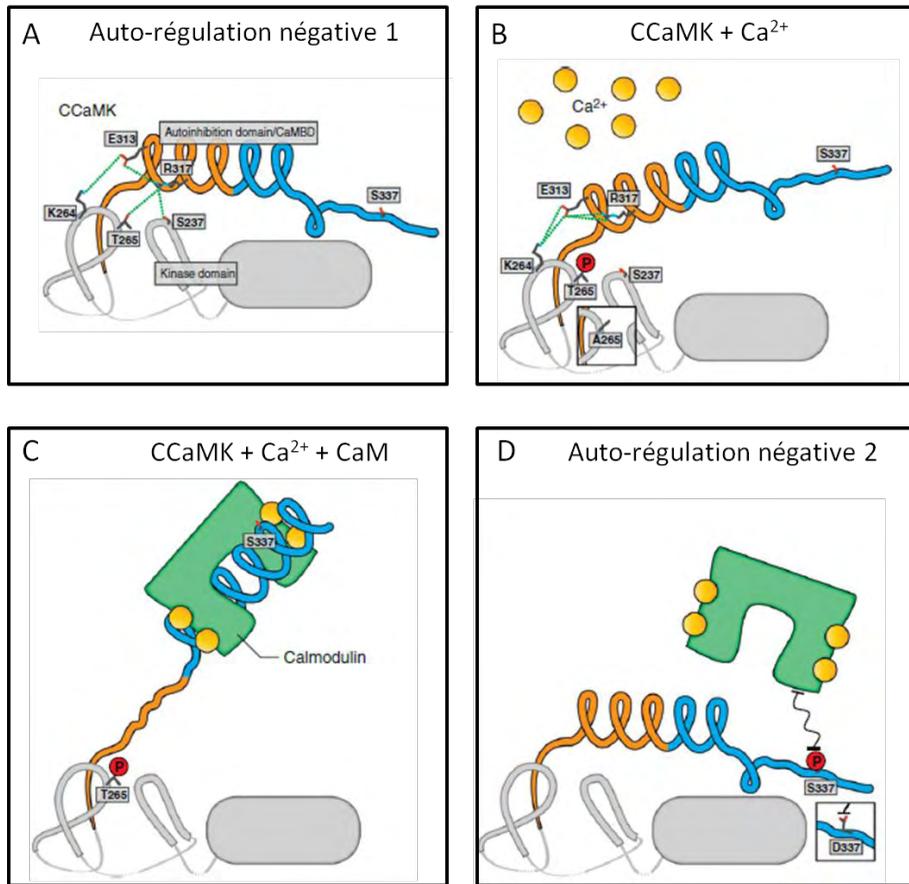


Figure 22. Régulation de CCaMK/DMI3.

(A) Auto-régulation négative 1. Représentation partielle de CCaMK comprenant le domaine d'auto-inhibition (orange) recouvrant le domaine de liaison à la calmoduline (CaMBD, bleu). Le domaine actif de la kinase est coloré en gris. (B) Activation de CCaMK via l'auto-phosphorylation ou la substitution du résidu T265. Les ions Ca^{2+} se lient aux motifs EF-hands (non-montrés), et la CCaMK s'auto-phosphoryle sur le T265. (C) Activation de CCaMK en présence du complexe Ca^{2+} /calmoduline. Le domaine kinase de CCaMK est libéré, ce qui le rend accessible à d'autres substrats. (D) Auto-régulation négative 2. L'auto-phosphorylation de S337 empêche la liaison de CCaMK au complexe Ca^{2+} /CaM, ce qui stabilise l'état d'auto-inhibition. D'après Singh and Parniske, 2012.

protéines kinases Ca^{2+} /Calmoduline dépendantes sont doublement régulées : les ions Ca^{2+} libres se lient aux domaines EF-hands, induisent une autophosphorylation de la protéine, favorisant la liaison du Ca^{2+} complexé avec la calmoduline. Cette liaison à la calmoduline favorise à son tour la phosphorylation d'autres substrats (Singh and Parniske, 2012). CCaMK possède également un domaine d'auto-inhibition (AID) important pour sa fonction, qui régule négativement son activité kinase (Figure 21A). De manière intéressante, une délétion spécifique de ce domaine mène à l'expression des nodulines précoces et à la formation de nodules spontanés en absence de rhizobia ou de NFs, mais le processus d'infection reste bloqué (Gleason et al., 2006) (Figure 21D-E). De manière similaire, une mutation ponctuelle mimant une phosphorylation (T265D), ou changeant l'acidité ou la polarité du résidu à la position 265 (T265A, T265I) sur le site d'auto-phosphorylation, aboutit à la formation de nodules spontanés, et permet cette fois l'infection bactérienne (Tirichine et al., 2006a). Toutes ces données suggèrent que CCaMK serait très probablement la protéine qui decode les oscillations calciques nucléaires. Dans ce sens, l'expression de CCaMK^{T265D} ou *snfl* (CCaMK^{T265I}) dans les mutants de *Lotus japonicus symrk*, *castor*, *pollux* ou *nup85/nup133*, restaure l'infection rhizobienne et la nodulation, bien que les oscillations calciques ne soient pas présentes (Hayashi et al., 2010; Madsen et al., 2010). Ces importantes découvertes démontrent que la première fonction des gènes de la voie de signalisation en amont des oscillations calciques, et des oscillations calciques elles-mêmes, est d'activer la protéine CCaMK. Les nombreuses expériences de structure-fonction sur CCaMK, ainsi que l'utilisation de versions auto-actives de cette protéine, ont permis d'établir un modèle hypothétique expliquant son activité au cours de la nodulation (Singh and Parniske, 2012). Ce modèle, basé sur le mode d'action de CCaMK au cours de la signalisation en réponse aux NFs chez *Lotus japonicus*, est présenté et détaillé sur la figure 22. En absence de Ca^{2+} , CCaMK est auto-inhibé, le domaine AID agissant comme un frein qui empêche l'activité kinase (Figure 22A). Chez *Lotus japonicus*, un réseau de liaisons hydrogènes impliquant les résidus T265, S237, K264, E313 et R317 stabiliserait le positionnement du domaine AID pour maintenir l'inhibition du domaine kinase (Shimoda et al., 2012) (Figure 22A). En présence d'oscillations calciques, les ions Ca^{2+} se lient aux motifs EF-hands et CCaMK s'auto-phosphoryle sur le résidu T265 (Figure 22B). La présence du groupement phosphate ou de certaines substitutions sur ce résidu (T265D, T265A, T265I) permettrait de rompre le réseau de liaisons hydrogènes, ce qui déstabiliserait l'état d'auto-inhibition (Shimoda et al., 2012). En accord avec cette fonction proposée pour ce résidu T265, tous les mutants correspondants

perdent l'auto-inhibition, ce qui aboutit à la formation de nodules spontannés en absence de rhizobia (Tirichine et al., 2006b; Shimoda et al., 2012). L'auto-phosphorylation de CCaMK augmente son affinité pour le complexe Ca^{2+} /calmoduline et induit un changement de conformation (Figure 22C). Ce changement de conformation permet de libérer le domaine kinase de CCaMK et le rend accessible à d'autres substrats. Le site d'auto-phosphorylation S337 a été récemment identifié comme un site dans le domaine de liaison à la calmoduline qui permet l'interaction entre CCaMK et le complexe Ca^{2+} /calmoduline exclusivement lorsque S337 n'est pas phosphorylé (Liao et al., 2012). L'auto-phosphorylation sur le résidu S337 empêche la liaison de CCaMK au complexe Ca^{2+} /calmoduline, ce qui stabilise l'état d'auto-inhibition (Figure 22D). Par conséquent, la version CCaMK^{S337D} mimant la phosphorylation du résidu S337 est affectée dans la phosphorylation Ca^{2+} /calmoduline dépendante d'autres substrats et ne complète pas les mutants *ccamk*. De plus, le mutant *ccamk-14* (S337N) (pas d'auto-phosphorylation possible sur le résidu S337) forme des nodules normaux mais l'infection est aberrante, suggérant un rôle important pour cette auto-régulation négative au cours de l'infection rhizobienne (Liao et al., 2012).

Le rôle primordial de CCaMK dans la signalisation souligne l'importance de cette protéine en tant que « nœud » central de la signalisation en réponse aux NFs, régulant à la fois l'infection et l'organogénèse nodulaire (Singh and Parniske, 2012). Alors que la signalisation en amont de CCaMK peut être conceptualisée par la perception spécifique des NFs et la transduction de ce signal, les mécanismes qui confèrent la spécificité transcriptionnelle en aval de CCaMK sont probablement les résultats de l'action d'une variété de régulateurs transcriptionnels qui contrôlent l'expression génique appropriée.

La recherche d'interacteurs de CCaMK/DMI3 au cours des étapes précoces de la symbiose a mené à l'identification de plusieurs protéines. CYCLOPS/IPD3 a été identifié chez *Medicago truncatula* à l'issue d'un criblage en double hybride chez la levure, et interagit avec DMI3 via son domaine « coiled-coil » situé dans la partie C-terminale de la protéine (Messinese et al., 2007) (Figure 23A). CYCLOPS/IPD3 possède également un signal de localisation nucléaire et son adressage dans le noyau a été observé à la fois dans un système hétérologue et *in vivo* (Messinese et al., 2007; Yano et al., 2008). Il a été montré que CYCLOPS peut être phosphorylé par CCaMK *in vitro* (Yano et al., 2008), et que cette phosphorylation joue un rôle essentiel dans l'établissement de la symbiose rhizobienne (Liao et al., 2012). Chez les mutants *cyclops/ipd3*, l'induction de l'expression des nodulines

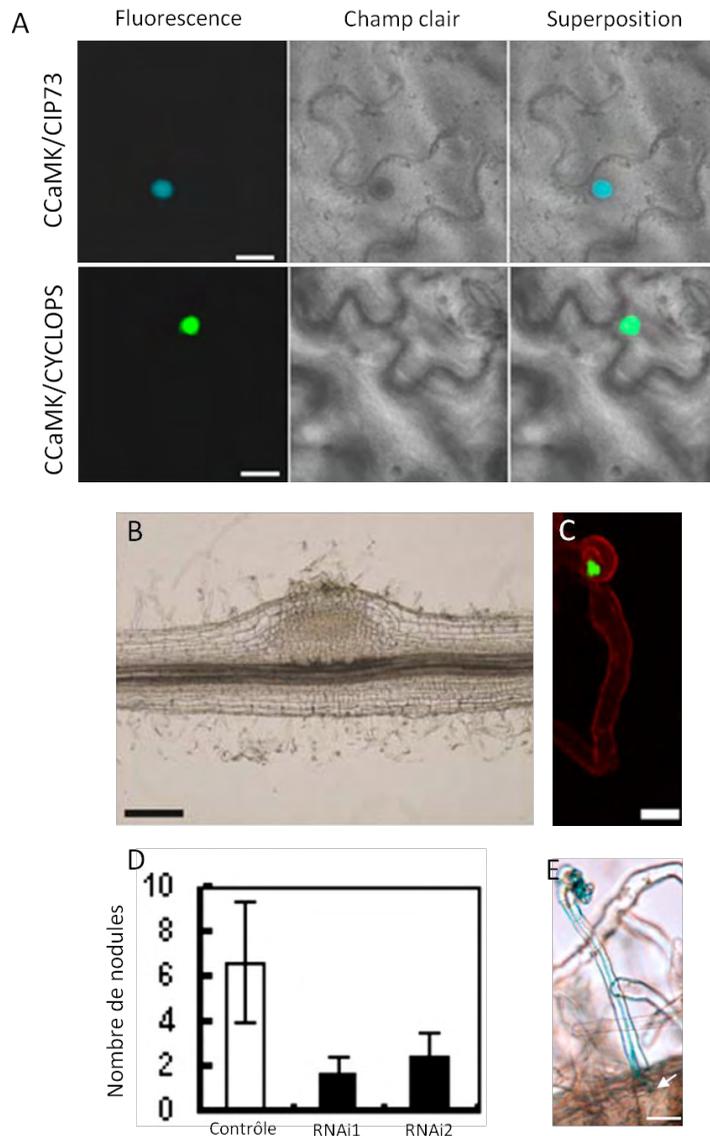


Figure 23. Deux protéines interagissent avec CCaMK et découplent les processus d'infection et de divisions cellulaires corticales.

(A) CIP73 et CYCLOPS interagissent avec CCaMK *in planta*. Expériences de BiFC (bimolecular fluorescence complementation) dans des feuilles de *N. benthamiana* co-transformées avec les constructions SCFP_C - CCaMK et CIP73 - SCFP_N (haut) ou SCFP_C - CCaMK et CYCLOPS - Venus_N (bas). (B, C) Le mutant *cyclops/ipd3* est affecté dans l'infection rhizobienne mais pas dans la formation de primordia nodulaires. (B) Formation de primordia nodulaires chez le mutant de *Medicago truncatula ipd3-1* cinq jours après inoculation par *S. meliloti*. (C) Cordon d'infection avorté dans la courbure du poil absorbant chez le mutant *cyclops-3* de *Lotus japonicus* deux semaines après inoculation par *M. loti* exprimant la GFP. (D, E) La dérégulation de l'expression de CIP73 aboutit à une réduction du nombre de nodules, mais l'infection n'est pas altérée. (D) Nombre total de nodules sur des racines de *Lotus japonicus* transformées par un vecteur contrôle ou deux constructions RNAi-CIP73 différentes, déterminé quatre semaines après inoculation par *M. loti*. (E) Phénotype d'infection de plantes RNAi dont l'expression de CIP73 est dérégulée, sept jours après inoculation par *M. loti* exprimant le gène *LacZ*. La flèche indique la position de l'arrêt de croissance du cordon d'infection (cortex externe). Barres = 20µm (A), 2 mm (B), 20µm (C) et 25µm (E).

D'après Kang et al., 2011 ; Horvath et al., 2011 ; Yano et al., 2008.

précoces par les NFs ou l'inoculation de rhizobia est fortement réduite, suggérant un rôle pour cette protéine dans la voie de signalisation NF (Horvath et al., 2011). Alors que le processus d'infection est fortement altéré chez ces mutants (Figure 23C), la formation de primordia nodulaires n'est pas affectée (Yano et al., 2008) (Figure 23B). De plus, l'expression d'une forme auto-active de CCaMK (CCaMK^{T265D}) dans un fond mutant *cyclops* induit la formation de nodules spontanés en absence de rhizobia similaires aux nodules spontanés induits dans un fond génétique sauvage (Yano et al., 2008). Cependant, le nombre de nodules spontanés par plante est très réduit chez le mutant *cyclops*. Les auteurs de cette étude ont suggéré que CYCLOPS/IPD3 forme un complexe de signalisation avec CCaMK, au sein duquel CYCLOPS/IPD3 pourrait accomplir le rôle de facteur de transcription primaire qui régulerait l'expression de gènes requis pour l'infection rhizobienne (M. Parniske, European Nitrogen Fixation Congress 2012, Munich). Alors que ce complexe serait spécifiquement requis pour l'infection rhizobienne, l'organogénèse nodulaire nécessiterait d'autres substrats de CCaMK. Il est à noter que le rôle spécifique de CYCLOPS/IPD3 dans l'infection rhizobienne est controversé. En effet, comme les mutants *cyclops* transformés par CCaMK^{T265D} présentent une forte réduction de nodules spontanés, il est probable qu'au même titre que les autres gènes de la voie de signalisation, CYCLOPS/IPD3 soit également requis pour l'organogénèse nodulaire. La présence de nodules spontanés s'expliquerait par une pénétrance incomplète du phénotype observé chez le mutant *cyclops* (Capoen and Oldroyd, 2008; Horvath et al., 2011).

Un autre partenaire de CCaMK, CIP73 (CCaMK-Interacting Protein of approximately 73 kD), a récemment été identifié par un criblage d'interacteurs de CCaMK en double hybride (Kang et al., 2011). (Figure 23). Cette protéine possède un domaine Ubiquitin-like (domaine Scythe_N), elle est localisée dans le noyau des cellules racinaires épidermiques et corticales de *Lotus japonicus*, et peut être phosphorylée *in vitro* par CCaMK. L'expression de constructions RNAi ciblant *CIP73* et réduisant fortement son expression affecte l'organogénèse nodulaire sans altérer le processus d'infection dans les poils absorbants racinaires (Kang et al., 2011) (Figure 23D-E). Ainsi, CIP73 pourrait jouer un rôle spécifique au cours de l'organogénèse nodulaire, bien qu'un tel mode d'action reste à déterminer.

3.3 Les facteurs de transcription en aval de DMI3

De nombreux facteurs de transcription (FTs), appartenant à la famille des GRAS, des ERF, ou des NF-Y, mais également provenant de familles de régulateurs non caractérisés (e.g. NIN), ont une fonction importante au cours de la symbiose *rhizobium*-légumineuses,

génétiqnement en aval de *CCaMK/DMI3*. Ce nombre important de facteurs de transcription symbiotiques est le reflet de la complexité des processus développementaux qu'ils contrôlent. Les profils d'expression génique activée par ces régulateurs sont par ailleurs souvent dépendants des types cellulaires (e.g. épiderme, cortex racinaire...).

3.3.1 NSP1 et NSP2

NSP1 et NSP2 sont deux régulateurs transcriptionnels de la famille des GRAS impliqués dans la voie de signalisation NF en aval des oscillations calciques (Wais et al., 2000; Oldroyd and Long, 2003; Kalo et al., 2005; Smit et al., 2005). Ces deux protéines ont été identifiées à la fois chez *Medicago truncatula* et chez *Lotus japonicus* (Heckmann et al., 2006). Les FTs GRAS font partie d'une large famille multigénique que l'on retrouve à travers le règne végétal, et ces protéines ont des rôles variés au cours du développement (Hirsch and Oldroyd, 2009). Ces protéines ont généralement une taille de 400 à 700 acides aminés, et possèdent des motifs distincts dans leur région C-terminale, que l'on retrouve dans cet ordre, de la partie N-terminale vers la partie C-terminale : un domaine LHR I (Leucline Heptad Repeat I), un domaine VHIID, un domaine LHR II, un domaine PFYRE, et un domaine SAW (Hirsch and Oldroyd, 2009) (Figure 24A). Bien que NSP1 et NSP2 codent tous deux pour des membres de la famille des GRAS, ils présentent une faible similarité (17% d'identité, 32% de similarité), ce qui pourrait suggérer des fonctions potentiellement similaires mais non redondantes dans la voie de signalisation NF. Chez *Medicago truncatula*, les mutants *nsp1* et *nsp2* sont altérés dans l'activation du primordium nodulaire, l'infection rhizobienne, l'expression génique induite par les NFs, et la déformation des poils absorbants racinaires en réponse aux bactéries est réduite chez ces mutants (Catoira et al., 2000; Oldroyd and Long, 2003). De plus, il a été montré que l'expression d'une CCaMK auto-active ne permet pas d'induire l'expression d'*ENOD11* dans les racines d'un mutant *nsp2*, alors qu'une induction partielle de ce gène est présente chez le mutant *nsp1* (Gleason et al., 2006). Ces observations confirment l'hypothèse d'une redondance partielle entre ces deux gènes. Au vu de l'activation partielle d'*ENOD11* observée chez le mutant *nsp1*, il est néanmoins probable que NSP1 ne soit pas requis pour l'activation optimale à la fois épidermique et corticale d'*ENOD11*, contrairement à NSP2. Dans ce sens, il serait intéressant d'étudier en détail les profils d'expression de ces deux gènes au cours des étapes de signalisation et d'infection. Des preuves quant à l'implication de NSP1 et NSP2 dans l'activation de l'expression génique ont été apportées récemment (Hirsch et al., 2009; Cerri et al., 2012). En effet, une interaction entre NSP1 et NSP2 a été observée par le système double hybride, et il a été montré par des

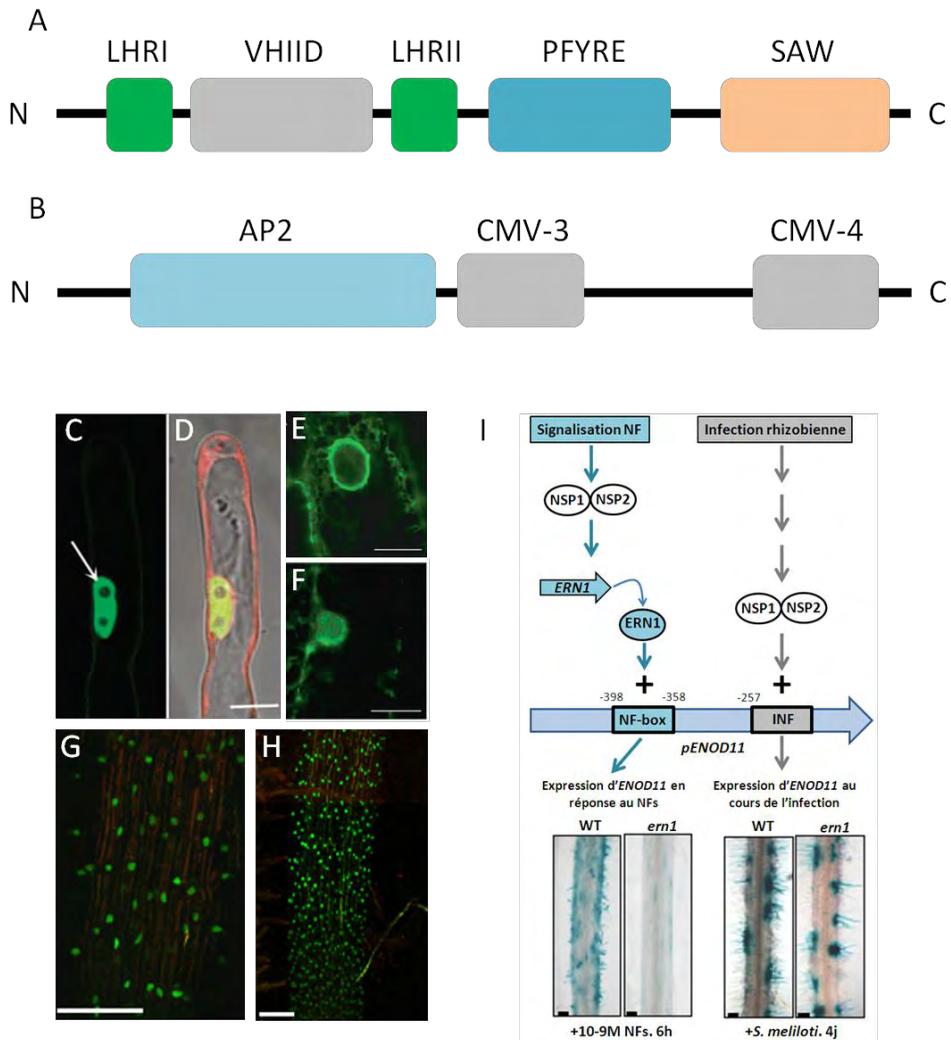


Figure 24. Rôle des facteurs de transcription ERNs et NSPs au cours des étapes précoces de la nodulation.

(A) Structure schématique des facteurs de transcription NSP1 et NSP2 (554 et 508 acides aminés, respectivement). Ces FTs possèdent cinq domaines conservés dans la famille des GRAS : deux domaines LHR (leucine heptad region), un domaine VHIID, un domaine PFYRE et un domaine SAW. (B) Structure schématique des facteurs de transcription ERN1 et ERN2 (268 et 313 acides aminés, respectivement). Ces FTs possèdent un domaine AP2 de liaison à l'ADN et deux domaines CMV3 et CMV4 (conserved motif of group V) basés sur la conservation de séquences des membres de cette sous-famille d'AP2/ERFs, qui sont de fonctions inconnues. (C-H) Localisations subcellulaires de NSP1 (C, D), NSP2 (E, F), ERN1 (G), et ERN2 (H). La fusion traductionnelle *pNSP1 - GFP - NSP1* est localisée dans le noyau des poils absorbants de *Medicago truncatula* (C, D). La fusion traductionnelle *35S - NSP2 - GFP* est majoritairement localisée dans l'enveloppe nucléaire (E), puis relocalisée dans le noyau des poils absorbants après un traitement aux NFs ($10^{-8}M$) (F). Les fusions traductionnelles *pERN1 - YFP - ERN1* (G) et *pERN2 - YFP - ERN2* (H) sont localisées dans le noyau des cellules épidermiques de *Medicago truncatula* entre 30 et 41 heures après inoculation par *S. meliloti*. (I) Modèle pour l'activité de NSP1/2 et ERN1 dans l'induction de l'expression d'*ENOD11*. NSP1/NSP2 et ERN1 activent tous deux l'expression d'*ENOD11* mais via des régions promotrices différentes qui régulent l'expression au cours des phases de pré-infection (signalisation NF) (NF-box) ou pendant les étapes d'infection (INF). L'expression d'une fusion transcriptionnelle *pENOD11 : GUS* n'est observée dans le mutant *ern1* qu'au cours de l'infection rhizobienne (I). Barres = 10µm (C-F), 100µm (G-H), 200µm (I).

D'après Smit et al., 2005 ; Kalo et al., 2005, Middleton et al., 2007 ; Cerri et al., 2012.

expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) *in vivo* que le dimère NSP1/NSP2 se lie aux éléments *cis* AATTT des promoteurs de nodulines précoces telles qu'*ENOD11*, *NIN*, ou encore *ERN1* dans les racines de *Medicago*. Cette liaison est de plus augmentée après une élicitation aux NFs (Hirsch et al., 2009). De plus, le dimère NSP1/NSP2 est capable d'activer l'expression de *ERN1* et d'*ENOD11* dans le système hétérologue *N. benthamiana* (Cerri et al., 2012) (Figure 24I).

3.3. 2 Les facteurs de transcription ERNs

ERN1 (ERF required for nodulation 1) est un facteur de transcription de la famille des AP2/ERFs (Ethylene Response Factor) (Figure 24B) qui agit en aval de CCaMK dans la voie de signalisation NF (Andriankaja et al., 2007; Middleton et al., 2007). Ce gène a été identifié à l'issue d'un criblage de mutants déficients dans la nodulation, et le mutant *bit1* (*ern1*) est bloqué dans l'initiation et le développement des cordons d'infection (Middleton et al., 2007). De plus, il a été montré que *ERN1* est nécessaire à l'activation de l'expression d'*ENOD11* en réponse aux NFs ainsi qu'à la formation de nodules spontanés induits par une CCaMK auto-active (Middleton et al., 2007). Des expériences de délétions de promoteur ont permis d'identifier des éléments *cis* dirigeant l'expression d'*ENOD11* au cours des étapes de pré-infection et d'infection (Boisson-Dernier et al., 2005; Andriankaja et al., 2007). En particulier, une région de 257 paires de bases en amont du codon d'initiation de la traduction a été définie comme suffisante pour l'expression d'*ENOD11* au cours de l'infection rhizobienne (Boisson-Dernier et al., 2005), alors qu'un élément *cis* entre -411 et -358 paires de bases en amont de l'ATG, appelé NF-box et présentant un motif GCC-like, confère l'expression d'*ENOD11* en réponse aux NFs au cours des étapes de pré-infection (Boisson-Dernier et al., 2005; Andriankaja et al., 2007) (Figure 16). Cette dernière a été utilisée comme appât dans des expériences de simple hybride dans la levure, afin d'identifier des régulateurs transcriptionnels probables d'*ENOD11* au cours de la signalisation NF, et a mené à l'identification de trois facteurs de transcriptions de la famille des ERFs, dont ERN1 (ERN1, ERN2, ERN3) (Andriankaja et al., 2007). Alors que ERN1 et ERN2 fonctionnent comme des activateurs transcriptionnels, ERN3 réprime l'activation de l'expression d'*ENOD11* dépendante de ERN1 et ERN2. Les rôles relatifs de ERN1/ERN2 et NSP1/NSP2 en aval de la voie de signalisation NF et dans l'activation de la transcription d'*ENOD11* ont été récemment étudiés en détails (Cerri et al., 2012) (Figure 24I). Bien que NSP1/NSP2 et ERN1 activent tous deux l'expression d'*ENOD11*, deux régions séparées du promoteur d'*ENOD11* sont impliquées. ERN1 est requis pour l'induction de l'expression d'*ENOD11* en réponse aux NFs

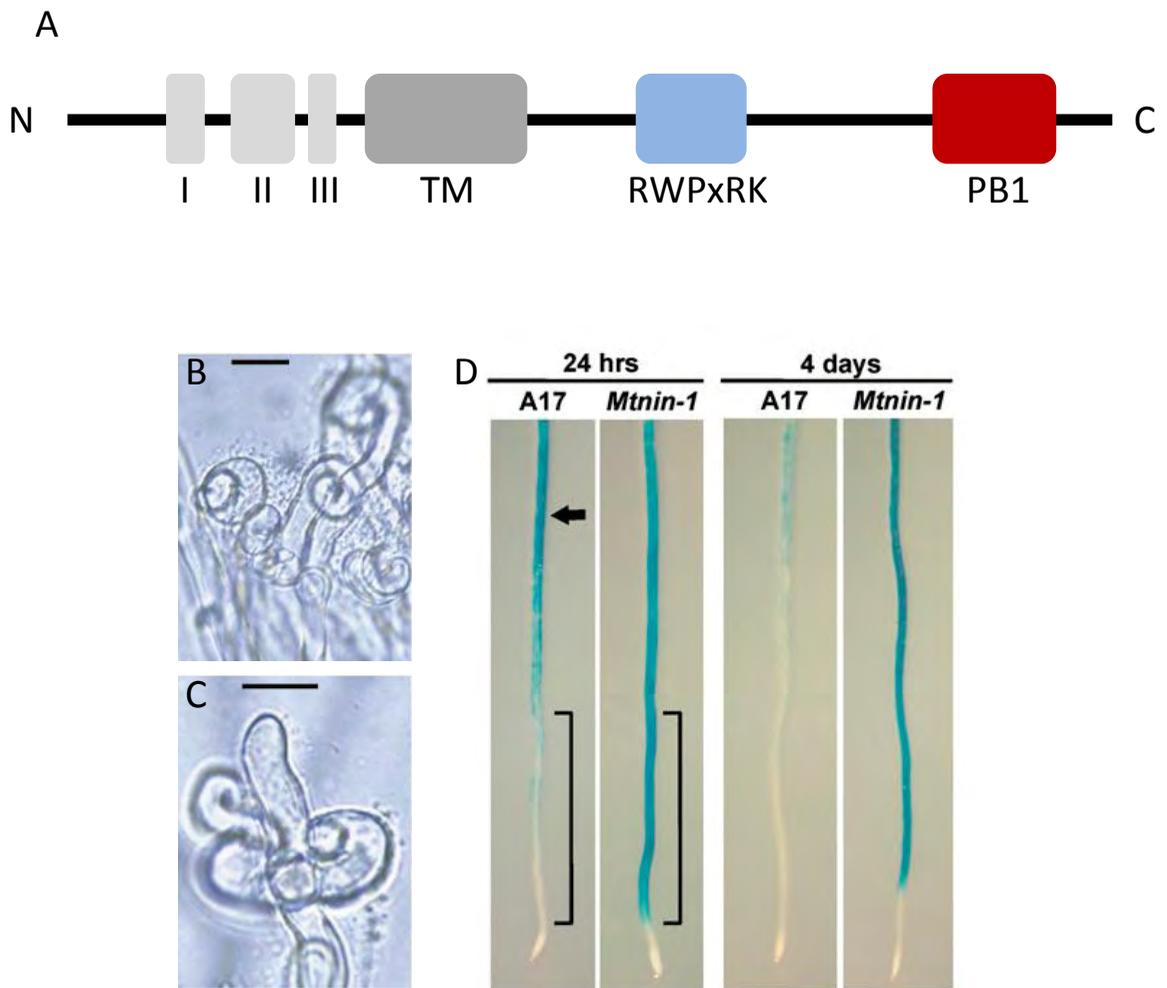


Figure 25. Implication de NIN dans les réponses épidermiques aux NFs ou à *S. meliloti*.

(A) Structure schématique du facteur de transcription NIN (933 acides aminés). Sur la base de la conservation des séquences entre les homologues de MtNIN chez *Medicago truncatula*, le pois, et *Lotus japonicus*, cette protéine est composée de six domaines putatifs. Les domaines de I à III sont de fonction inconnue. NIN présente également un domaine hydrophobe transmembranaire (TM), un domaine de liaison à l'ADN (RWPxRK), et un domaine PB1 d'interaction protéine-protéine. (B, C) Phénotype du mutant nod- Ljnin après inoculation par *M. loti*. Formation de courbures en crosse de berger chez une plante sauvage (B). Les courbures et les déformations des poils absorbants chez le mutant *nin* sont excessives (C). (D) La zone d'expression racinaire d'*ENOD11* en réponse aux NFs est élargie chez le mutant *Mtnin-1*. Expression d'une fusion p*ENOD11* : *GUS* après 24 heures ou 4 jours de traitement aux NFs. La flèche indique le centre approximatif de la zone de réponse aux NFs observée en réponse aux NFs au début de l'expérience.

D'après Marsh et al., 2007 ; Schauser et al., 1999.

au cours des étapes de pré-infection exclusivement, via sa liaison à la NF-box, alors que le dimère NSP1/NSP2 régule son expression au cours des étapes d'infection en se liant à la boîte d'infection (Cerri et al., 2012). De plus, au vu des profils d'expression de *ERN1* et *ERN2*, il a été proposé que ERN1 serait impliqué dans les étapes qui précèdent et accompagnent la progression du cordon d'infection, alors que ERN2 serait plus spécifiquement impliqué dans certains stades d'infection. Le mutant *ern1* peut être complété par l'expression de *ERN2* sous le contrôle du promoteur de *ERN1*, ce qui indique que ERN1 et ERN2 ont des activités transcriptionnelles similaires, et que leurs rôles différents au cours des étapes précoces de la symbiose sont une conséquence de leur spécificité d'expression spatio-temporelle (Cerri et al., 2012).

3.3.3 NIN

Les mutants *nin* (*nodule inception*) de *Lotus* et *Medicago* sont très altérés dans les processus d'infection rhizobienne et dans la division des cellules corticales (Schauser et al., 1999; Marsh et al., 2007). De plus, ces mutants présentent des déformations de poils absorbants exagérées en réponse aux bactéries (Figure 25B-C), bien que les cordons d'infection soient rarement formés (Marsh et al., 2007). *NIN* code pour un facteur de transcription atypique, composé d'un domaine transmembranaire suivi d'un domaine RWPxRK de liaison à l'ADN, et d'un domaine PB1 d'interaction protéine-protéine (Figure 25A). Il a été proposé que ce facteur de transcription localisé à la membrane plasmique, serait activé par protéolyse après la perception de son ligand (Schauser et al., 1999; Marsh et al., 2007). Au cours de la voie de signalisation NF, l'expression de *NIN* est induite dans l'épiderme et dans le primordium nodulaire en formation (Schauser et al., 1999; Radutoiu et al., 2003), et son induction en présence de bactéries dépend de *NFP*, *DMI* et *NSP*. De plus, l'utilisation d'une fusion transcriptionnelle *pENOD11 : GUS* dans le mutant *nin* a montré que *NIN* régulerait négativement l'expression spatiale d'*ENOD11* dans l'épiderme en réponse aux NFs (Marsh et al., 2007) (Figure 25D). L'absence de nodules induits par la forme auto-active de CCaMK chez le mutant *nin* a également permis de montrer que *NIN* est un régulateur essentiel de l'organogénèse, et fonctionnerait en aval de la voie de signalisation NF (Marsh et al., 2007). En réponse aux NFs, il a récemment été montré que *NIN* active l'expression d'une pectate lyase (*LjNPL*) indispensable à la progression des cordons d'infection à travers les poils absorbants racinaires et les nodules (Xie et al., 2012) (voir 1.3.3). Ces données soulignent le rôle important de *NIN* pour l'initiation de l'infection racinaire et l'interaction *rhizobium*-légumineuses.

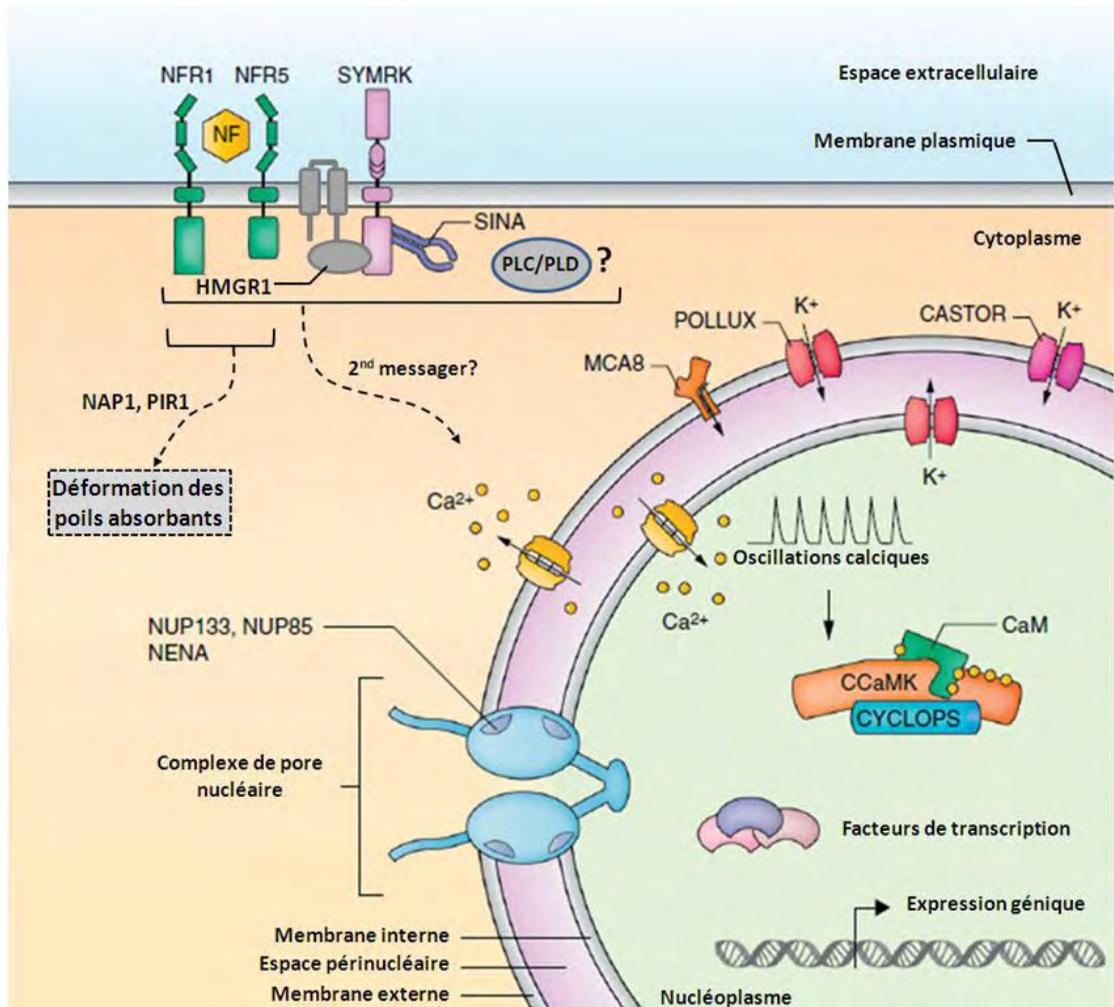


Figure 26. Transduction du signal NF dans l'épiderme.

La perception des NFs à la membrane plasmique est accomplie par des LysM-RLKs, comprenant NFR1/NFR5 chez *Lotus japonicus*, ou NFP et probablement un autre LysM-RLK encore non-caractérisé chez *Medicago truncatula*. SINA4 interagit avec le domaine kinase de SYMRK/DMI2 et serait impliqué dans la dégradation de ce récepteur. Les oscillations calciques nucléaires sont observées dans les minutes qui suivent la perception des NFs. Le second messenger responsable de l'activation de ces oscillations calciques n'a pas encore été identifié. Cependant, il pourrait être le produit de l'activité enzymatique des phospholipases C et D, ou de HMGR1, autre interacteur de SYMRK/DMI2. Les composants de la voie de signalisation ont été génétiquement placés en amont (SYMRK/DMI2, CASTOR/POLLUX/DMI1, NUP85, NUP133, NENA) ou en aval (CCaMK/DMI3, CYCLOPS/IPD3) des oscillations calciques. Plusieurs facteurs de transcription comme NSP1/NSP2, ERN1, et NIN activent l'expression des gènes symbiotiques (e. g. *ENOD11*) et agissent en aval de CCaMK/DMI3. MCA8, une pompe ATPase à calcium, est probablement impliquée dans la recapture des ions Ca²⁺ vers l'espace périnucléaire. Chez *Lotus japonicus*, l'absence de formation de cordons d'infections chez les doubles mutants *nfr1/snf1* et *nfr5/snf1* suggère l'existence d'une voie de signalisation parallèle dépendante de NFR1/NFR5, mais indépendante des autres composants de la voie. NAP1 et PIR1 pourraient être impliqués dans cette voie parallèle, en jouant un rôle dans la déformation des poils absorbants en réponse aux NFs.

D'après Singh and Parniske, 2012 ; Oldroyd et al., 2011; Oldroyd and Downie, 2008.

3.4 Une voie parallèle

Il a été observé que des mutants dans les gènes *nup85*, *nup133*, *dmi1*, *dmi2*, et *ccamk* initient certaines réponses aux NFs dans les poils absorbants racinaires (e.g. réponses de déformation des poils absorbants), qui sont absentes chez les mutants pour les récepteurs des NFs. Ces données suggèrent l'existence d'une voie de signalisation parallèle requise pour l'initiation de l'infection, dans le même temps que la voie de signalisation caractérisée précédemment (Esseling and Emons, 2004; Kanamori et al., 2006; Miwa et al., 2006b; Saito et al., 2007). Récemment, il a été montré que les mutants *nfr1* et *nfr5* transformés par une CCaMK auto-active ne forment pas de cordon d'infection (Hayashi et al., 2010; Madsen et al., 2010). Cela confirme l'hypothèse de l'existence d'une voie parallèle, et montre que bien que même si CCaMK est nécessaire à l'infection bactérienne, elle n'est pas suffisante. En outre, un deuxième signal, indépendant de la CCaMK, est probablement déclenché par l'activation des récepteurs aux NFs (Murray, 2011). PIR1 (121F-specific p53 inducible RNA 1) et NAP1/RIT (Nck-associated protein 1), deux protéines impliquées dans l'organisation des filaments d'actine (Yokota et al., 2009; Miyahara et al., 2010), seraient impliquées dans cette voie parallèle, comme l'a montré l'utilisation de CCaMK auto-active dans les mutants correspondants (Madsen et al., 2010).

Un modèle décrivant la voie de signalisation NF dans l'épiderme et intégrant la majorité des protéines décrites précédemment est proposé figure 26.

3.5 Cytokinines et organogénèse nodulaire

La formation et la croissance des cordons d'infection doivent être spatialement et temporellement coordonnées à la formation du primordium nodulaire. Alors que généralement, chez *Medicago*, les cordons d'infection sont initiés dans les poils absorbants racinaires, le primordium nodulaire se développe à partir des cellules du cortex interne de manière concomitante. Pour former un nodule fonctionnel, les cordons d'infection doivent atteindre les cellules du primordium au bon moment. La formation des cordons d'infection et des primordia nodulaires sont tous deux induits par les NFs. Dans tous les mutants décrits jusque là, une perte de toutes les réponses induites par les NFs dans l'épiderme est toujours corrélée à une perte de divisions corticales induites par les NFs (Kouchi et al., 2010; Madsen et al., 2010; Oldroyd et al., 2011). Ainsi, la recherche de mutants dans lesquels les réponses épidermiques et corticales peuvent être découplées a permis de mieux comprendre l'origine

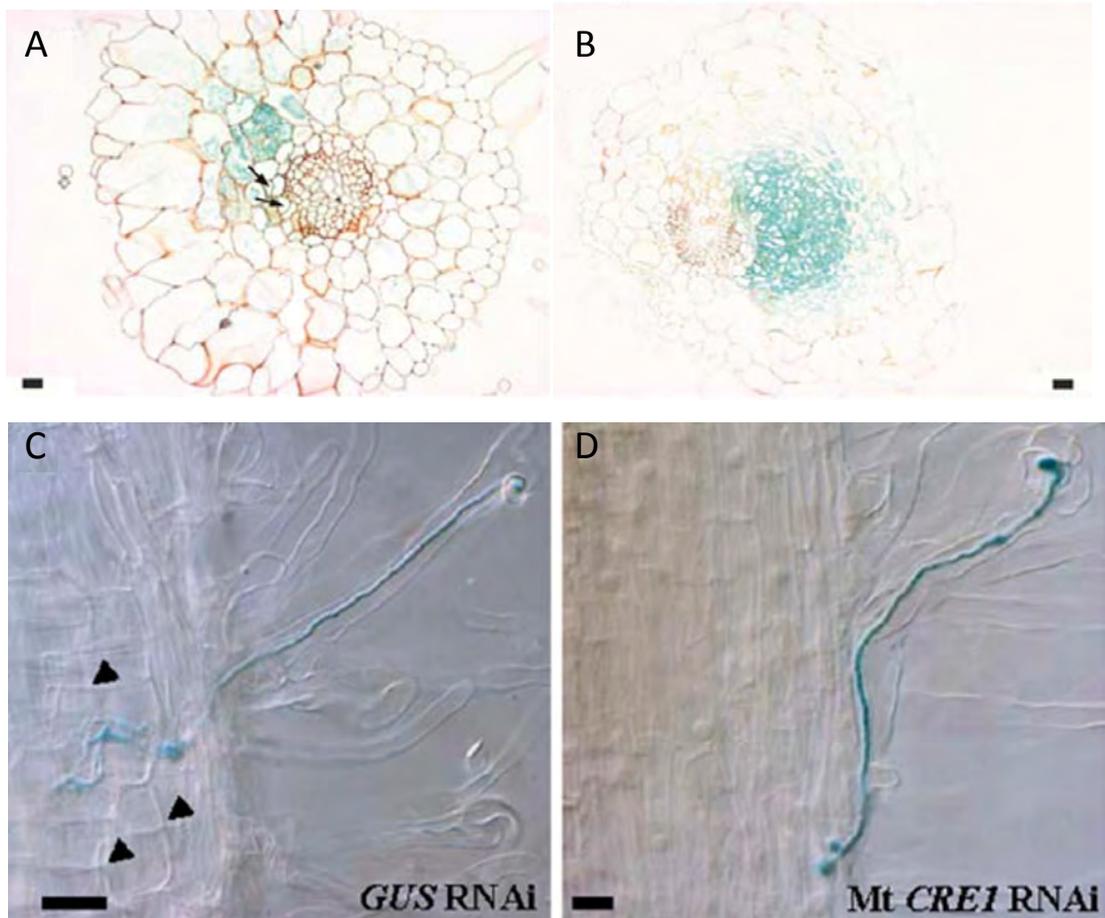


Figure 27. Les cytokinines et l'organogénèse nodulaire.

(A, B) Primordium nodulaire induit par des cytokinines exogènes. Formation d'un primordium nodulaire dans des racines de *Lotus japonicus* exprimant une construction *pNIN : GUS*, en croissance sur un milieu contenant du benzylaminopurine (BAP, cytokinine de synthèse) à une concentration de 10^{-8} M. Les flèches indiquent les divisions cellulaires corticales induites par les cytokinines, et l'activité GUS est observée dans et autour des cellules en division.

(C, D) Evènements précoces de nodulation chez une plante dérégulée pour le gène *CRE1* par la méthode de RNAi chez *Medicago truncatula*. L'infection par *S. meliloti* est visualisée grâce au gène rapporteur *LacZ* exprimé par les bactéries. Les cordons d'infection sont arrêtés à l'entrée du cortex et les divisions cellulaires corticales sont absentes chez les plantes RNAi (D). Barres = 10 μ m (A), 20 μ m (B), 25 μ m (C-D).

D'après Heckmann et al., 2011 ; Gonzalez-Rizzo et al., 2006.

potentielle du signal induisant l'organogénèse nodulaire. Chez *Lotus japonicus*, un tel mutant, *hit1* (hyperinfected 1), a été identifié, et le gène correspondant code pour un récepteur membranaire aux cytokinines appelé LHK1 (Lotus histidine kinase) (Murray et al., 2007a; Tirichine et al., 2007). Les mutants *hit1-1* à *hit1-3* sont incapables de former des nodules, alors que les réponses épidermiques comme la formation des cordons d'infection ne sont pas bloquées (Murray et al., 2007a). Cependant les cordons d'infection chez le mutant *hit1* sont généralement arrêtés à la base des cellules épidermiques et ne pénètrent pas dans le cortex racinaire. Ce défaut d'infection est probablement lié à la perte d'activation des cellules corticales et à l'absence consécutive de ponts cytoplasmiques à travers lesquels les cordons d'infection sont guidés dans les cellules corticales (Murray et al., 2007a). Comme chez le lotier, les mutants *cre1* de *Medicago truncatula* ou les plantes dont l'expression du gène *CRE1* est dérégulée sont également incapables d'induire la formation de primordia nodulaires, et les cordons d'infections sont généralement bloqués dans l'épiderme racinaire ou lors de la pénétration dans le cortex (Gonzalez-Rizzo et al., 2006; Plet et al., 2011) (Figure 27C-D).

Il a été montré que l'application de cytokinines sur les racines de légumineuses induit la formation de primordia nodulaires (Figure 27A-B) de manière dépendante de LHK1/CRE1 (Heckmann et al., 2011). Cette activation des primordia nodulaires est associée à l'induction de l'expression de nodulines précoces telles que *NIN* ou *ENOD40* (Fang and Hirsch, 1998; Heckmann et al., 2011) (Figure 27A-B). Il a ainsi été proposé que les cytokinines soient le signal de courte distance qui relierait la signalisation NF dans l'épiderme aux divisions cellulaires corticales. En d'autres mots, il est probable que la signalisation NF induise la synthèse de cytokinines dans l'épiderme, qui diffuseraient dans le cortex et activeraient la formation du primordium nodulaire, même si une telle hypothèse reste à confirmer. La signalisation en réponse aux cytokinines ne semble être déclenchée que dans le péri-cycle et le cortex racinaire, comme le montrent les localisations d'expression de *CRE1* ou *RR4*, gène de réponse primaire aux cytokinines (Lohar et al., 2004; Plet et al., 2011). Il a donc été proposé que les cytokinines soient perçues par CRE1/LHK1 dans le péri-cycle ou le cortex, où l'expression de *NIN* est activée par le facteur de transcription dimérique NSP1/NSP2 (Oldroyd et al., 2011).

L'activation de la formation de primordia nodulaires par les cytokinines est en effet dépendante de la présence des facteurs de transcription *NIN*, *NSP1* et *NSP2* (Heckmann et al., 2011), mais indépendante des gènes de la voie de signalisation NF épidermique impliqués

dans la génération des oscillations calciques ou de CCaMK impliquée dans la perception de ces oscillations. De plus, une mutation gain de fonction dans le domaine extracellulaire de LHK1 confère au mutant de *Lotus japonicus snf2* la formation de nodules spontanés en absence de bactéries (Tirichine et al., 2007). Il est à noter que la formation des nodules spontanés chez ce mutant dépend des facteurs de transcription NIN et NSP2 (et probablement NSP1), mais ne requière pas NFR1, NFR5, SYMRK ou CCaMK. Ainsi il apparaît que certains facteurs de transcription impliqués dans les étapes de pré-infection et d'infection rhizobienne sont également requis dans les tissus racinaires plus internes pour accomplir leur rôle au cours de l'organogénèse nodulaire en réponse aux cytokinines.

3.6 Autres gènes requis pour l'infection

L'identification de mutants perte de fonction (knock-out : KO) a permis d'établir une importante liste de gènes impliqués dans l'infection bactérienne (Charpentier and Oldroyd, 2010). Cependant l'analyse de mutants alléliques faibles ou la réduction partielle de l'expression de certains gènes comme les RLKs symbiotiques par RNAi montrent que ceux-ci jouent également un rôle au cours de l'infection rhizobienne. Cette hypothèse s'appuie notamment sur l'expression de *NFP*, *LYK3* et *DMI2* avant et pendant l'infection rhizobienne, et dans la zone II du nodule chez *Medicago* (zone continuellement infectée), mais pas dans la zone III de fixation. L'activité des protéines responsables de la génération des oscillations calciques ainsi que de CCaMK et CYCLOPS/IPD3 est probablement maintenue, étant donné que les oscillations calciques sont présentes dans toutes les cellules autour du cordon d'infection (Sieberer et al., 2009; Sieberer et al., 2012). De plus, les rhizobia continuent de sécréter des NFs au cours de la progression du cordon d'infection.

3.6.1 Les micro-domaines membranaires

La réduction de l'expression de deux flotillines dans les racines de *Medicago truncatula* mène à la réduction du nombre de cordons d'infection (Haney and Long, 2010). FLOT2 et FLOT4 sont localisées dans des micro-domaines membranaires. Après inoculation, FLOT4 est uniquement localisé à l'apex du poil absorbant en élongation, et lors de la progression du cordon, cette protéine est localisée dans les membranes du cordon d'infection en développement (Haney and Long, 2010). L'expression de *FLOT2* et *FLOT4* est induite par les NFs durant l'infection, de manière dépendante de *NIN*, *NSP2*, mais pas *ERN1*.

Une rémorine exprimée spécifiquement au cours de la nodulation, appelée SYMREM1, est impliquée dans l'infection chez *Medicago truncatula* (Lefebvre et al., 2010). En effet, une réduction de l'expression de *SYMREM1* par RNAi affecte fortement la progression des cordons d'infection à travers les poils absorbants racinaires (Lefebvre et al., 2010). SYMREM1 interagit avec LYK3, NFP, et SYMRK via sa région C-terminale composée d'un domaine « coiled-coil » très conservé dans la famille des rémorines (Popp and Ott, 2011). Elle pourrait agir comme une protéine de soutien moléculaire qui facilite l'assemblage des complexes de signalisation à la membrane plasmique (Lefebvre et al., 2010). La localisation prédominante de SYMREM1 dans les micro-domaines membranaires permettrait le recrutement des composants de signalisation et de protéines impliquées dans les réarrangements membranaires comme les flotillines.

3.6.2 Protéines de fonctions inconnues

Récemment, plusieurs gènes jouant des rôles dans l'infection ont été identifiés par des approches génétiques et biochimiques. Chez les mutants *lin* (*lumpy infection*) et *cerberus* de *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus*, respectivement, la plupart des cordons d'infection sont arrêtés dans l'épiderme, et les nodules ne sont jamais colonisés (Kiss et al., 2009; Yano et al., 2009). Les gènes mutés chez ces deux mutants sont deux gènes orthologues codant pour des protéines U-Box/WD40. LIN et CERBERUS ont probablement la même fonction, puisque l'expression de *LIN* chez un mutant *cerberus* de *Lotus japonicus* restaure la nodulation de ce dernier (Kiss et al., 2009). Le domaine U-Box est un domaine conservé chez les E3 ubiquitine-ligases qui ubiquitinent des protéines substrats pour permettre leur adressage au protéasome 26S. La nodulation spontanée activée par une CCaMK auto-active est indépendante de *LIN*; *LIN/CERBERUS* ne seraient donc pas requis pour l'organogénèse nodulaire. Par contre, les nodules spontanés formés chez le mutant *cerberus* de lotier ne sont pas infectés (Madsen et al., 2010). Un autre mutant, *rpg*, est affecté dans le processus de courbure des poils absorbants racinaires, et dans la progression des cordons d'infection (Arrighi et al., 2008). *RPG* code pour une protéine possédant quatre régions coiled-coil, et localisée dans le noyau. L'expression de *RPG* est fortement réduite chez les mutants *lin* et *hcl* (*lyk3*), suggérant une action en aval de ces deux gènes. Cependant, l'expression de *RPG* chez les mutants *nin*, *nsp1*, *nsp2*, ou *ern1* n'a pas été déterminée et son implication dans la voie de signalisation NF reste énigmatique.

3.6.3 VAPYRIN et PUB1, un rôle pour la sécrétion au cours de l'infection ?

Le dépôt de protéines à la membrane plasmique et la sécrétion dans l'apoplaste d'enzymes de dégradation de la paroi végétale sont des événements requis pour l'attachement des rhizobia aux poils absorbants racinaires, la voie de signalisation NF, et l'initiation du cordon d'infection. De plus, la croissance du cordon d'infection requiert un dépôt permanent de composants pariétaux (Oldroyd and Downie, 2008). Le gène *VPY* (*VAPYRIN*) est essentiel au bon développement des cordons d'infection (Murray et al., 2011). Chez les mutants *vpy*, les cordons d'infection sont arrêtés au stade de micro-colonies, ou sont très élargis dans le poil absorbant, aboutissant à un blocage de leur croissance. De plus, chez une plante sauvage, l'expression de *VPY* est inductible par les NFs ou une inoculation bactérienne, préférentiellement dans l'épiderme racinaire. Cette induction est dépendante de *CCaMK* mais pas de *NIN*, ce qui révèle l'existence d'une voie indépendante de *NIN* requise pour l'infection (Murray et al., 2011). La protéine *VPY* contient un domaine MSP (major-sperm) et un domaine « ankyrin-repeat ». Chez les humains, la protéine *VAP33* qui contient un domaine MSP interagit avec un membre du complexe SNARE pour réguler l'adressage à la membrane de transporteurs de glucose en réponse à l'insuline, de manière dépendante de l'exocyste. L'exocyste est un complexe octomérique permettant l'attachement à la membrane des vésicules provenant du golgi avant l'assemblage du complexe SNARE au cours de l'exocytose (Zhang et al., 2010). Une autre protéine impliquée dans l'infection rhizobienne semble également liée aux processus d'exocytose. La protéine *PUB1* (plant U-Box 1) a été identifiée à l'issue d'un criblage d'interacteurs de *LYK3* dans le système double hybride (Mbengue et al., 2010). C'est une E3-ubiquitine ligase phosphorylée par le domaine kinase de *LYK3*, et la réduction de l'expression de *PUB1* par RNAi augmente la fréquence des cordons d'infection chez un mutant *lyk3*, suggérant que *PUB1* est un régulateur négatif de l'infection. De la même manière que *VPY*, l'induction de l'expression de *PUB1* par les NFs est dépendante de *CCaMK* mais pas de *NIN* (Mbengue et al., 2010). Chez *Arabidopsis*, un homologue de *PUB1* (*ARC1*) qui interagit également avec un récepteur kinase, a été montré comme interagissant avec *EXO70A1*, un membre du complexe exocyste (Gu et al., 1998). Il est ainsi probable que *PUB1* et *VPY* soient impliqués dans la régulation de la sécrétion au cours de l'infection rhizobienne de manière dépendante des NFs, même si un tel rôle pour ces protéines reste à démontrer.

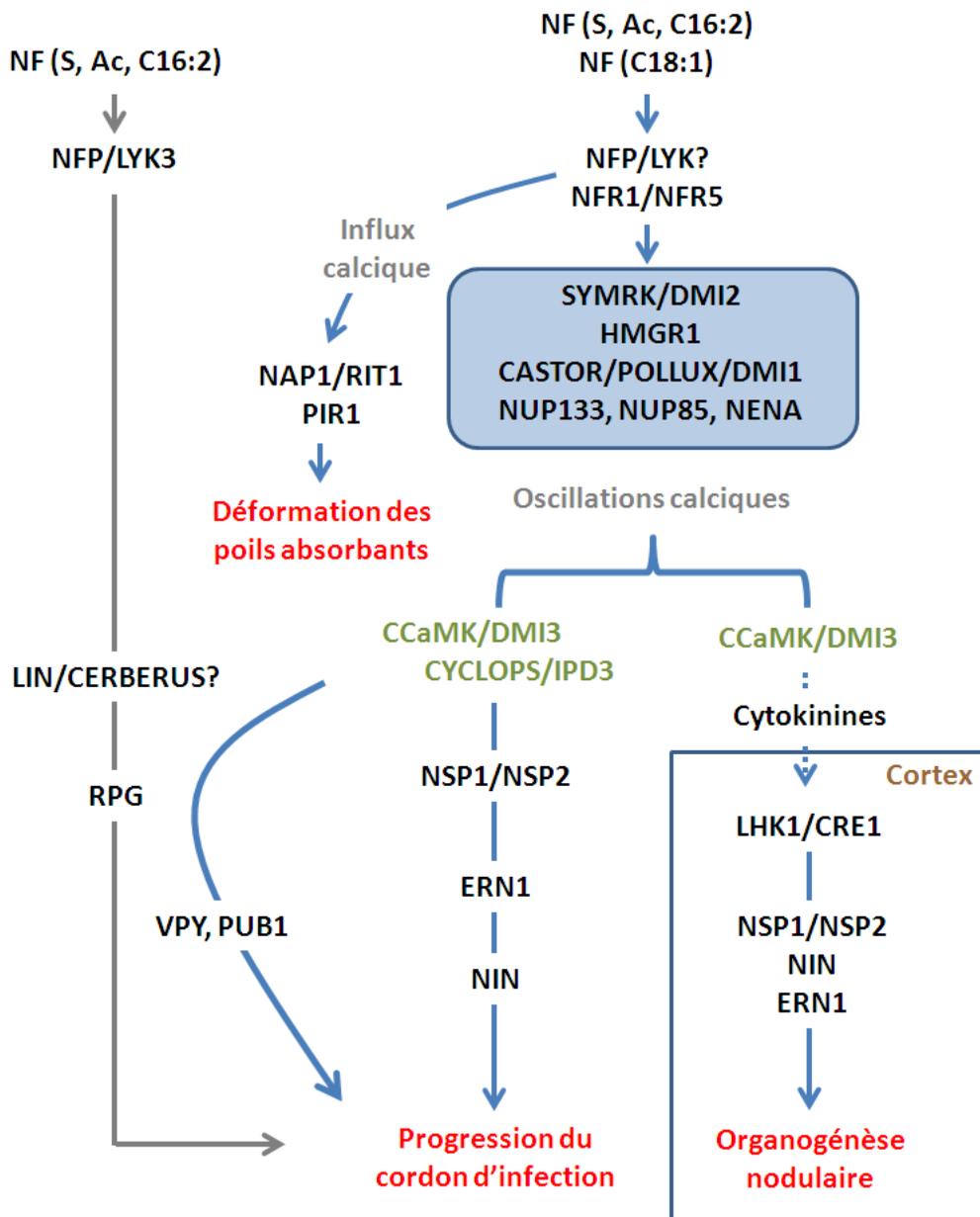


Figure 28. Modèle génétique des voies de signalisation impliquées dans la nodulation.

Deux voies parallèles sont représentées. La voie de signalisation dépendante de NFP et des gènes *DMI* est à la fois impliquée dans l'organogénèse nodulaire et l'infection (flèches bleues). Cette voie, peu sélective quant à la structure des NFs, est requise pour l'activation des oscillations calciques et mène à l'activation de CCaMK/DMI3. L'introduction de CCaMK^{T265D} auto-active dans le mutant *cyclops* aboutit à la formation de nodules, mais qui ne sont pas infectés. Ces données suggèrent un rôle important pour CYCLOPS/IPD3 au cours de l'infection. La voie d'entrée, sélective quant à la structure des NFs, dépend de LYK3 et NFP. L'introduction de CCaMK^{T265D} auto-active dans les mutants de lotier *nfr1* ou *nfr5* ne permet pas la formation de cordons d'infection, suggérant l'existence d'une bifurcation dans la voie de signalisation en aval des récepteurs aux NFs, menant à la déformation des poils absorbants, via l'action de RIT/NAP1 et PIR1.

Adapté de Madsen et al., 2010, Hayashi et al., 2010, Smit et al., 2007, Kouchi et al., 2010 ; Murray et al., 2011.

3.7 L'infection rhizobienne et l'organogénèse nodulaire, une signalisation croisée

Les gènes décrits précédemment peuvent être groupés en deux classes différentes : ceux dont les mutants ne présentent ni de divisions corticales ni de cordons d'infection, et ceux dont les mutants sont exclusivement affectés dans l'infection rhizobienne. Récemment, une étude génétique a été effectuée chez *Lotus japonicus* dans le but de disséquer les rôles de tous ces gènes au cours de l'infection et de l'organogénèse nodulaire (Madsen et al., 2010). Dans cette étude, les auteurs ont croisé les différents mutants de la voie de signalisation NF avec des mutants *snf1* (CCaMK auto-active) ou *snf2* (LHK1 auto-actif). Alors que les mutants simples *symrk* (*dmi2*), *nup133*, *nup85*, et *castor/pollux* (*dmi1*) sont bloqués dans le processus d'infection et l'organogénèse nodulaire, ces deux processus symbiotiques sont rétablis dans un fond génétique *snf1*. Ces données indiquent que dans la voie de signalisation NF, le rôle majeur de ces gènes réside dans l'activation de CCaMK pour permettre l'infection rhizobienne et l'organogénèse nodulaire. Cependant, dans le fond génétique *snf1*, les gènes *NFRs* sont requis pour l'initiation du cordon d'infection, alors que *NAPI* et *PIRI* sont requis pour la progression du cordon d'infection. L'explication la plus simple à ces observations serait la présence d'une deuxième branche juste en aval des récepteurs *NFRs* dans la voie de signalisation NF, impliquée exclusivement dans l'infection rhizobienne, et dans laquelle se situeraient *NAPI* et *PIRI* (Madsen et al., 2010).

L'absence d'infection dans les primordia du mutant *cyclops* après expression d'une CCaMK auto-active, et l'interaction protéine-protéine entre CCaMK et CYCLOPS, indiquent que CYCLOPS/IPD3 constitue un nœud transversal dans la voie de signalisation NF, entre la voie d'organogénèse et la voie d'infection (Messinese et al., 2007; Yano et al., 2008; Madsen et al., 2010). L'infection altérée chez le double mutant *cyclops/snf2* renforce cette hypothèse, et indique que les composants responsables de ce branchement entre la voie organogénèse et la voie infection dépendent de l'activité de CCaMK et agissent en amont des réponses aux cytokinines. Ainsi, le double mutant *snf1/hit1* (*hit1* : mutant K.O de *LHK1*) forme des cordons d'infections normaux, contrairement au double mutant *ccamk-13/snf2* (Madsen et al., 2010).

Sur la base des travaux effectués jusqu'à présent chez *Lotus japonicus* et *Medicago truncatula*, un modèle intégrant la voie de signalisation NF et la voie d'entrée suggérée au départ par Ardourel et al. (1994) est représenté sur la figure 28. La voie de signalisation NF dépend de NFP et probablement d'un autre LysM-RLK, puis des gènes *DMI*, *NSP*, *ERN* et

NIN. Cette voie peu sélective quant à la structure des NFs mène à l'organogénèse nodulaire, via l'activation d'un récepteur aux cytokinines dans le cortex racinaire, mais est également impliquée dans le processus d'infection rhizobienne. Alors que les mutants *nfp* de *Medicago truncatula* sont bloqués dans toutes les réponses précoces induites par les rhizobia (flux calciques, oscillations calciques, expression des nodulines précoces, formation des cordons d'infection et division des cellules corticales), les mutants *lyk3* inoculés ne sont pas affectés dans l'activation des divisions corticales (Catoira et al., 2001). Ainsi, en parallèle de la voie de signalisation dépendante de NFP, la voie d'entrée menant à l'infection rhizobienne est sélective quant à la structure des NFs, et requiert la présence de NFP et LYK3.

3.8 L'auto-régulation de la nodulation (AON)

Bien que la fixation azotée symbiotique soit fortement bénéfique aux légumineuses, le processus de nodulation représente un coût énergétique important. Par conséquent, les légumineuses restreignent la formation des nodules à un nombre minimal requis pour un apport optimal en azote. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans cette régulation négative de la nodulation. L'éthylène agit localement dans la racine pour réguler la signalisation NF et le positionnement correct des nodules (Kouchi et al., 2010). Un autre mécanisme, l'AON (auto-regulation of nodulation), implique une communication longue distance reliant les racines aux parties aériennes (Kouchi et al., 2010) (Figure 29A). Cette communication est en lien étroit avec la signalisation précoce en réponse aux NFs (Mortier et al., 2010; Saur et al., 2011; Mortier et al., 2012). On pense que l'AON est constituée de deux signaux : un signal dérivé des racines, et un signal dérivé des parties aériennes de la plante. Le premier est généré dans les racines en réponse aux NFs, puis transloqué dans les parties aériennes. A ce niveau, le second signal généré dans les parties aériennes est transloqué dans les racines pour restreindre la nodulation. Logiquement, les mutants affectés dans l'AON présentent des phénotypes d'hyper-nodulation. Les gènes responsables de ces phénotypes ont été clonés. Parmi eux, le récepteur kinase LRR MtSUNN/LjHAR1, ayant une grande similarité avec CLAVATA1 (CLV1), serait la protéine qui perçoit le signal dérivé des racines (Krusell et al., 2002) (Figure 29A). La protéine KLAVIER (KLV), un autre LRR-RLK, agirait de concert avec HAR1 dans la perception de ce signal chez *Lotus japonicus* (Oka-Kira et al., 2005). L'expression des gènes *HAR1/SUNN* et *KLV* est localisée dans les tissus vasculaires des feuilles, des pétioles, des tiges et des racines (Kouchi et al., 2010; Schnabel et al., 2012).

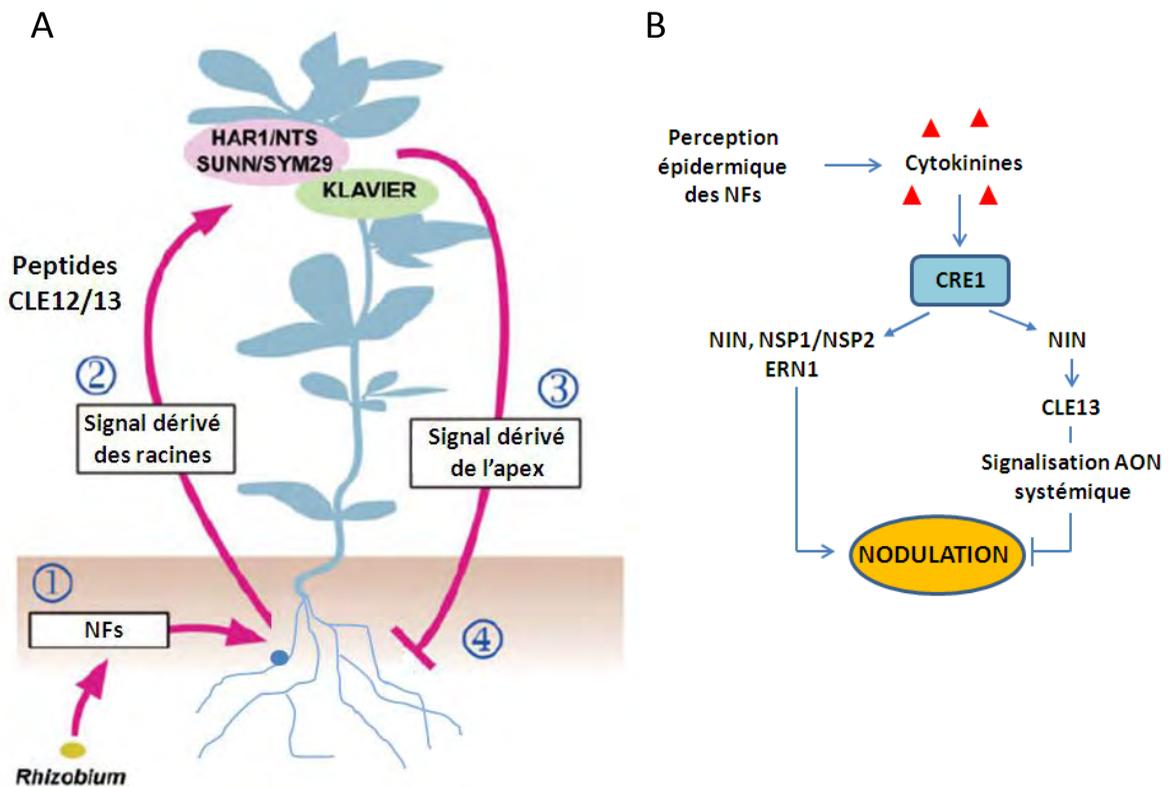


Figure 29. Auto-régulation de la nodulation et interférence avec la signalisation NF.

(A) Modèle expliquant l'auto-régulation de la nodulation (AON) dépendante des récepteurs kinase LRR. (1) La perception des NFs initie la nodulation, mais également la production d'un signal inhibiteur dérivé des racines. (2) Les peptides CLE12 et CLE13 de *Medicago truncatula* font probablement partie de ce signal et seraient transportés vers les parties aériennes. Le récepteur LRR-RLK SUNN/HAR1/NTS/SYM29, de concert avec KLAVIER, seraient impliqués dans la perception des peptides CLE. (3) Ils éliciteraient la production d'un signal dérivé des parties aériennes, qui en retour inhiberait la nodulation (4). (B) Interférence entre l'AON et la voie de signalisation NF. L'induction de l'expression de MtCLE13 par les cytokinines dépend de CRE1 et NIN, mais pas de NSP2 et ERN1, ce qui suggère que deux voies parallèles sont déclenchées par les cytokinines dans le cortex. Une voie est requise pour l'activation des facteurs de transcription NSPs, ERN1, et NIN, aboutissant aux divisions cellulaires corticales. L'autre voie implique MtCLE13, qui inhiberait indirectement la nodulation.

Adapté de Kouchi et al., 2010 ; Mortier et al., 2010, 2012.

Une autre question importante reste la nature du signal dérivé des racines. Les similarités importantes entre SUNN/HAR1 et CLV1 suggèrent que SUNN puisse lier des peptides CLV3/EMBRYO SURROUNDING REGION (CLE) (Ogawa et al., 2008). Les peptides CLE sont des protéines secrétées de 12 à 13 acides aminés qui font partie d'une large famille multigénique. Chez *Medicago truncatula*, l'expression ectopique de *CLE12* et *CLE13* réduit ou bloque fortement la nodulation par un mécanisme qui dépend de la présence de SUNN/HAR1 (Mortier et al., 2010; Saur et al., 2011; Mortier et al., 2012). A l'inverse, la réduction de l'expression de ces gènes par RNAi augmente le nombre de nodules formés chez *Medicago*. Au cours de la nodulation, *CLE13* est exprimé dans le cortex racinaire en réponse aux NFs, et son induction dépend de la présence de CRE1, plaçant ainsi *CLE13* en aval de la perception des cytokinines dans le contrôle de l'organogénèse nodulaire (Mortier et al., 2010; Mortier et al., 2012) (Figure 29B). En réponse aux cytokinines, l'induction de ce gène dépend de la présence de CRE1, et du facteur de transcription NIN, mais pas des NSPs ni de ERN1. Ces résultats suggèrent que *CLE13* agit en aval de NIN, mais indépendamment de ERN1, NSP1 et NSP2, qui jouent pourtant un rôle dans la signalisation induite par les cytokinines.

4. Les facteurs de transcription NF-Y

Dans le but d'obtenir un meilleur aperçu des mécanismes impliqués dans la régulation du développement nodulaire chez *Medicago truncatula*, des études transcriptomiques ont été effectuées dans l'équipe d'accueil, et ont mené notamment à l'identification d'un grand nombre de gènes codant pour des facteurs de transcription dont l'expression est affectée au cours de la nodulation (El Yahyaoui et al., 2004; Moreau et al., 2011). L'expression d'un de ces gènes, *MtNF-YAI* (nuclear factor Y subunit A1) (précédemment appelé *MtHAP2-1*), est fortement induite au cours du développement nodulaire (El Yahyaoui et al., 2004) (Figure 30A). *NF-YAI* code pour une sous-unité du complexe hétéro-trimérique NF-Y, comprenant NF-YA, NF-YB et NF-YC. Ce facteur de transcription est le complexe majeur qui se lie aux éléments *cis* CCAAT présents chez de nombreux promoteurs eucaryotes (Dolfini et al., 2012). Alors que chez les mammifères et la levure, chaque sous-unité n'est codée que par un seul gène, les membres NF-YA, NF-YB et NF-YC de plantes appartiennent à des familles multigéniques. Ainsi, une recherche dans le génome de *Medicago truncatula* a mené à l'identification de 8 *NF-YAs*, 19 *NF-YBs*, et 10 *NF-YCs* différents. L'apparition de familles multigéniques pour chaque sous-unité NF-Y chez les plantes a fait l'objet d'une revue bibliographique récente rédigée au cours de ma thèse (Laloum et al., 2012).

CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many?

Tom Laloum^{1,2}, Stéphane De Mita³, Pascal Gamas^{1,2}, Maël Baudin^{1,2} and Andreas Niebel^{1,2}

¹INRA, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR441, F-31326 Castanet-Tolosan, France

²CNRS, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR2594, F-31326 Castanet-Tolosan, France

³INRA/Université de Lorraine, Interactions Arbres-Microorganismes (IAM), UMR1136, 54280 Champenoux, France

Transcription factors belonging to the CCAAT-box binding factor family (also known as the Nuclear Factor Y) are present in all higher eukaryotes. Studies in plants have revealed that each subunit of this heterotrimeric transcription factor is encoded by a gene belonging to a multigene family allowing a considerable modularity. In this review, we focus on recent findings concerning the expression patterns and potential functions of different members of these NF-Y protein families using a phylogenetic approach. During the course of evolution plant CCAAT-box binding factors seem to have diversified into at least two main groups. The first group has more general expression patterns and/or functions whereas the second group has acquired more specific expression patterns and/or functions and could play key roles in specific pathways.

A heterotrimeric transcription factor extensively studied in animal systems

In most species, the CCAAT-binding factor (CBF), also known as the Nuclear Factor Y (NF-Y) or Heme Activator Protein (HAP) is composed of three subunits: NF-YA (also termed CBF-B, HAP2), NF-YB (CBF-A, HAP3), and NF-YC (CBF-C, HAP5) [1] (Figure 1a). A fourth subunit, HAP4, is only present in fungi where it provides the transcriptional activation domain [2]. In recent years the majority of publications in mammals and various plant species have preferentially used the name NF-Y, in particular in *Arabidopsis*, following the recommendations for a simplified *Arabidopsis* nomenclature made in a recent publication [3]. We respectfully propose that this nomenclature should from now on be used for all plant CCAAT-box binding factor encoding genes and be referred to as GsNF-Y (GsNF-YAx, GsNF-YBy, and GsNF-YCz), in which Gs is the species initials (e.g., MtNF-Y for *Medicago truncatula*). The Nuclear Factor Y (NF-Y) complex has been extensively studied in animal systems; for reviews, see [1,4,5]. Although all three subunits have been shown *in vitro* to be essential for binding to the CCAAT-box [6,7], NF-YA is the subunit that makes sequence-specific contact with CCAAT boxes [8]. NF-YB and NF-YC possess histone-fold motifs that allow them to form a tight dimer, the crystal structure of which has been determined [9]. This dimer can then interact with NF-YA, and by analogy with

the histone H2A-H2B dimer, binds to DNA non-specifically [9,10]. Binding of NF-Y to promoters has been associated with both positive and negative histone post-translational modifications [4,11–15]. The NF-Y complex can thus act either as a transcriptional activator or as a repressor, and its activity can be modulated by interaction with other transcription factors (TFs) or regulatory proteins such as TFIID, SP1 or P53 [16–19]. The transcription activation domain of the complex is composed of glutamine-rich, hydrophobic domains, which are found both in the N-terminus of NF-YA and in the C-terminus of NF-YC [20]. In mammals, NF-Y is required to activate developmentally regulated genes, particularly during the progression of the cell cycle [1,21,22]. For example, NF-Y controls the activation of mitotic cyclins [18,23,24]. The role of NF-Y as a central regulator of cell proliferation and early development has been further demonstrated by a study that showed that inactivation of the *NF-YA* gene in transgenic mice leads to embryo lethality at early stages of development [25].

Compared with what is known about the structure and function of NF-Y in animals, our knowledge about NF-Y in plants is lagging some way behind. However, studies on plant *NF-Y* genes in model and crop plants are accumulating and suggest that these genes play a role in a wide range of processes. Whereas in animals each NF-Y subunit is encoded by a single gene, structural and functional diversification has occurred in plants, leading to the emergence of gene families comprising between eight and 39 members for each subunit. Gene duplication resulting from either whole genome duplications or single gene tandem duplications is a striking feature of plant genomes [26]. For some categories of genes, such as TFs, it has been suggested that more than 90% of the increase in gene numbers is a consequence of whole genome duplication events [27]. *NF-Y* genes are thus a good focus of study to better understand gene family expansion and diversification in the case of TF gene families in plants. To characterize the functional specialization events observed for some *NF-Y* copies in plants, we have performed a phylogenetic analysis of the three NF-Y protein families in four sequenced plant genomes (Figures 2–4). These include three plant species for which several expression and functional studies of *NF-Y* genes have been conducted, the monocot rice (*Oryza sativa*), the dicot *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), and two legumes, namely *Medicago truncatula* and soybean

Corresponding author: Niebel, A. (andreas.niebel@toulouse.inra.fr).

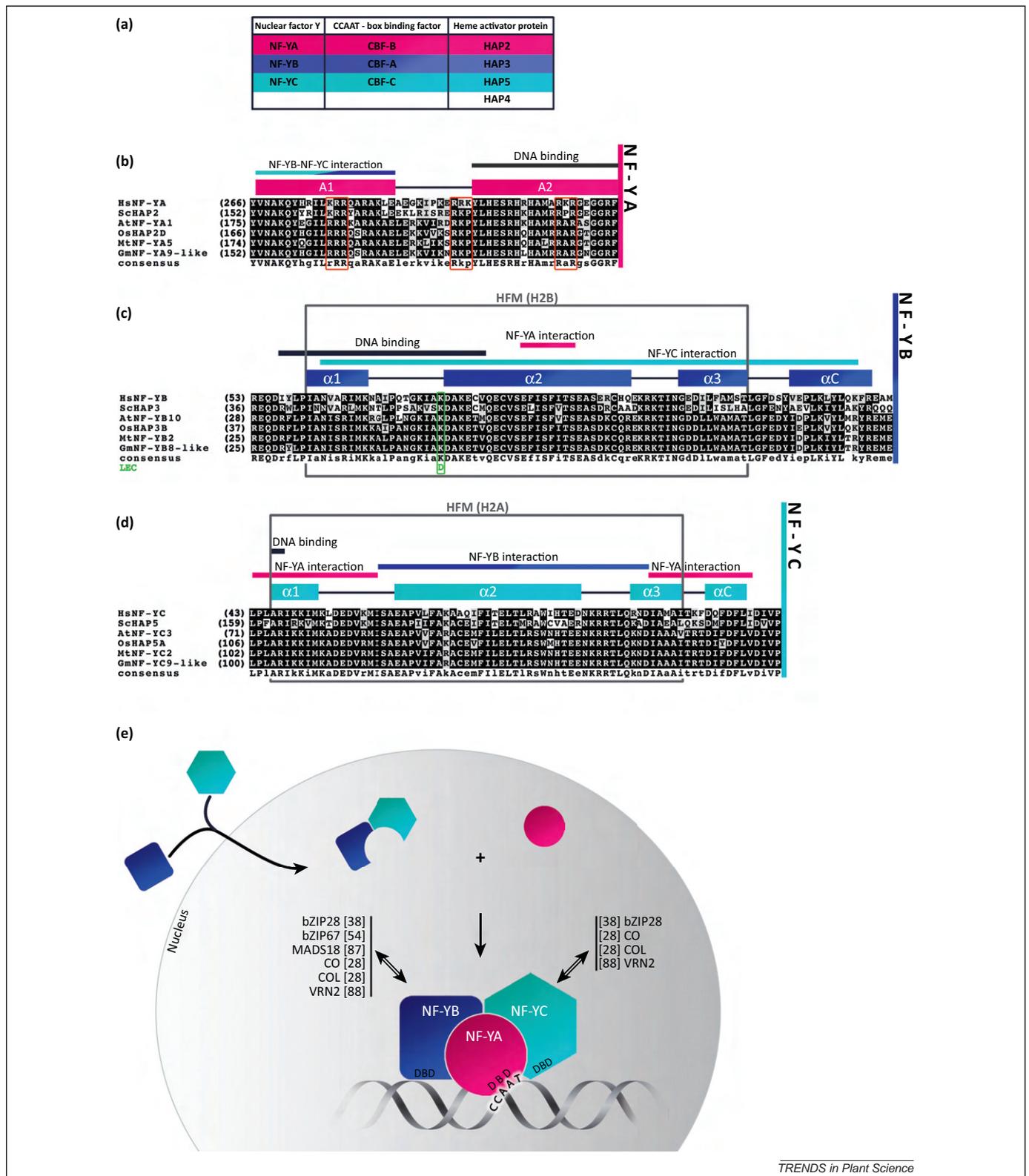


Figure 1. Hypothetical assembly of the NF-Y heterotrimer in plants and conserved domains of the three NF-Y subunits. (a) Nomenclature found for CCAAT-box binding factor encoding genes in the literature. (b) Amino acid alignment of conserved domains of NF-YA proteins from different organisms: Hs, *Homo sapiens*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; At, *Arabidopsis thaliana*; Os, *Oryza sativa* (rice); Mt, *Medicago truncatula*; Gm, *Glycine max* (soybean). For the plant NF-YA proteins, we used the *Arabidopsis* NF-YA closest to HsNF-YA: AtNF-YA1 and its closest homologs in rice, *M. truncatula* and soybean. Numbers between brackets correspond to the actual amino acid numbers within each protein. The NF-YA conserved region is composed of two alpha-helices [8,30,31]: A1 (indicated by cyan and blue bars) mediates the NF-YB-NF-YC interaction and A2 (black bar) is responsible for the CCAAT-binding. These two domains are highly conserved: there is about 80% amino acid identity between the protein interaction and the DNA binding domains of human NF-YA and plant NF-YAs. The three red boxes correspond to the three nuclear localization sequences collectively required for binding of HsNF-YA to the importin β [84]. (c), (d) Amino acid alignment of conserved domains of NF-YB and NF-YC proteins from *Arabidopsis*, rice, *M. truncatula* and soybean using the *Arabidopsis* NF-YB and NF-YC closest to HsNF-YB and Hs NF-YC: i.e., AtNF-YB10, AtNF-YC3, and their closest orthologs. Secondary structures (solid blue rectangles for alpha-helices and solid black lines for coils) are represented on the top of the alignment, based on [9]. The DNA-binding and subunit-binding domains are represented by black and colored bars, respectively [6,9,85,86]. A green box indicates the conserved lysine (K) that allows the conversion of a non-LEC1-type NF-YB into a LEC1-type NF-YB when changed into an aspartate [50]. (e) Localization and DNA binding of the NF-Y heterotrimer in plants. To date, there has been no in-depth study of the

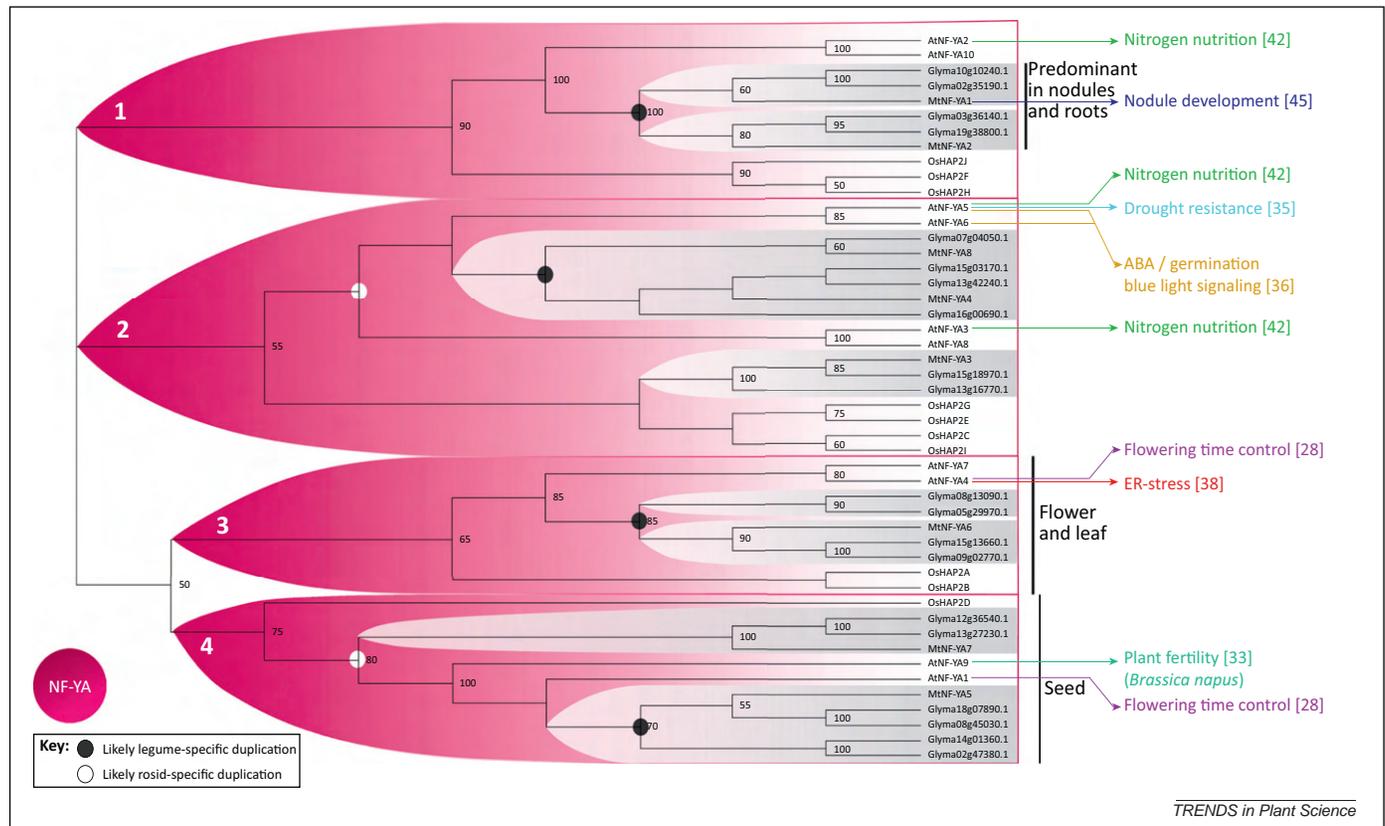


Figure 2. Phylogenetic relationships between NF-YA proteins from *Arabidopsis thaliana* (10 proteins), *Oryza sativa* (rice) (10 OsHAP2s), *Medicago truncatula* (8) and *Glycine max* (soybean) (20). Note that in soybean, the large number of NF-Y sequences (approximately double) can be explained by a recent whole-genome sequence duplication. The tree has been reconstructed using maximum likelihood under the general time-reversible model as implemented in the PhyML software [89], following protein-based alignment of full-length sequences using multiple sequence comparison by log-expectation (MUSCLE) [90]. Bootstrap support (based on 100 repetitions) is shown for each node (values < 50 are not shown). Reconciliation of the protein and species trees shows that all the genes most parsimoniously originated from four genes in the ancestor of the angiosperms (pink) and six genes in the ancestor of legumes (gray), corresponding to the most recent nodes containing genes from the species considered. The positions of likely rosid- and legume-specific gene duplications are indicated by white and black circles, respectively. Tissue expression for each gene comes from available microarray databases (*Medicago truncatula* Gene Expression Atlas, <http://mtgea.noble.org/v2/>; the Transcriptome Atlas of *Glycine max*, http://digbio.missouri.edu/soybean_atlas; the Rice XPro database, <http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/GGEP/index.html>; and *Arabidopsis* GENEVESTIGATOR Plant Biology, <https://www.geneinvestigator.com/gv/plant.jsp>), as well as published expression analysis studies. For all three NF-YA, NF-YB and NF-YC subunits, genes with either ubiquitous or more specialized expression patterns can be found. Interestingly, genes belonging to the legume subgroup of ancestral subgroup 1 have a specialized expression pattern, being predominantly expressed in nodules and roots, which correlate with the function identified for MtNF-YA1. In addition, most genes belonging to subgroups 3 and 4 have similar expression patterns, with strong expression mainly in flowers and leaves (subgroup 3), and seeds (subgroup 4) (indicated by vertical black bars). The colored arrows indicate the genes for which functional analyses have been performed using loss-of-function and overexpression experiments. References are indicated in square brackets. The *M. truncatula* protein sequences have been submitted to GenBank and the accession numbers corresponding to MtNF-YA1 to MtNF-YA8 are JQ918266 to JQ918273, respectively.

(*Glycine max*). This review summarizes our current knowledge concerning plant NF-Y genes and focuses on their structure and function from an evolutionary point of view, considering in particular why there are so many more NF-Y genes in plants compared to animals.

NF-YA subunits

Plant genes belonging to the NF-YA family encode putative TFs that are variable in length (e.g., 207–347 amino acids for *M. truncatula*) and, like their animal homologs, have no obvious similarity to other TF families, except that their DNA binding domain shares some homology with the CCT

domain of the nuclear flowering time regulator CONSTANS (CO) [28,29]. NF-YA proteins are characterized by two domains that are strongly conserved in all higher eukaryotes examined to date. Early work in yeast and mammalian systems, using amino acid substitutions within these conserved domains coupled to DNA binding and subunit interaction tests *in vitro*, elegantly defined a first domain (A1) of 20 amino acids forming a putative alpha helix that appears to be crucial for the interaction with NF-YB and NF-YC [8,30,31]. A second adjacent domain (A2) of 21 amino acids, separated from A1 by a conserved linker sequence, was shown to be required for specific DNA

NF-Y assembly in plants. However, it appears that, as in animals, plant NF-YA subunits are exclusively localized in the nucleus [38,82]. The subcellular localization of NF-YB is variable. Although AtHAP3b has been described as nuclear in leaf epidermal and root tip cells of *Arabidopsis* [55], other AtNF-YB subunits are predominantly accumulated in the cytoplasm [38,82], and their transport to the nuclei is mediated by their interactions with NF-YC subunits [82]. The cytoplasmic accumulation of AtNF-YB is different from that of mammalian NF-YBs, which shows a nuclear localization [10]. Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) experiments have predominantly shown NF-YB–NF-YC dimerizations in the nucleus, even though some fluorescent signal is present in the cytoplasm [82]. Together, these data strongly suggest that, as in mammals, a tight NF-YB–NF-YC heterodimer is assembled in the cytoplasm and is then translocated in the nucleus where the NF-YA subunit binds to it and is likely to provide the CCAAT-binding specificity. Nevertheless, it has been proposed that plant NF-Y proteins could also bind CCAAT-box-free sequences when the NF-YA subunit is replaced by other TFs [87]. Arrows point from the NF-Y subunits towards the names of TFs for which an interaction has been demonstrated [28,38,54,87,88].

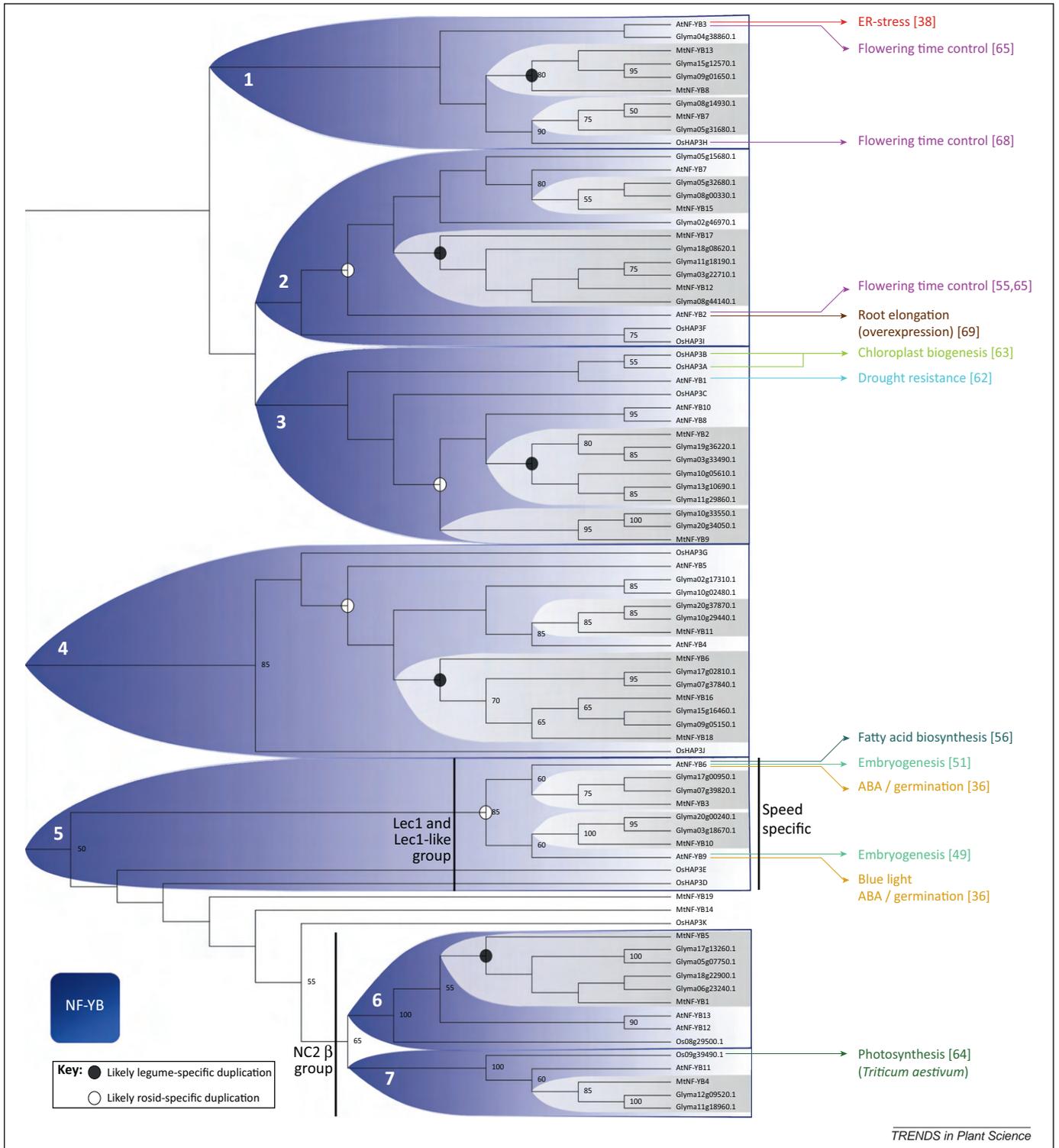


Figure 3. Phylogenetic relationships between NF-YB proteins from *Arabidopsis thaliana* (13 proteins), rice (*Oryza sativa*) (12 OsHAP3s), *Medicago truncatula* (19) and soybean (*Glycine max*) (39). The same approach has been used as that for the NF-YA tree (Figure 2). All the NF-YB genes are likely to have originated from a total of six genes in the angiosperm ancestor (blue). The developmental processes for which functional data are available are shown with colored arrows as in Figure 2. It has been suggested that there are two types of NF-YB genes: (i) The *LEC1*-type, which includes *LEC1* and *L1L* genes and is composed of genes exclusively expressed during seed development, and for which a clear role during *Arabidopsis* embryogenesis has been shown; and (ii) the non-*LEC1*-type NF-YBs, which comprise four subgroups. Most of these genes have ubiquitous expression patterns in different plant organs, and several have been implicated in more than one biological process, as has been shown, for example, for AtNF-YB2, which plays a role in flowering time control and root elongation. This suggests a more general role for these NF-YBs. We decided to include two more divergent subgroups (6 and 7) in this tree, composed of proteins that share significant amino acid homology (~30% identity) with both NF-YB and NC2β proteins. In animals, the NC2β proteins are transcriptional repressors of the TATA-binding protein (TBP); they contain histone-fold domains and act in complexes with NC2α proteins that share similarities with the NF-YC subunits [4,91]. No interaction has been observed in yeast between NF-YC proteins and *Arabidopsis* proteins from these NC2 groups [82], suggesting that they might be functionally different from the other NF-YBs. The accession numbers corresponding to MtNF-YB1–MtNF-YB19 are JQ918274–JQ918292, respectively.

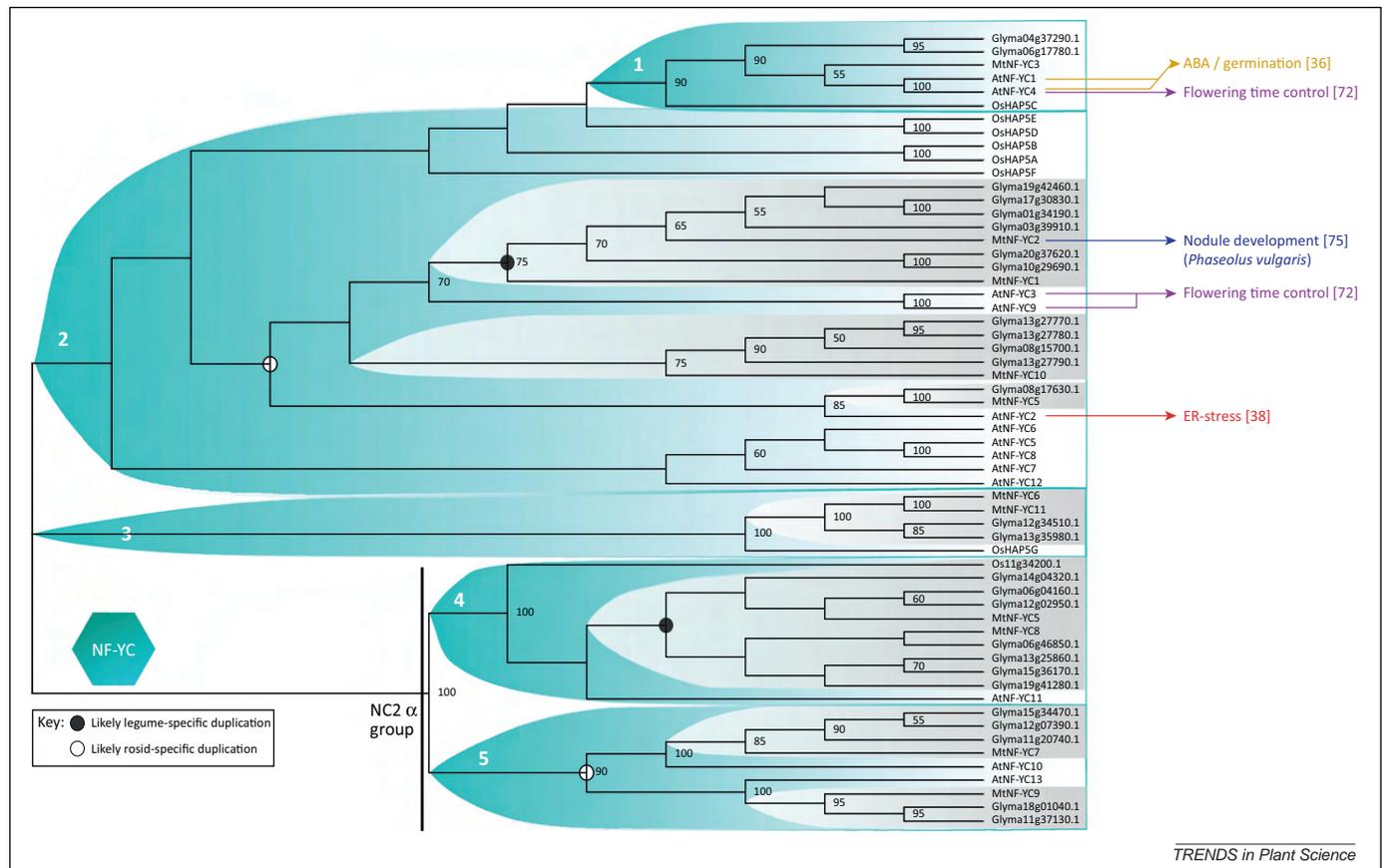


Figure 4. Phylogenetic relationships between NF-YC proteins from *Arabidopsis thaliana* (13 proteins), *Oryza sativa* (rice) (8 OsHAP3s), *Medicago truncatula* (11) and *Glycine max* (soybean) (27). The same approach as that for the NF-YA and NF-YB trees has been used (Figures 2 and 3). All the NF-YC genes probably originated from a total of seven genes in the angiosperm ancestor (cyan). As is the case for the non-*LEC1*-type NF-YBs, there is no clear correlation between the phylogenetic position of NF-YCs and their tissular expression. Several of these genes have ubiquitous expression patterns, even though some have been implicated in specific biological processes (colored arrows) such as AtNF-YC1 and AtNF-YC4. As in Figure 3, we included two more divergent subgroups in this tree composed of proteins that share significant similarities with both NF-YC and NC2 α proteins [4,91] (see legend of Figure 3). With the exception of AtNF-YC11, which was shown to interact with only one NF-YB subunit (AtNF-YB3) in yeast, the other *Arabidopsis* members of this NC2 group do not interact with any AtNF-YB, not even those belonging to the NC2 β group, suggesting a difference in the way these proteins could function in animals and plants. Clearly, more work needs to be done on the NC2 subgroup of NF-Y proteins to better understand their role in plants. The accession numbers corresponding to MtNF-YC1–MtNF-YC11 are JQ918293–JQ918303, respectively.

binding to CCAAT boxes. Given the high conservation of these two domains across kingdoms (Figure 1), it is highly likely that plant NF-YA proteins have maintained the basic characteristics of their mammalian homologs such as heterotrimer formation with NF-YB and NF-YC proteins and subsequent binding to CCAAT boxes in promoters. Outside these conserved domains, plant NF-YA proteins are variable in length and structure. These conserved domains are situated at the C-terminus of the protein in mammals whereas they occupy a more central position in plant NF-YAs. The N-terminus is acidic in plants, as in animals; however, the Q-rich region, hypothesized to be the transcription activation domain in animals [20], appears to be less pronounced in plants (not shown in Figure 1).

The first plant NF-YA subunit to be reported was identified in canola (*Brassica napus*) in 1995 [32]. A follow-up study in canola demonstrated that expressing a full-length antisense construct of this BnCBF (CBF-B subunit; the closest homolog in *Arabidopsis* is AtNF-YA9) under the control of a tapetum-specific promoter leads to the degeneration of tapetum cells and locules and, hence, affects pollen viability [33]. The MtNF-YA1 gene (originally MtHAP2-1) identified in *M. truncatula* is highly expressed

in the nodule distal infection and meristematic zone; silencing of MtNF-YA1 by RNA interference (RNAi) leads to strongly impaired nodule meristem function and, hence, nodule development, without affecting other visible processes in transgenic roots [34]. This is a striking example of the specialization of a NF-YA subunit that has evolved to regulate the development of a facultative root organ that is only present in leguminous plants. Interestingly, this gene belongs to a legume subgroup of the ancestral group 1, which only contains genes predominantly expressed in nodule and root tissues (Figure 2). Therefore, one can reasonably speculate that other NF-YA genes belonging to this subgroup may also play roles in nodule or root development. More recently, AtNF-YA5 was shown to be upregulated during drought stress and in response to abscisic acid (ABA) in roots and leaves of *Arabidopsis* [35]. An *Atnf-ya5* loss-of-function mutant is hypersensitive to drought stress, whereas overexpression improves drought resistance, possibly by regulating the expression of stress-responsive genes, which have been identified by a microarray analysis. The same AtNF-YA5 subunit has been implicated in a signal transduction pathway shared by both blue light and ABA, leading to light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein expression in etiolated

seedlings [36]. Indeed, insertion mutants in *AtNF-YA5* no longer respond to blue light and appear hypersensitive to ABA in seed germination assays. Here again a plant NF-YA subunit is specialized to function in several ABA-dependent signaling pathways.

Recently an *Arabidopsis* NF-YA subunit (*AtNF-YA4*) has been implicated in the unfolded protein response (UPR), an endoplasmic reticulum (ER) stress mechanism induced by the accumulation of misfolded proteins in the ER that leads to a decreased rate of protein translation to prevent further accumulation of unfolded proteins [37]. The basic domain-leucine zipper (bZIP) TF *AtbZIP28*, which mediates a large part of the transcriptional response to ER-stress, has recently been shown to interact with *AtNF-YA4* in yeast, *in vitro* and *in planta* (using bimolecular fluorescence complementation technology), in association with *AtNF-YB3* and *AtNF-YC2* [38]. In addition, electrophoretic mobility shift assays (EMSA) have shown that even if the *AtbZIP28* binds to the ER-stress-responsive element (ERSE) in ER-stress-responsive promoters on its own, a different complex is formed in the presence of *AtNF-YA4*, *AtNF-YB3* and *AtNF-YC2*. Together with the fact that the presence of this NF-Y complex enhances the transcriptional response of a downstream target, these data led to the speculation that the NF-Y complex would function as a stabilizing enhancer of *bZIP28* during the ER-stress response. Interestingly, in cultured mouse myocytes, ER-stress mediated promoter activation of the *PDIA6* gene also requires an ERSE element associated with a nearby CCAAT-box [39], a striking example of a conserved regulatory mechanism involving NF-Y across kingdoms.

Besides its transcriptional regulation, illustrated by the diversity and sometimes the specificity of gene expression patterns, the NF-YA family of TFs is also known to be regulated post-transcriptionally, in particular by the microRNA169 family, which is present in all higher plants studied to date. In *M. truncatula*, *MtNF-YA1* has been shown to be negatively regulated by miR169 [34]. Indeed, a miR169-encoding gene (*MtmiR169a*) that modulates the expression of *MtNF-YA1* spatially and temporally has been identified and this modulation is important for correct nodule development. miR169 overexpression experiments in *Arabidopsis* [35], where *AtmiR169a* mainly targets *AtNF-YA5*, led to increased drought sensitivity, which contrasts with results obtained in tomato (*Solanum lycopersicum*), where drought tolerance was achieved [40]. In subsequent studies, miR169 and NF-YA subunits were proposed to play an additional role in mineral nutrition and in particular in the nitrogen-starvation response. Indeed, miR169 expression was shown to be repressed in the case of phosphate and nitrogen starvation [41,42]. In addition, overexpression of this miR in *Arabidopsis* led to reduced expression of *AtNFYA3*, *AtNFYA5*, *AtNFYA8* and *AtNFYA2* and, as a consequence, these plants showed an altered nitrogen response. Given that several NF-YA-encoding genes are affected, it is not possible to assign this role to a particular NF-YA subunit; however, the abovementioned NF-YA genes are relatively close phylogenetically. Finally, miR169 has been shown to repress C-class activity during flower development in *Petunia* and

Antirrhinum, probably by fine-tuning NF-YA genes in the outer floral whorls [43]. The miR169 family is one of the largest micro-RNA families known in plants, with 14 members described in *Arabidopsis* (MiRBase, <http://www.mirbase.org>). One cannot exclude that miR169 regulates the expression of genes other than those coding for NF-YA via post-transcriptional and/or translational control. However, to date, NF-YA-encoding genes are the only demonstrated targets for this micro-RNA; to fully understand the complex set of interactions between different members of the miR169 and NF-YA families will be challenging.

As in animal systems [4,44], the NF-YA gene family in plants is regulated by alternative splicing [32,45]. In *M. truncatula*, as nodule development proceeds, an increasing proportion (up to 50%) of *MtNF-YA1* transcripts are alternatively spliced at their first intron, situated in the 5' leader sequence. This leads to the production, via an upstream open reading frame (uORF) called uORF1, found within this first intron, of uORF1p, a small 62-amino acid peptide that has been shown to negatively modulate *MtNF-YA1* expression using a mechanism complementary to miR169 [45]. With the exception of *AtNF-YA9*, which has an intron right after the translation start codon, and *MtNF-YA7*, all NF-YA genes we examined have an intron in the 5' leader sequence, suggesting a putative conserved regulation mechanism among most plant NF-YA-encoding genes. However, no uORF showing significant homology to uORF1 has been identified outside *MtNF-YA1*.

NF-YB subunits

Plant NF-YB proteins are also variable in length but on average smaller than NF-YAs (e.g., 90–240 amino acids in *M. truncatula*). They are characterized by a central domain that has structural and amino acid similarity with the histone fold motif (HFM) of the core histone H2B [4]. This motif is composed of three alpha-helices separated by two beta strand-loop domains. It is involved in both protein-DNA and protein-protein interactions, and is found in different DNA metabolism proteins [46,47]. In addition, a fourth alpha helix (referred to as alpha C) is present next to the HFM motif (Figure 1).

Unlike NF-YA, no clear correlation has been observed between expression patterns and the phylogenetic classification of NF-YB genes into six ancestral groups, with the marked exception of the *LEAFY COTYLEDON 1* (*LEC1*) group of genes, which contains only seed-specific genes (Figure 3). This group, apparently already diverged from non-*LEC1*-type NF-YB genes in non-seed vascular plants and was then recruited into a seed-specific regulatory network [48]. The *Arabidopsis LEC1* gene has pleiotropic functions during late stages of embryogenesis [49]. In addition, ectopic expression of this seed-specific gene leads to the expression of embryo-specific genes and the development of embryo-like structures in vegetative tissues, suggesting that *LEC1* (*AtNF-YB9*) is a key regulator of embryo development. Subsequently, domain-swap experiments and site-directed mutagenesis have nicely shown that a single amino acid change in the HFM, from an aspartate to a lysine at position 55, allows a non-*LEC1* gene to complement the *lec1* mutation [50] (shown in

Figure 1. Since this study, numerous reports have been published concerning *LEC1* and the related *LEC1-like* gene (*L1L*; *AtNF-YB6*), making these genes the best-studied *NF-Y* genes in plants, and clearly showing that these two genes play essential yet complementary roles during embryo development [51–53]. In addition, insertion mutants in *LEC1* and *L1L* appear to be hypersensitive to ABA [36]. *LEC1* and *L1L* activate the promoters of seed maturation-specific genes by interacting with ABA-responsive element binding factors such as bZIP67, in association with *AtNF-YA5* and possibly *AtNF-YC9*, which implicates *NF-Y* in ABA signaling in *Arabidopsis* [54]. Furthermore, using insertion mutants and overexpressing plants, it has been shown that *L1L* can regulate flowering time, probably by regulating flowering regulators such as FLOWERING LOCUS T (*FT*) and SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (*SOC1*) [55]. A link between *LEC1*, *L1L* and fatty acid synthesis has also been demonstrated both in *Arabidopsis* and in canola. Early experiments using constitutive promoters (35S) have led to dramatically increased levels of fatty acids and to strong pleiotropic phenotypes, including lethality [56]. Overexpression of WRINKLED1 (*WRI1*), a downstream TF uncoupling fatty acid synthesis and these undesirable side effects in maize (*Zea mays*) [57], or the use of a seed-specific promoter, made it possible to circumvent this problem, and led to the upregulation of fatty acid synthesis genes and, hence, increased fatty acid seed content in canola by up to 20% [58]. Interestingly, *NF-Y* also controls the expression of fatty acid synthesis genes in mammals [59–61], another striking example of functional conservation despite the evolutionary distance between the two systems.

Non-*LEC1* members of the *NF-YB* family of plant regulators have also been studied. *Arabidopsis* plants overexpressing *AtNF-YB1* have increased tolerance to drought stress compared with wild type [62], as shown for *AtNF-YA5* [35]. When the orthologous maize gene *ZmNF-YB2* was overexpressed, drought tolerance was also observed, leading to a significant increase in grain yield under water-limiting conditions. *NF-YB* genes have also been associated with chloroplast biosynthesis and photosynthesis. Indeed, in rice, an RNAi construct silencing *OsHAP3A*, *OsHAP3B* and *OsHAP3C* resulted in reduced accumulation of nuclear-encoded photosynthesis transcripts, such as the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase and chlorophyll *a/b*-binding protein, and degenerated chloroplasts [63]. In wheat (*Triticum aestivum*), overexpression of *TaNF-YB3*, a gene upregulated by light, led to a significant increase in the leaf chlorophyll content and photosynthesis [64]. Overexpression experiments in addition showed that *NF-YB2* and *NF-YB3*, from both *Arabidopsis* and barley (*Hordeum vulgare*) play comparable and additive roles in the promotion of flowering in *Arabidopsis*, in particular for *AtNF-YB2* and *AtNF-YB3*, by binding to the *FT* promoter – as a trimer associated with the yeast HEME ACTIVATOR PROTEIN 2 (*HAP2*) and *HAP3* proteins [65,66]. A recent follow-up study then showed that by overexpressing a fusion of either *AtNF-YB2* or *AtNF-YB3* with EDLL, a new powerful transcription activation domain, early flowering was obtained in wild type *Arabidopsis* and even in a *CONSTANS*-deficient mutant [67].

Similarly, the natural mutation of *OsHAP3H* (*DTH8*) weakens photoperiod sensitivity and decreases plant height. Under natural conditions, *OsHAP3H* suppresses flowering by downregulating two regulators of flowering time: *Ehd1* (early heading date 1) and *Hd3a* (heading date 3a) [68]. Finally, overexpression of *AtNF-YB2* (*AtHAP3b*), a gene that is weakly expressed in the root elongation zone, enhances primary root elongation [69].

NF-YC subunits

NF-YC proteins are, on average, of intermediate size between *NF-YA* and *NF-YB* proteins (117–292 amino acids in *M. truncatula*). Like *NF-YB* proteins, *NF-YC* proteins are also characterized by an HFM domain, but they are more closely related to the core histone H2A [4]. The first isolation of a plant *NF-YC* homolog (*AtNF-YC2*) was achieved by screening an *Arabidopsis* expression library with a functionally important promoter region of the spinach (*Spinacia oleracea*) photosynthesis gene *AtpC*, and showing that this binding was regulated by light and cytokinin [70]. A few years later, two parallel studies reported on the identification of *NF-YC*-encoding genes following yeast two-hybrid screens using either the tomato flowering time regulator *CONSTANS-like1* (*TCOL1*) [71] or a conserved domain of CO called CCT (for *CONSTANS*, *CONSTANS-LIKE*, *TOC1: 23* amino acids) in *Arabidopsis* [28]. These studies led to the isolation of the tomato *HAP5a* (*THAP5a*) and *THAP5c* genes (whose closest homologs in *Arabidopsis* are *AtNF-YC1* and *AtNF-YC9*), and *AtNF-YC1*, *AtNF-YC2* and *AtNF-YC3* (as well as *AtNF-YB1*), respectively. These interactions were confirmed both *in vitro* and *in planta*. Overexpression of *THAP5a* in *Arabidopsis* led to earlier flowering. It has been proposed that proteins containing CCT domains, which share essential amino acids with the DNA-binding domain of *NF-YA*, could replace *NF-YA* proteins within *NF-Y* complexes and thereby act as TFs [28]. A recent study has shown that *AtNF-YC3*, *AtNF-YC4*, and *AtNF-YC9* bind to CO and are additively important for the function of CO as a regulator of flowering time via transcriptional activation of *FT* [72]. Furthermore, the authors of this study put forward the alternative hypothesis that CO would interact with the entire trimeric *NF-Y* complex. This was substantiated by a report showing that CO can bind the promoter of *FT*, and activates transcription via its CCT domain outside of CCAAT boxes, but that the presence of *NF-Y* and CCAAT boxes potentiates CO-mediated gene activation [73]. Indeed CO would provide its transcription activation activity to the *NF-Y* trimer, an activity that can be replaced, in a *co* mutant, by the EDLL activation domain, when fused to *AtNF-YB2* or *AtNF-YB3* [67]. Beyond flowering time control, a common bean (*Phaseolus vulgaris*) *NF-YC* gene has been shown to be involved in the preferential symbiotic interaction between a Mesoamerican bean cultivar and cognate strains [74], following a suppressive subtractive hybridization (SSH) approach. In a follow-up study using overexpression and RNAi experiments, *PvNF-YC1* has been shown to positively regulate nodule development, possibly via the activation of G2-M cell cycle genes [75]. *PvNF-YC1* also has a positive influence on the infection process of bean roots

by symbiotic *Rhizobia*, thereby providing some clues as to how PvNF-YC1 could act in symbiotic partner selection.

The expression of a *NF-YC* gene has been shown to be upregulated in the germinating pollen tubes of spruce (*Picea wilsoni*) [76]. A transient overexpression strategy using particle bombardment of pollen grains altered pollen tube growth, suggesting that this gene has a possible role in this process. Finally, five wheat *NF-YC* genes (*TaNF-YC5*, *TaNF-YC8*, *TaNF-YC9*, *TaNF-YC11*, and *TaNF-YC12*) have been shown to be upregulated by light, and one gene in particular, *TaNF-YC11*, co-regulated with photosynthesis genes [77].

NF-Y complexes

One of the obvious consequences of the many NF-Y subunit-encoding genes in plants is the amazing diversity of potential combinations of trimeric complexes compared with those in animal systems. In *Arabidopsis*, for example, 36 NF-Y TF subunits (10 NF-YA, 13 NF-YB, and 13 NF-YC subunits) have been identified and could theoretically combine to form 1690 unique complexes. Although some *NF-Y* genes are expressed in most tissues examined, many others have quite specific expression patterns [3,78–81] (Figures 2–4), thereby already reducing the number of potential NF-Y complexes. Furthermore, interactions between NF-Y subunits appear to be partially specific in plants. Indeed, using yeast two-hybrid assays complemented by *in vitro* pull-down assays, a ubiquitously expressed NF-YB subunit of rice (OsHAP3A) has been shown to only interact with two of eight OsNF-YA subunits and six of ten OsNF-YC subunits [80]. In addition, using yeast three-hybrid assays, AtNF-YA4 has been shown to interact with AtNF-YC2 but not with AtNF-YC4 in the presence of AtNF-YB2, AtNF-YB3, AtNF-YB4 or AtNF-YB5 [38]. A complete two-by-two interactome experiment was recently performed using the yeast two-hybrid system to test all potential pairwise interactions ($36 \times 36 = 1296$) among *Arabidopsis* NF-Y proteins [82]. Less than 10% of all possible interactions could be confirmed in both directions in yeast. Nevertheless, this figure is biased by the fact that interactions between NF-YA and NF-YB subunits are usually not possible in the absence of the NF-YC subunit and because the divergent NC2 α and NC2 β (Figures 3 and 4) have been included in this study. In addition, one should be careful when drawing strong conclusions from studies in heterologous or *in vitro* expression systems about interaction specificities inside such a complex. However, taken together, the abovementioned results point towards some degree of interaction specificity between NF-Y members.

Despite these restrictions, the heterotrimeric NF-Y complex in plants remains a highly modular TF complex, and is likely to have evolved to regulate many different pathways.

Concluding remarks and perspectives

Functional analyses have shown that several NF-Y-encoding genes in plants have, during the course of evolution, acquired specific functions in diverse processes such as embryo development, flowering time control, ER-stress, drought stress, and nodule and root development (Figures 2–4). Given the number and diversity of plant NF-Y-encoding genes, it seems likely that the abovementioned

examples represent only the tip of the iceberg and that the implication of these three NF-Y families of TFs in many developmental or plant–microbe interaction-related processes still remains to be understood. The functional specialization of *NF-Y* genes is the result of several complementary mechanisms. First, expression analysis in different plants has revealed that both ubiquitous and more specialized expression patterns co-exist, suggesting that promoter diversification plays an important role. There are several striking examples of conserved expression patterns linked to functional specialization within evolutionarily related *NF-YA* and *NF-YB* genes (Figures 3 and 4). It is interesting to note that such specificities are found for *NF-YA* genes, even though they seem to have evolved less asymmetrically compared with *NF-YB* and *NF-YC* genes [83]. Specialization has also been described at the protein level, which is illustrated by the role of key amino acids, functionally differentiating LEC1 from non-LEC1 NF-YBs (Figure 1). However, this area is poorly documented, and many protein domain-swapping experiments and detailed structure–function analyses need to be performed to understand the importance of key protein domains and amino acids within conserved domains. In addition, several reports have demonstrated that certain NF-Y subunits interact with almost all potential partners, whereas others have more narrow interaction specificities, at least in yeast. Furthermore, some of the most ‘promiscuous’ subunits, such as AtNF-YC3, AtNF-YC6, and AtNF-YC9, also show rather ubiquitous expression patterns. It would therefore be of considerable interest to know whether different NF-Y complexes bind CCAAT boxes with different affinities, or bind preferentially to specific sequences flanking these CCAAT boxes. The last layer of specialization concerns the ability of NF-Y subunits to specifically interact with other TFs, thereby controlling specific pathways. It has been suggested that the fourth alpha helix of the conserved domains of NF-YB and NF-YC (called α C) in animals could be involved in interactions with other partners [9]. It would be interesting in the future to identify the domains within NF-Y subunits that contribute to this specific interaction with other TFs.

Our vision of the function of plant NF-Y TFs is probably limited by the complexity and modularity of the system and the relatively modest amount of functional data available to date. However, the emerging picture is that at least two classes of plant NF-Y proteins exist. The first of these would have more general functions, be expressed in several tissues or under different physiological conditions, and participate in many TF complexes with NF-Y and other partners. The second would have acquired more-specific expression patterns and/or functions and play key roles in precise pathways, possibly by interacting with specific sets of TFs.

Acknowledgments

We thank David Barker and Fernanda de Carvalho-Niebel for critical reading of the manuscript and Sébastien Carrere and Jérôme Gouzy for their help in the identification of all NF-Y-encoding genes from *M. truncatula*. Information on *M. truncatula* NF-Y gene structure and expression was partly generated in the frame of the ‘SYMBIMICS’ ANR program. This work was funded by the ‘HAPIHUB’ ANR project. Tom Laloum is funded by a grant from the French Ministry of Education and

Research. Maël Baudin is funded by an INRA CJS (Contrat Jeune Scientifique) contract. This work is part of the 'Laboratoire d'Excellence' (LABEX) entitled TULIP (ANR-10-LABX-41).

References

- Mantovani, R. (1999) The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* 239, 15–27
- Forsburg, S. and Guarente, L. (1989) Identification and characterization of HAP4 – a 3rd component of the CCAAT-bound HAP2 HAP3 heteromer. *Genes Dev.* 3, 1166–1178
- Siefers, N. *et al.* (2009) Tissue-specific expression patterns of *Arabidopsis* NF-Y transcription factors suggest potential for extensive combinatorial complexity. *Plant Physiol.* 149, 625–641
- Dolfini, D. *et al.* (2012) NF-Y and the transcriptional activation of CCAAT promoters. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 47, 29–49
- Matuoka, K. and Chen, K. (2002) Transcriptional regulation of cellular ageing by the CCAAT box-binding factor CBF/NF-Y. *Ageing Res. Rev.* 1, 639–651
- Sinha, S. *et al.* (1996) Three classes of mutations in the A subunit of the CCAAT-binding factor CBF delineate functional domains involved in the three-step assembly of the CBF-DNA complex. *Mol. Cell. Biol.* 16, 328–337
- Maity, S.N. and de Crombrughe, B. (1996) Purification, characterization, and role of CCAAT-binding factor in transcription. *Methods Enzymol.* 273, 217–232
- Xing, Y. *et al.* (1993) Mutations in yeast HAP2/HAP3 define a hybrid CCAAT box-binding domain. *EMBO J.* 12, 4647–4655
- Romier, C. *et al.* (2003) The NF-YB/NF-YC structure gives insight into DNA binding and transcription regulation by CCAAT factor NF-Y. *J. Biol. Chem.* 278, 1336–1345
- Frontini, M. *et al.* (2004) Cell cycle regulation of NF-YC nuclear localization. *Cell Cycle* 3, 217–222
- Ceribelli, M. *et al.* (2008) The histone-like NF-Y is a bifunctional transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 28, 2047–2058
- Donati, G. *et al.* (2008) An NF-Y-dependent switch of positive and negative histone methyl marks on CCAAT promoters. *PLoS ONE* 3, e2066
- Carette, G. *et al.* (1999) NF-Y associates with H3-H4 tetramers and octamers by multiple mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 19, 8591–8603
- Gatta, R. and Mantovani, R. (2008) NF-Y substitutes H2A-H2B on active cell-cycle promoters: recruitment of CoREST-KDM1 and fine-tuning of H3 methylations. *Nucleic Acids Res.* 36, 6592–6607
- Gatta, R. and Mantovani, R. (2011) NF-Y affects histone acetylation and H2A.Z. deposition in cell cycle promoters. *Epigenetics* 6, 527–535
- Coustry, F. *et al.* (1998) The two activation domains of the CCAAT-binding factor CBF interact with the dTAF(II)110 component of the *Drosophila* TFIID complex. *Biochem. J.* 331, 291–297
- Wright, K. *et al.* (1995) Major histocompatibility complex class II-associated invariant chain gene-expression is up-regulated by cooperative interactions of SP1 and NF-Y. *J. Biol. Chem.* 270, 20978–20986
- Di Agostino, S. *et al.* (2006) Gain of function of mutant p53: The mutant p53/NF-Y protein complex reveals an aberrant transcriptional mechanism of cell cycle regulation. *Cancer Cell* 10, 191–202
- Benatti, P. *et al.* (2008) A balance between NF-Y and p53 governs the pro- and anti-apoptotic transcriptional response. *Nucleic Acids Res.* 36, 1415–1428
- Coustry, F. *et al.* (1996) The transcriptional activity of the CCAAT-binding factor CBF is mediated by two distinct activation domains, one in the CBF-B subunit and the other in the CBF-C subunit. *J. Biol. Chem.* 271, 14485–14491
- Mantovani, R. (1998) A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. *Nucleic Acids Res.* 26, 1135–1143
- Hu, Q. *et al.* (2006) Inhibition of CBF/NF-Y mediated transcription activation arrests cells at G(2)/M phase and suppresses expression of genes activated at G(2)/M phase of the cell cycle. *Nucleic Acids Res.* 34, 6272–6285
- Korner, K. *et al.* (2001) Cell cycle regulation of the murine cdc25B promoter – essential role for nuclear factor-Y and a proximal repressor element. *J. Biol. Chem.* 276, 9662–9669
- Gurtner, A. *et al.* (2008) NF-Y dependent epigenetic modifications discriminate between proliferating and postmitotic tissue. *PLoS ONE* 3, e2407
- Bhattacharya, A. *et al.* (2003) The B subunit of the CCAAT box binding transcription factor complex (CBF/NF-Y) is essential for early mouse development and cell proliferation. *Cancer Res.* 63, 8167–8172
- Lawton-Rauh, A. (2003) Evolutionary dynamics of duplicated genes in plants. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29, 396–409
- Maere, S. *et al.* (2005) Modeling gene and genome duplications in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 5454–5459
- Wenkel, S. *et al.* (2006) CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 2971–2984
- Distelfeld, A. *et al.* (2009) Genetic and molecular characterization of the VRN2 loci in tetraploid wheat. *Plant Physiol.* 149, 245–257
- Mantovani, R. *et al.* (1994) Dominant-negative analogs of NF-YA. *J. Biol. Chem.* 269, 20340–20346
- Xing, Y. *et al.* (1994) Subunit interaction in the CCAAT-binding heteromeric complex is mediated by a very short alpha-helix in HAP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 3009–3013
- Albani, D. and Robert, L.S. (1995) Cloning and characterization of a *Brassica napus* gene encoding a homologue of the B subunit of a heteromeric CCAAT-binding factor. *Gene* 167, 209–213
- Levesque-Lemay, M. *et al.* (2003) Expression of CCAAT-binding factor antisense transcripts in reproductive tissues affects plant fertility. *Plant Cell Rep.* 21, 804–808
- Combiere, J.-P. *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
- Li, W. *et al.* (2008) The *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell* 20, 2238–2251
- Warpeha, K.M. *et al.* (2007) The GCR1, GPA1, PRN1, NF-Y signal chain mediates both blue light and abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 143, 1590–1600
- Liu, J. and Howell, S. (2010) Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants. *Plant Cell* 22, 2930–2942
- Liu, J.-X. and Howell, S.H. (2010) bZIP28 and NF-Y transcription factors are activated by ER stress and assemble into a transcriptional complex to regulate stress response genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22, 782–796
- Vekich, J.A. *et al.* (2012) Protein disulfide isomerase-associated 6 is an ATF6-inducible ER stress response protein that protects cardiac myocytes from ischemia/reperfusion-mediated cell death. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 53, 259–267
- Zhang, X. *et al.* (2011) Over-expression of microRNA169 confers enhanced drought tolerance to tomato. *Biotechnol. Lett.* 33, 403–409
- Hsieh, L. *et al.* (2009) Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in *Arabidopsis* by deep sequencing. *Plant Physiol.* 151, 2120–2132
- Zhao, M. *et al.* (2011) Involvement of miR169 in the nitrogen-starvation responses in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 190, 906–915
- Cartolano, M. *et al.* (2007) A conserved microRNA module exerts homeotic control over *Petunia hybrida* and *Antirrhinum majus* floral organ identity. *Nat. Genet.* 39, 901–905
- Ceribelli, M. *et al.* (2009) NF-YC complexity is generated by dual promoters and alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 284, 34189–34200
- Combiere, J.P. *et al.* (2008) Trans-regulation of the expression of the transcription factor MtHAP2-1 by a uORF controls root nodule development. *Genes Dev.* 22, 1549–1559
- Arents, G. and Moudrianakis, E. (1993) Topography of the histone octamer surface – repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 10489–10493
- Baxevas, A. *et al.* (1995) A variety of DNA-binding and multimeric proteins contain the Histone Fold Motif. *Nucleic Acids Res.* 23, 2685–2691
- Xie, Z. *et al.* (2008) Duplication and functional diversification of HAP3 genes leading to the origin of the seed-developmental regulatory gene, *LEAFY COTYLEDON1 (LEC1)*, in nonseed plant genomes. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1581–1592
- Lotan, T. *et al.* (1998) *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* 93, 1195–1205
- Lee, H.S. *et al.* (2003) *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 represents a functionally specialized subunit of the CCAAT binding transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2152–2156

- 51 Kwong, R.W. *et al.* (2003) LEAFY COTYLEDON1-LIKE defines a class of regulators essential for embryo development. *Plant Cell* 15, 5–18
- 52 Casson, S.A. and Lindsey, K. (2006) The turnip mutant of *Arabidopsis* reveals that LEAFY COTYLEDON1 expression mediates the effects of auxin and sugars to promote embryonic cell identity. *Plant Physiol.* 142, 526–541
- 53 Braybrook, S.A. and Harada, J.J. (2008) LECs go crazy in embryo development. *Trends in Plant Sci.* 13, 624–630
- 54 Yamamoto, A. *et al.* (2009) *Arabidopsis* NF-YB subunits LEC1 and LEC1-LIKE activate transcription by interacting with seed-specific ABRE-binding factors. *Plant J.* 58, 843–856
- 55 Cai, X. *et al.* (2007) A putative CCAAT-binding transcription factor is a regulator of flowering timing in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 145, 98–105
- 56 Mu, J. *et al.* (2008) LEAFY COTYLEDON1 is a key regulator of fatty acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 148, 1042–1054
- 57 Shen, B. *et al.* (2010) Expression of ZmLEC1 and ZmWRI1 increases seed oil production in maize. *Plant Physiol.* 153, 980–987
- 58 Tan, H. *et al.* (2011) Enhanced seed oil production in canola by conditional expression of *Brassica napus* LEAFY COTYLEDON1 and LEC1-LIKE in developing seeds. *Plant Physiol.* 156, 1577–1588
- 59 Rangan, V. *et al.* (1996) Identification of an inverted CCAAT box motif in the fatty-acid synthase gene as an essential element for mediation of transcriptional regulation by cAMP. *J. Biol. Chem.* 271, 2307–2312
- 60 Roder, K. *et al.* (1997) NF-Y binds to the inverted CCAAT box, an essential element for cAMP-dependent regulation of the rat fatty acid synthase (FAS) gene. *Gene* 184, 21–26
- 61 Schweizer, M. *et al.* (2002) Transcription factors acting on the promoter of the rat fatty acid synthase gene. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 1070–1072
- 62 Nelson, D. *et al.* (2007) Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 16450–16455
- 63 Miyoshi, K. *et al.* (2003) OsHAP3 genes regulate chloroplast biogenesis in rice. *Plant J.* 36, 532–540
- 64 Stephenson, T.J. *et al.* (2011) TaNF-YB3 is involved in the regulation of photosynthesis genes in *Triticum aestivum*. *Funct. Integr. Genomics* 11, 327–340
- 65 Kumimoto, R.W. *et al.* (2008) The Nuclear Factor Y subunits NF-YB2 and NF-YB3 play additive roles in the promotion of flowering by inductive long-day photoperiods in *Arabidopsis*. *Planta* 228, 709–723
- 66 Liang, M. *et al.* (2012) Expression and functional analysis of NUCLEAR FACTOR-Y, subunit B genes in barley. *Planta* 235, 779–791
- 67 Tiwari, S.B. *et al.* (2012) The EDLL motif: a potent plant transcriptional activation domain from AP2/ERF transcription factors. *Plant J.* 70, 855–865
- 68 Wei, X. *et al.* (2010) DTH8 suppresses flowering in rice, influencing plant height and yield potential simultaneously. *Plant Physiol.* 153, 1747–1758
- 69 Ballif, J. *et al.* (2011) Over-expression of HAP3b enhances primary root elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 579–583
- 70 Kusnetsov, V. *et al.* (1999) The assembly of the CAAT-box binding complex at a photosynthesis gene promoter is regulated by light, cytokinin, and the stage of the plastids. *J. Biol. Chem.* 274, 36009–36014
- 71 Ben-Naim, O. *et al.* (2006) The CCAAT binding factor can mediate interactions between CONSTANS-like proteins and DNA. *Plant J.* 46, 462–476
- 72 Kumimoto, R.W. *et al.* (2010) NF-YC3, NF-YC4 and NF-YC9 are required for CONSTANS-mediated, photoperiod-dependent flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 63, 379–391
- 73 Tiwari, S.B. *et al.* (2010) The flowering time regulator CONSTANS is recruited to the FLOWERING LOCUS T promoter via a unique cis-element. *New Phytol.* 187, 57–66
- 74 Meschini, E.P. *et al.* (2008) Host genes involved in nodulation preference for rhizobial infection and nodule development affects partner selection in the common bean (*Phaseolus vulgaris*)-*Rhizobium etli* symbiosis revealed – by suppressive subtractive hybridization. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 459–468
- 75 Zanetti, M.E. *et al.* (2010) A C subunit of the plant Nuclear Factor NF-Y required for rhizobial infection and nodule development affects partner selection in the common bean-*Rhizobium etli* symbiosis. *Plant Cell* 22, 4142–4157
- 76 Yu, Y. *et al.* (2011) PwHAP5, a CCAAT-binding transcription factor, interacts with PwFKBP12 and plays a role in pollen tube growth orientation in *Picea wilsonii*. *J. Exp. Bot.* 62, 4805–4817
- 77 Stephenson, T.J. *et al.* (2010) TaNF-YC11, one of the light-upregulated NF-YC members in *Triticum aestivum*, is co-regulated with photosynthesis-related genes. *Funct. Integr. Genomics* 10, 265–276
- 78 Edwards, D. *et al.* (1998) Multiple genes encoding the conserved CCAAT-box transcription factor complex are expressed in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 117, 1015–1022
- 79 Gusmaroli, G. *et al.* (2001) Regulation of the CCAAT-binding NF-Y subunits in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 264, 173–185
- 80 Thirumurugan, T. *et al.* (2008) Identification, characterization and interaction of HAP family genes in rice. *Mol. Genet. Genomics* 279, 279–289
- 81 Cao, S.H. *et al.* (2011) Identification and characterization of NF-Y transcription factor families in the monocot model plant *Brachypodium distachyon*. *PLoS ONE* 6, e21805
- 82 Hackenberg, D. *et al.* (2012) Studies on differential nuclear translocation mechanism and assembly of the three subunits of the *Arabidopsis thaliana* transcription factor NF-Y. *Mol. Plant* 5, 876–888
- 83 Yang, J. *et al.* (2005) Asymmetric evolution of duplicate genes encoding the CCAAT-binding factor NF-Y in plant genomes. *New Phytol.* 165, 623–631
- 84 Kahle, J. *et al.* (2005) Subunits of the heterotrimeric transcription factor NF-Y are imported into the nucleus by distinct pathways involving importin beta and importin 13. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5339–5354
- 85 Kim, I. *et al.* (1996) Determination of functional domains in the C subunit of the CCAAT-binding factor (CBF) necessary for formation of a CBF-DNA complex: CBF-B interacts simultaneously with both the CBF-A and CBF-C subunits to form a heterotrimeric CBF molecule. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4003–4013
- 86 McNabb, D. *et al.* (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* Hap5p homolog from fission yeast reveals two conserved domains that are essential for assembly of heterotetrameric CCAAT-binding factor. *Mol. Cell. Biol.* 17, 7008–7018
- 87 Masiero, S. *et al.* (2002) Ternary complex formation between MADS-box transcription factors and the histone fold protein NF-YB. *J. Biol. Chem.* 277, 26429–26435
- 88 Li, C.X. *et al.* (2011) Wheat flowering repressor VRN2 and promoter CO2 compete for interactions with NUCLEAR FACTOR-Y complexes. *Plant J.* 67, 763–773
- 89 Guindon, S. *et al.* (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321
- 90 Edgar, R. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797
- 91 Zhou, Z. *et al.* (2009) Maneuver at the transcription start site. *Epigenetics* 4, 1–4

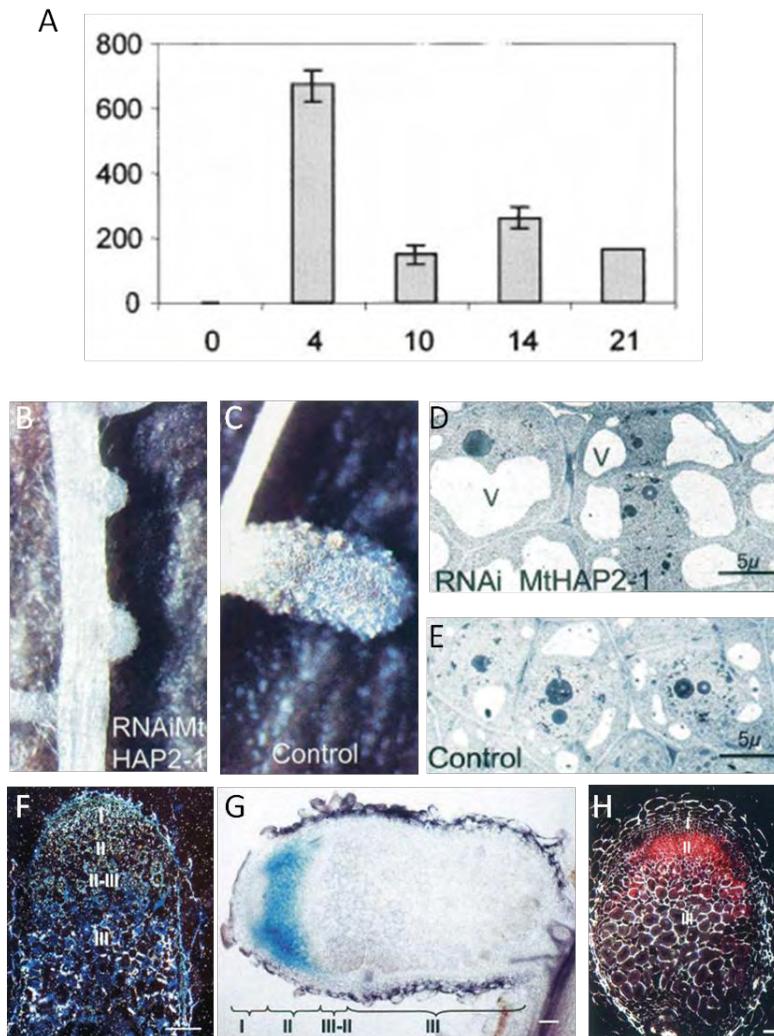


Figure 30. L'expression de *NF-YAI* est restreinte à la zone 1 nodulaire et permet le maintien de l'activité méristématique.

(A) Analyse de l'expression de *NF-YAI* (*MtHAP2-1*) par PCR (polymerase chain reaction) quantitative en temps réel sur des racines inoculées par *S. meliloti* à 0, 4, 10, 14 et 21 jours après inoculation. (B-E) Le développement nodulaire des plantes *NF-YAI* RNAi est altéré. (B, C) Développement nodulaire sur des racines transformées par une construction *NF-YAI* RNAi (B) ou par une construction contrôle (vecteur vide) (C). Les photos ont été prises 46 jours après inoculation par *S. meliloti*. (D, E) Images en microscopie électronique de la zone méristématique de nodules *NF-YAI* RNAi (D) ou contrôles (E). V = vacuoles. Les cellules de la région apicale des nodules *NF-YAI* RNAi commencent déjà à perdre leurs caractéristiques de cellules méristématiques 10 jours après inoculation (D), alors qu'elles sont encore fonctionnelles dans des nodules contrôles 27 jours après inoculation (E). (F-H) Expressions tissulaires de *NF-YAI* (F), miR169a (G), et uORF1 (H). Les différentes zones du nodule sont mentionnées. (F) Microscopie en champ sombre pour visualiser les grains d'argent correspondant aux transcrits *NF-YAI*. (G) Expression de miR169a dans des nodules 14 jours après inoculation révélée par une analyse promoteur : *GUS*. (H) Localisation histochemique de l'expression d'une fusion traductionnelle uORF1 - *GUS* à 21 jours après inoculation. Barres = 5µm (D, E), 100µm (F, G), 50µm (H).

D'après Combiér et al., 2006, 2008.

4.1 Rôles décrits de *NF-YAI* au cours de la nodulation

Avant mon arrivée au laboratoire, des études sur le rôle de *NF-YAI* au cours des étapes tardives de mise en place du nodule avaient été effectuées (Combiere et al., 2006; Combiere et al., 2008). Tout d'abord, l'expression tissulaire de *NF-YAI* dans les nodules matures de *Medicago truncatula* a été recherchée par la méthode d'hybridation d'ARNs messagers *in situ*. Ces expériences ont montré que l'expression de ce gène est fortement associée aux cellules de la zone distale du nodule, et notamment au méristème nodulaire (zone 1) (Combiere et al., 2006) (Figure 30F). De plus, les transcrits *NF-YAI* suivent un gradient d'expression, de la zone distale du nodule vers les régions proximales, où les transcrits ne sont quasiment plus détectables. En plus des analyses d'expression spatio-temporelle de *NF-YAI*, des analyses fonctionnelles ont été effectuées dans le but de comprendre le rôle de *NF-YAI* au cours de l'organogénèse nodulaire. Ainsi, il a été montré qu'une réduction de l'expression de *NF-YAI* par RNAi mène à un fort ralentissement de la croissance du nodule (Figure 30B-C), ce qui conduit à la formation de petits nodules de forme sphérique, et dépourvus de zones clairement délimitées. De plus les cellules de la région apicale des nodules de plantes *NF-YAI* RNAi perdent leur forme polyhédrique et le volume des vacuoles dans ces cellules est bien plus prononcée que chez les plantes contrôles (Figure 30D-E). Logiquement, le défaut de croissance des nodules de plantes *NF-YAI* RNAi aboutit à une forte diminution de la fixation azotée. Il a ainsi été proposé que *NF-YAI* soit un facteur de transcription symbiotique qui joue un rôle clé au cours du développement nodulaire en contrôlant l'activité du méristème nodulaire.

La régulation de l'expression de *NF-YAI* au cours de l'organogénèse nodulaire est complexe ; l'expression de ce gène est régulée à la fois par un micro-ARN (miR169) (Combiere et al., 2006) et par une uORF (uORF1 : upstream open reading frame 1) (Combiere et al., 2008). Ainsi, la surexpression de miR169a ou de uORF1 chez *Medicago truncatula* mène à la formation de nodules très similaires à ceux observés chez les plantes *NF-YAI* RNAi. Les mécanismes par lesquels miR169a et uORF1 contrôlent l'expression de *NF-YAI* ont également été étudiés. miR169 se lie à une séquence présente dans la région 3' UTR (untranslated region) de *NF-YAI* et induit son clivage (Combiere et al., 2006). De plus, l'analyse de l'expression du précurseur de ce micro-ARN par l'utilisation de fusions *pmiR169a : GUS* montre une accumulation de l'activité GUS dans la zone d'infection (zone

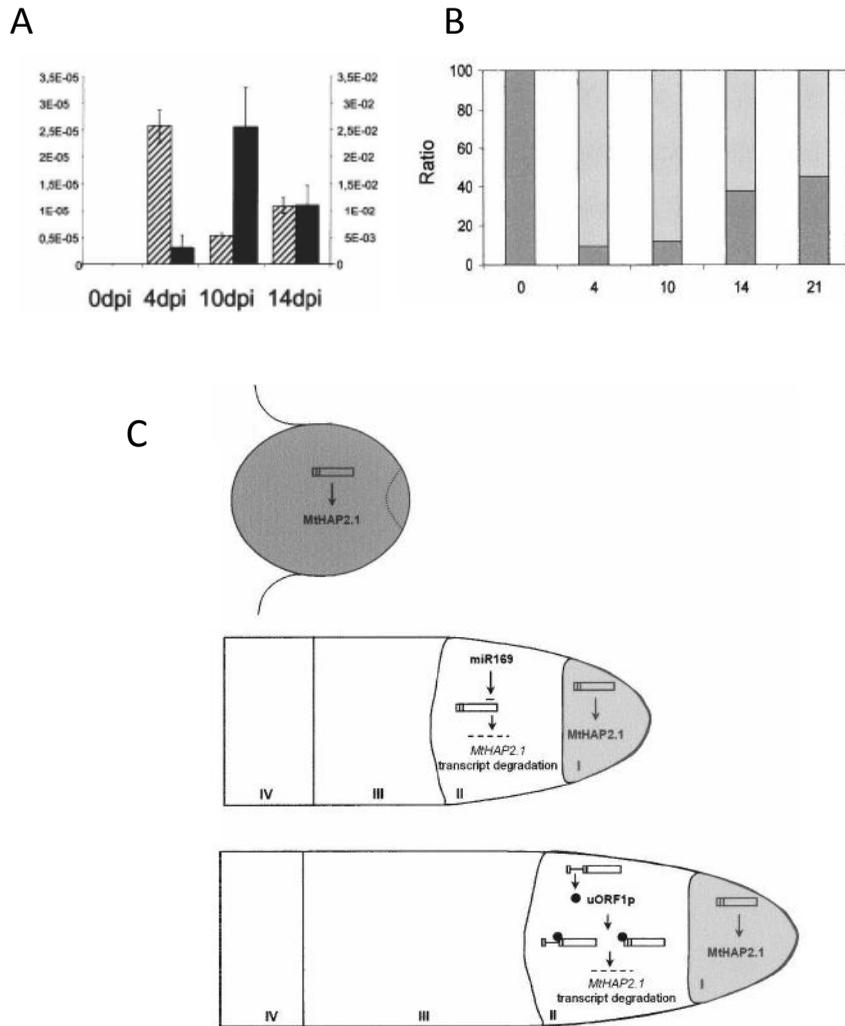


Figure 31. L'expression de *NF-YA1* est inversement corrélée aux expressions de *miR169a* et *uORF1* au cours de l'organogénèse nodulaire.

(A) PCR (polymerase chain reaction) quantitative en temps réel (qRT-PCR) indiquant le profil d'expression de *NF-YA1* (histogramme rayé) et de *miR169a* (histogramme noir) au cours du développement nodulaire. Les niveaux d'expressions relatives sont indiqués à gauche pour *miR169* et à droite pour *NF-YA1*. (B) Analyse en qRT-PCR des niveaux d'expression de la version alternativement épissée (gris sombre) ou normalement épissée (gris clair) des transcrits *NF-YA1*. (C) Modèle pour le mode d'action de *miR169a* et *uORF1* dans le contrôle de l'expression de *NF-YA1* au cours de l'organogénèse nodulaire.

D'après Combier et al., 2006, 2008.

adjacente à la zone méristématique) (Figure 30G). Ces données suggèrent que miR169a confère une restriction spatiale de l'expression de *NF-YAI* à la zone apicale où ce dernier accomplit son rôle dans le maintien de l'activité méristématique nodulaire. En plus de sa régulation par un micro-ARN, *NF-YAI* est alternativement épissé, sur son premier intron (Combier et al., 2008). L'épissage alternatif de l'intron I dans la séquence 5' leader devient prédominant au cours du développement nodulaire, ce qui mène à la production d'un petit peptide de 62 acides aminés, uORF1. La liaison de uORF1 sur la séquence 5' leader de l'ARN messager *NF-YAI* mène à une réduction de l'accumulation de transcrits *NF-YAI* (Combier et al., 2008). Tout comme miR169a, uORF1 est exprimé dans la zone d'infection du nodule chez *Medicago truncatula* (Figure 30H), et contribuerait à la restriction spatiale de l'expression de *NF-YAI*. Un modèle expliquant les rôles séquentiels de miR169a et uORF1 au cours de l'organogénèse nodulaire a été proposé (Combier et al., 2008) (Figure 31C). Au cours de l'organogénèse nodulaire, l'expression de *NF-YAI* est inversement corrélée aux expressions de miR169a et uORF1 (Figure 31 A-B). Quatre jours après inoculation par *S. meliloti*, la structure du nodule n'est pas encore différenciée. A ce stade, miR169 et uORF1 ne sont pas encore exprimés, et l'expression de *NF-YAI* est localisée dans l'intégrité du nodule en formation. Dix jours après inoculation, le miR169 est exprimé dans la zone 2 d'infection du nodule, restreignant l'expression de *NF-YAI* à la zone 1 méristématique, et permettant une différenciation correcte du nodule (Combier et al., 2006). Vingt et un jours après inoculation, l'expression de miR169 diminue, et les versions alternativement épissées de *NF-YAI* sont de plus en plus abondantes, ce qui aboutit à l'expression de uORF1 dans la zone d'infection. A son tour, uORF1 restreint l'expression de *NF-YAI* dans le méristème nodulaire en induisant la dégradation de ses transcrits dans la zone d'infection (Combier et al., 2008).

4.2 Un autre membre de la famille NF-Y impliqué dans la nodulation

L'implication d'une autre sous-unité NF-Y dans la symbiose rhizobium-légumineuses a été démontrée chez *Phaseolus vulgaris* (haricot) (Zanetti et al., 2010). PvNF-YC1 a été identifié à partir de l'étude de gènes différentiellement induits dans les poils absorbants en réponse à la souche SC15 de *R. etli*, en comparaison à la souche 55N1 qui est moins efficace dans l'induction de la nodulation chez *P. vulgaris* (Meschini et al., 2008). Il a par la suite été montré que le niveau de transcrits de *NF-YC1* est fortement et précocément sur-régulé dans des racines inoculées par la souche SC15, alors qu'il reste stable dans des racines inoculées

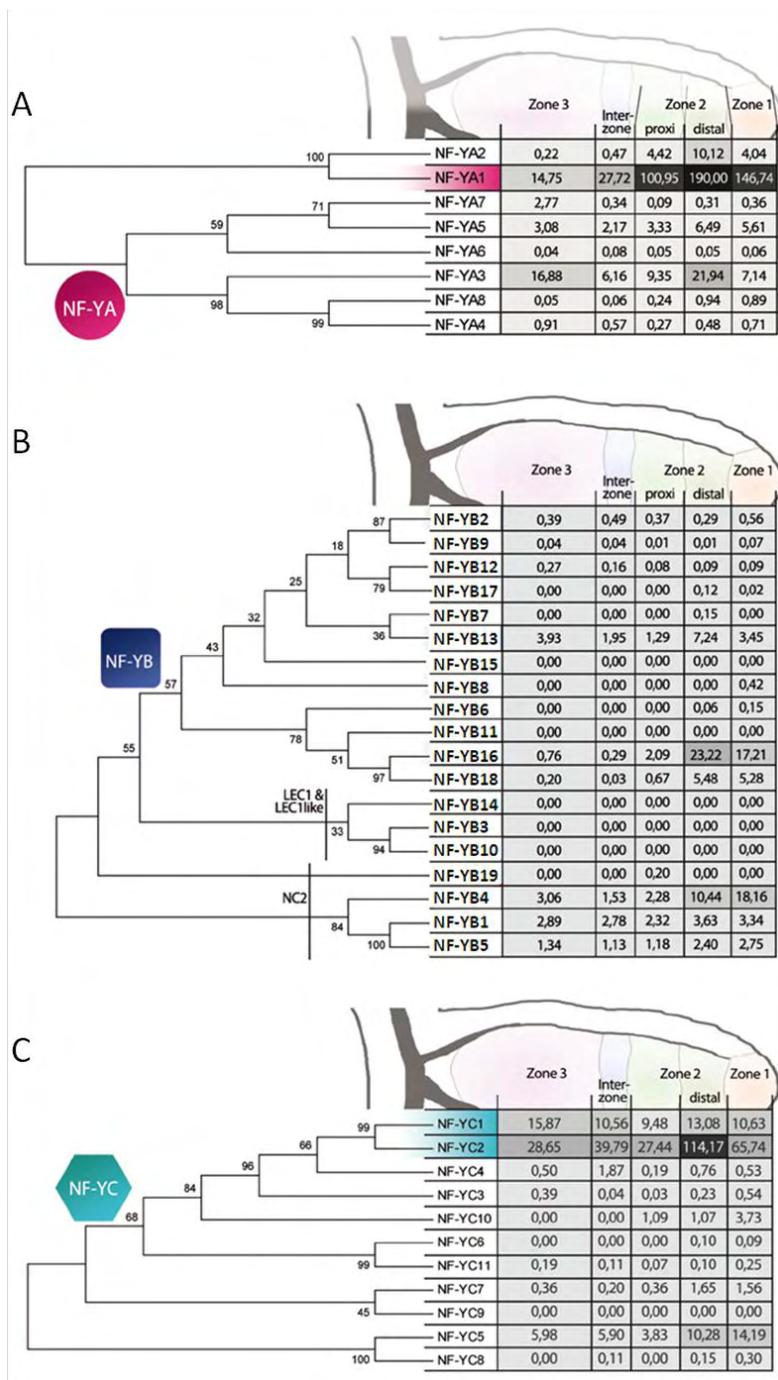


Figure 32. Arbres phylogéniques couplés aux expressions des gènes *NF-Y* dans les zones 1, 2, et 3 de nodules de *Medicago truncatula*.

Les arbres ont été construits à l'aide du logiciel MEGA5 en utilisant la méthode « maximum likelihood bootstrap method ». Les séquences protéiques des différentes sous-unités *NF-Y* ont été utilisées pour ces analyses. Les niveaux de transcrits dans les différentes zones du nodule sont exprimés en nombre de lectures par million de paires de bases séquencées (RPKM).

D'après Pascal Gamas, version d'octobre 2012 (communication personnelle).

par la souche moins compétitive 55N1. La dérégulation de l'expression de *NF-YC1* par RNAi aboutit à une forte réduction du nombre de nodules ainsi que du nombre de cordons d'infection, qui sont bloqués dans l'épiderme dans la majorité des événements d'infection (Zanetti et al., 2010). De plus, dans ces racines, l'expression de gènes codant pour des cyclines impliquées dans la phase de transition G2/M du cycle cellulaire est très réduite en comparaison avec les racines de plantes contrôles, suggérant que NF-YC1 est probablement lié à l'activation des divisions cellulaires corticales en réponse aux rhizobia. Les phénotypes nodulaires observés chez les plantes de *Phaseolus vulgaris* *NF-YC1*-RNAi sont étroitement similaires à ceux observés chez un mutant du gène *NF-YA1* de *Medicago truncatula* (voir partie 5.), malgré les différents types d'organogénèse nodulaire entre ces deux plantes (croissance déterminée pour les nodules de *Phaseolus vulgaris*).

4.3 Expression des gènes *NF-Ys* dans les tissus symbiotiques de *Medicago truncatula*

Au cours de ma thèse, des analyses transcriptomiques par la technique de « RNA sequencing » couplées à de la dissection au lazer ont été menées dans l'équipe (Projet ANR SYMBIMICS, Pascal Gamas). Ces expériences ont eu pour objectif de confirmer et de déterminer quels sont les gènes impliqués dans les différentes étapes de la symbiose entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. Ainsi, les transcrits provenant de racines, de nodules entiers, et des différentes zones de nodules de *Medicago truncatula*, ont été séquencés. Cet outil nous a permis de déterminer quels sont les gènes *NF-Y* différentiellement régulés au cours de nodulation, et quelles sont les localisations tissulaires d'expression de tous les *NF-Ys* répertoriés à ce jour dans les nodules de *Medicago truncatula* (Figure 32). Il est à noter que le profil d'expression nodulaire de *NF-YA1* visualisé lors ces analyses est similaire à celui obtenu par des expériences d'hybridation d'ARN *in situ* (Combiér et al., 2006). Cet outil pourrait de plus s'avérer très efficace pour l'identification et l'étude des complexes trimériques NF-Y qui agissent à différents moments et dans différents processus symbiotiques chez *Medicago truncatula*.

5. Présentation du sujet de thèse

Les travaux de recherche de l'équipe d'accueil dirigée par Pascal Gamas et David Barker portent sur l'étude des régulateurs transcriptionnels actifs lors des stades précoces ou tardifs de la nodulation, ainsi que des réseaux qu'ils contrôlent dans les processus de

signalisation, d'infection et de différenciation cellulaire chez *Medicago truncatula*. Mt*NF-YA1* a été identifié à l'issue d'analyses transcriptomiques comme un gène dont l'expression est fortement sur-régulée au cours de la nodulation (El Yahyaoui et al., 2004). Il code pour une sous-unité du complexe NF-Y également appelé CBF (CCAAT- binding factor). Le facteur de transcription NF-Y est composé de trois sous-unités différentes (NF-YA, NF-YB et NF-YC). Chez les animaux, la dynamique d'association et le mode d'action du complexe NF-Y sont très bien décrits. Les sous-unités NF-YB et NF-YC ont des structures étroitement proches des histones H2B et H2A, respectivement, de part la présence d'un domaine HFD (histone fold domain) aussi présent chez ces histones (Dolfini et al., 2012). Des expériences de mutagenèse dirigée sur certains résidus présents dans le domaine HFD ont montré que ce domaine est important pour la formation d'un dimère NF-YB/NF-YC ainsi que pour la liaison du complexe NF-Y à l'ADN (XING et al., 1993; Kim et al., 1996; Sinha et al., 1996). Le dimère NF-YB/NF-YC est formé dans le cytoplasme, puis transloqué dans le noyau où il interagit avec la troisième sous-unité NF-YA (Frontini et al., 2004; Kahle et al., 2005). La structure de la sous-unité NF-YA n'est pas connue. Cependant, des données biochimiques indiquent que le domaine conservé de cette sous-unité est composé de deux hélices alpha, dont chacune a une fonction précise (MANTOVANI et al., 1994): l'hélice A1 est responsable de l'interaction de NF-YA avec le dimère NF-YB/NF-YC, et l'hélice A2 est requise pour la liaison aux éléments *CCAAT*, via un mécanisme encore inconnu. C'est seulement sous sa forme hétéro-trimérique que le complexe NF-Y peut se lier à l'ADN (Mantovani, 1999). Alors que chez les animaux, chaque sous-unité du complexe n'est codée que par un seul gène, les membres NF-Y de plantes appartiennent à une famille multigénique, et sont impliqués dans la régulation de nombreux processus développementaux (Laloum et al., 2012 ; Petroni et al., 2012). Chez *Medicago truncatula*, l'utilisation de plantes RNAi dérégulant l'expression de *NF-YA1* a permis de montrer que ce gène est impliqué dans le maintien de l'activité méristématique nodulaire (Combié et al., 2006). Plus récemment, un mutant EMS a été obtenu dans l'équipe d'accueil et la caractérisation phénotypique de ce mutant a confirmé ce rôle de *NF-YA1* au cours de l'organogénèse nodulaire.

En plus de son rôle dans les étapes d'organogénèse nodulaire, l'implication de *NF-YA1* en réponse aux NFs et au cours des étapes d'infection rhizobienne a été initiée dans l'équipe d'accueil avant mon arrivée. Tout d'abord, une analyse détaillée de l'expression de *NF-YA1* par des expériences de qRT-PCR sur des échantillons provenant de poils absorbants traités aux NFs a été effectuée (F. de Carvalho-Niebel, données non-publiées). Cette analyse a

A

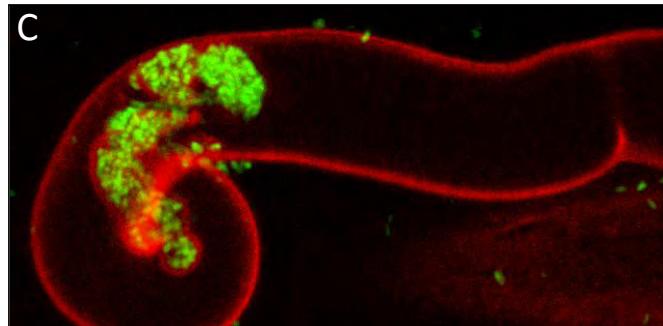
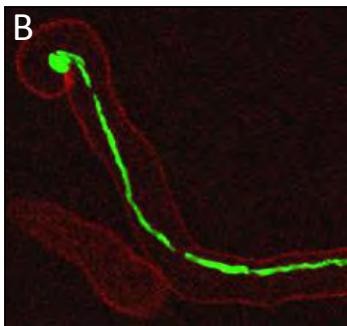
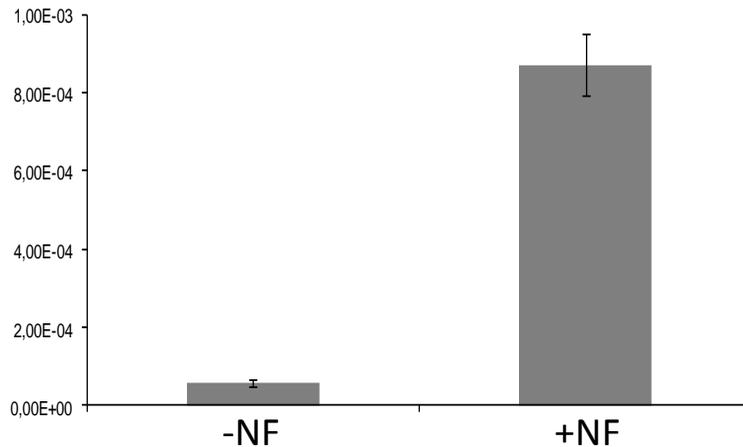


Figure 33. Implication de MtNF-YAI au cours des étapes précoces de la symbiose entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*.

(A) qRT-PCR indiquant l'expression relative de MtNF-YAI dans les poils absorbants racinaires en réponse à un traitement contrôle (H₂O, -NF) ou à un traitement par des NFs à une concentration de 10⁻⁸M. (B, C) Le mutant *Mtnf-ya1-1* est altéré au cours de l'infection rhizobienne à travers les poils absorbants racinaires. Alors que chez les plantes sauvages (WT) (B), les cordons d'infection progressent linéairement à travers les poils absorbants, les plantes mutantes *nf-ya1-1* (C) présentent des cordons d'infection anormaux, montrant des branchements et des gonflements à l'apex du poil absorbant.

D'après F. de Carvalho-Niebel et J. Fournier (communication personnelle).

permis de montrer que l'expression de *NF-YA1* est fortement induite dans l'épiderme après six heures de traitement aux NFs (Figure 33A), suggérant un rôle probable de ce facteur de transcription dans les événements d'infection précoce ou de signalisation épidermique. En accord avec cette hypothèse, la caractérisation du mutant *nf-ya1-1* a permis de montrer que *NF-YA1* est impliqué dans les étapes précoces de la symbiose entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti* telles que l'infection dans les poils absorbants racinaires. Alors que les cordons d'infections observés chez des plantes WT présentent une croissance linéaire à travers les poils absorbants, la plupart des infections chez le mutant *nf-ya1-1* présentent des défauts dans leur progression (Figure 33B-C) (J. Fournier, données non-publiées). Dans ces cordons, les bactéries progressent lentement, et sont retenues dans les poils absorbants dans la majorité des événements d'infection. Des analyses phylogéniques ont par ailleurs montré que la protéine MtNF-YA1 fait partie d'un sous-groupe spécifique des légumineuses, dans lequel un autre MtNF-YA (MtNF-YA2) est présent (Laloum et al., 2012). Le gène MtNF-YA2 est fortement exprimé dans les racines et les nodules de *Medicago*, mais son expression est très faible dans tous les autres organes analysés à ce jour. Il est ainsi probable que les gènes MtNF-YA1 et MtNF-YA2 fonctionnent de manière partiellement redondante, comme c'est souvent le cas pour les sous-unités NF-Y de plantes (Petroni et al., 2012).

Durant ma thèse, j'ai contribué à l'étude des rôles de *NF-YA1* et *NF-YA2* au cours de la symbiose entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. Une première partie de mon travail a consisté en la caractérisation de complexes NF-Ys putatifs au sein desquels MtNF-YA1 agit pour contrôler les étapes précoces de la nodulation chez *Medicago truncatula*. Des études d'interaction protéine-protéine par le système double hybride dans la levure ont permis d'identifier deux sous-unités NF-YCs agissant probablement en complexe avec NF-YA1. De plus la dynamique d'assemblage d'un complexe trimérique hypothétique a été analysée. Les résultats concernant l'étude de ces complexes trimériques seront présentés dans le chapitre II. Une étude sur l'implication de *NF-YA1* et *NF-YA2* au cours des étapes de signalisation et d'infection rhizobienne a également été menée. Cette étude a permis de montrer que *NF-YA1* et/ou *NF-YA2* agissent très probablement en amont de l'induction d'*ENOD11* en réponse aux NFs. Les résultats de ces travaux seront présentés dans le chapitre III. Enfin, l'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse seront discutés dans le chapitre IV.

**Chapitre II : Complexe(s) NF-Y(s)
impliquant(s) NF-YA1 au cours des
étapes précoces de la nodulation chez
*Medicago truncatula***

1. Le système double hybride de levure

1.1 Principe général du double hybride

La méthode du double hybride a été mise au point par Fields and Song (1989) et permet de détecter une interaction entre deux protéines (Fields and Song, 1989). Le principe de cette technique consiste à exprimer deux protéines d'intérêt dans la levure, appelées proie et appât, qui vont permettre l'activation de l'expression de gènes rapporteurs uniquement lorsqu'elles interagissent. Les gènes rapporteurs sont des marqueurs d'auxotrophie. Ils codent pour des enzymes de la voie de biosynthèse d'acides aminés essentiels. Ainsi, l'activation des gènes rapporteurs permet aux levures de croître sur un milieu dépourvu de ces acides aminés. En plus de ces deux marqueurs, le gène rapporteur *AURI-C* code pour une inositol phosphoryl ceramide synthase qui confère la résistance à un antibiotique, l'aureobasidin A (Clontech). Le gène *LacZ* codant pour la β -Galactosidase peut également être un gène rapporteur et permet de quantifier la force des interactions observées, après dosage colorimétrique.

1.2 Le système GAL4

Le système double hybride utilisé au cours de ma thèse est le système GAL4 Matchmaker (Clontech). Les gènes rapporteurs des souches de levure manipulées sont les gènes *HIS3*, *ADE2* et *LacZ*. Les gènes *HIS3* et *ADE2* codent pour des enzymes nécessaires à la biosynthèse d'histidine et d'adénine, respectivement. En plus de ces gènes, deux autres marqueurs d'auxotrophie qui ne sont pas des gènes rapporteurs d'interaction sont utilisés. Les gènes *TRP1* et *LEU2* ne sont pas fonctionnels dans les souches de levures utilisées. Ces gènes sont nécessaires à la biosynthèse de tryptophane et de leucine, et servent à sélectionner les cellules transformées par les vecteurs d'expression des protéines appât et proie, qui contiennent une copie sauvage des gènes *TRP1* et *LEU2*. Ainsi, les levures transformées par les vecteurs d'expression des protéines appât et proie seront sélectionnées par leur croissance sur milieu sans tryptophane ni leucine, également appelé SD -TL. L'interaction protéine-protéine sera sélectionnée sur un milieu sans tryptophane, leucine, et histidine ou adénine. Ces milieux sont notés SD -TLH ou SD -TLHA. De plus, le 3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT) est un inhibiteur du produit du gène *HIS3*. Il est utilisé à différentes concentrations pour augmenter la sélectivité des milieux de croissance SD -TLH. Ainsi, seules les interactions permettant la production d'une grande quantité d'histidine permettront aux levures transformées de croître sur les milieux contenant du 3-AT.

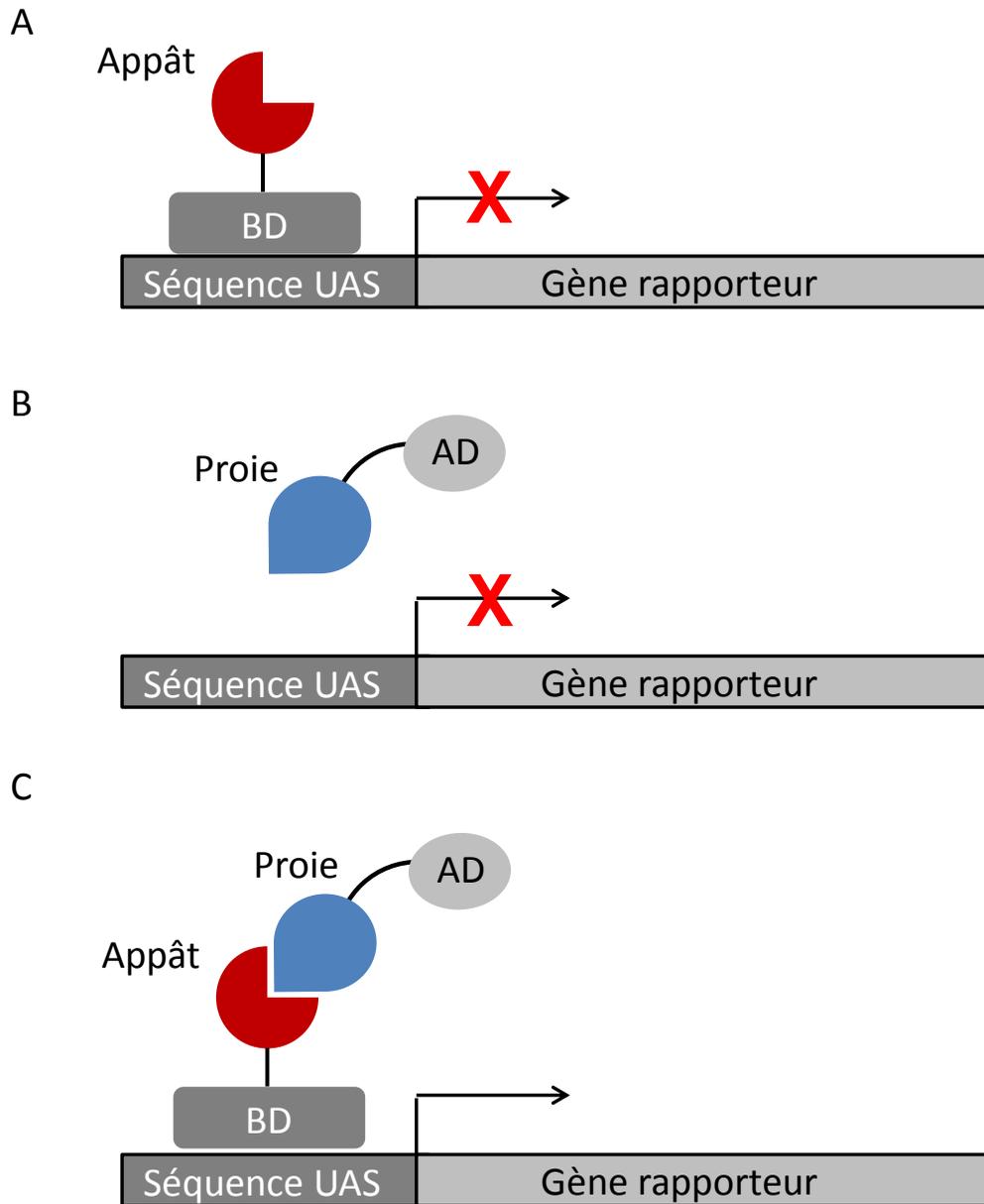


Figure 34. Principes généraux du système de double hybride GAL4 Matchmaker (Clontech).

(A) L'appât, en fusion traductionnelle avec le domaine BD du facteur de transcription GAL4, lie les séquences promotrices UAS (upstream activating séquence). (B) La proie, en fusion traductionnelle avec le domaine AD du facteur de transcription GAL4, ne lie pas les séquences promotrices UAS. (C) Lors d'une interaction entre l'appât et la proie exprimés dans la levure, les domaines BD et AD du facteur de transcription GAL4 sont rapprochés et le domaine AD peut activer la transcription des gènes rapporteurs.

Le système GAL4 Matchmaker est basé sur l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription GAL4 de levure, via sa liaison à des séquences promotrices appelées UAS (upstream activation sequences). Ce facteur de transcription est constitué de deux domaines nécessaires à son fonctionnement. Le domaine BD (binding domain) est responsable de la liaison aux séquences UAS *cis*-régulatrices des promoteurs de gènes rapporteurs, et le domaine AD (activation domain) permet d'activer la transcription de ces gènes. Les protéines appât et proie sont exprimées en fusion traductionnelle avec le domaine BD et le domaine AD, respectivement. Lorsqu'une interaction se produit entre les protéines exprimées, un facteur de transcription GAL4 chimérique est reconstitué et permet l'activation de l'expression des gènes rapporteurs (Figure 34). La souche de levure AH109 a été utilisée. Cette souche ne possède pas les gènes codant pour GAL4 et GAL80, un proche homologue, afin d'éviter l'activation endogène des gènes rapporteurs. Dans ce système, les marqueurs d'auxotrophie présents dans les vecteurs d'expression BD et AD sont les gènes *TRP1* et *LEU2*, respectivement.

2. Recherche sans à priori des interacteurs de NF-YA1

Dans le but de déterminer les interacteurs protéiques de NF-YA1 au cours de la nodulation chez *Medicago truncatula*, nous avons choisi une approche de criblage en double hybride, en utilisant NF-YA1 comme protéine appât dans le système GAL4.

2.1 Banque d'ADNc utilisée

Pour ce criblage, j'ai utilisé une banque d'ADN complémentaires (ADNc) construite par L. Sauviac et F. de Carvalho Niebel (Andriankaja et al., 2007). Cette banque provient de tissus racinaires traités par des NFs (10^{-8} M) pendant 2, 6 et 24 heures. Suite à ces traitements, les poils absorbants racinaires ont été isolés par une méthode de fractionnement à l'azote liquide, puis les ARNs correspondant aux différents temps de traitement ont été regroupés. Des ADNc ont ensuite été générés et clonés dans le vecteur pGADT7 qui permet l'expression de ces clones en fusion traductionnelle N-terminale avec le domaine AD du facteur de transcription GAL4. Cette banque possède environ 1 million de clones indépendants, et la taille moyenne des inserts est de 1,1 kb.

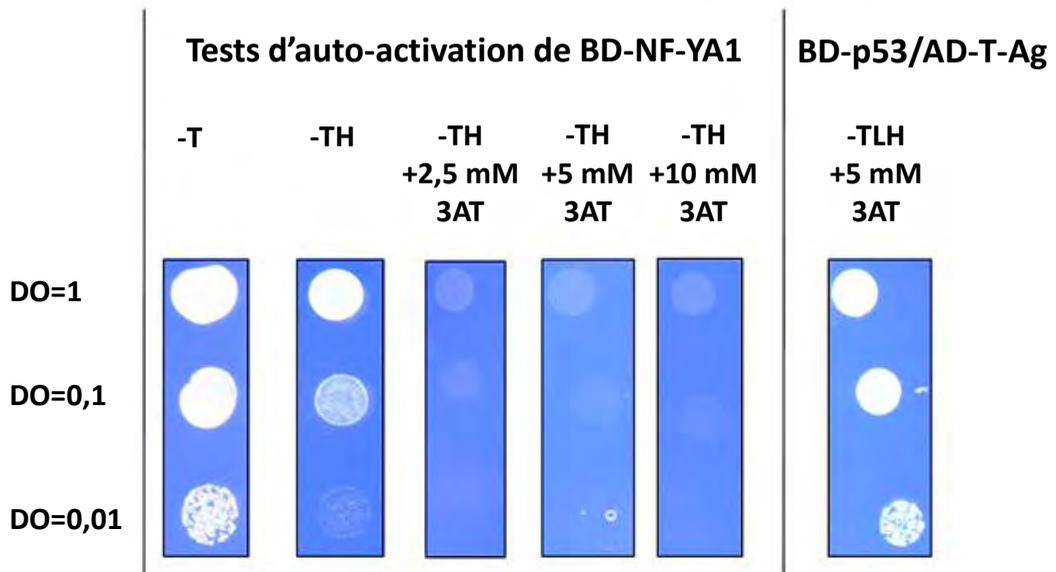


Figure 35. Auto-activation du gène rapporteur *HIS3* par la protéine chimérique GAL4BD-NF-YA1.

Une goutte de suspension de levures à différentes concentrations a été déposée sur milieux sélectifs pour l'expression de la construction BD-NF-YA1 (-T), ainsi que pour l'expression du gène rapporteur *HIS3* (-TH). Une concentration de 2,5, 5, ou 10 mM de 3-AT suffit à contrebalancer l'effet d'auto-activation par la protéine appât. Sur un milieu contenant cette concentration de 3-AT, les levures transformées par des protéines contrôles appât (p53) et proie (T-Ag) qui interagissent peuvent croître (seulement montré pour la concentration 5 mM).

2.2 Auto-activation de la transcription des gènes rapporteurs par la protéine appât

Le cadre ouvert de lecture (ORF) de *MtNF-YA1* a été cloné dans un vecteur permettant l'expression d'une fusion traductionnelle avec le domaine BD de GAL4. Avant d'effectuer le criblage, il a fallu vérifier que l'expression de la protéine appât seule n'induisait pas la transcription des gènes rapporteurs, ce qui est souvent le cas dans ce système, notamment lorsque la protéine appât utilisée est un facteur de transcription. Pour ce faire, la souche de levure AH109 a été transformée par une construction BD-NF-YA1 seule et la croissance des levures transformées a été testée sur un milieu SD –T ou SD –TH. Comme attendu, l'expression de la protéine chimérique BD-NF-YA1 seule permet non seulement aux levures de croître sur un milieu SD-T, mais également sur un milieu SD –TH (Figure 35), signe que l'appât seul est capable d'activer la transcription du gène *HIS3*. Pour s'affranchir de ce problème, le milieu de croissance SD –TH a été additionné de plusieurs concentrations de 3-AT, inhibiteur du produit du gène *HIS3*. L'inhibition de la croissance des levures a ainsi pu être observée à différentes concentrations de 3-AT, et ce dès 2,5 mM (Figure 35). De plus, ces concentrations de 3-AT permettent la croissance des levures transformées par le couple de contrôles positifs BD-p53/AD-T-antigen sur un milieu SD –TLH (Figure 35).

2.3 Criblage de la banque

Un schéma illustratif des démarches suivies pour le criblage en double hybride est présenté figure 36. Pour ce criblage, il a été décidé d'utiliser un milieu de croissance sélectif contenant 5 mM de 3-AT afin de limiter le nombre de candidats potentiels en espérant ne garder que les interacteurs les plus forts de *MtNF-YA1*. 20 µg d'ADN de la banque ont été utilisés et le nombre de clones criblés a été estimé à 4 millions après étalement d'un aliquot de la transformation sur milieu SD –TL. Cela représente environ 4 fois le nombre de clones présents dans la banque. Les levures ont été étalées sur un milieu SD –TLH complété de 3-AT à 5 mM, et après trois jours de croissance à 28°C, 212 clones positifs ont été comptés. Ces colonies ont été classées en trois catégories appelées A, B, ou C, selon leur vitesse d'apparition sur le milieu sélectif. Les colonies de la classe A, B, ou C correspondent à celles qui sont apparues 60, 72, ou 84 heures après étalement, respectivement. Une amplification par PCR a été effectuée sur chaque colonie. Dans 97 cas nous avons obtenu plusieurs produits d'amplification. Les clones concernés ont été écartés, et les produits d'amplification des 115 clones restants ont été séquencés. Après des analyses de BLASTn, il s'est avéré que les 115

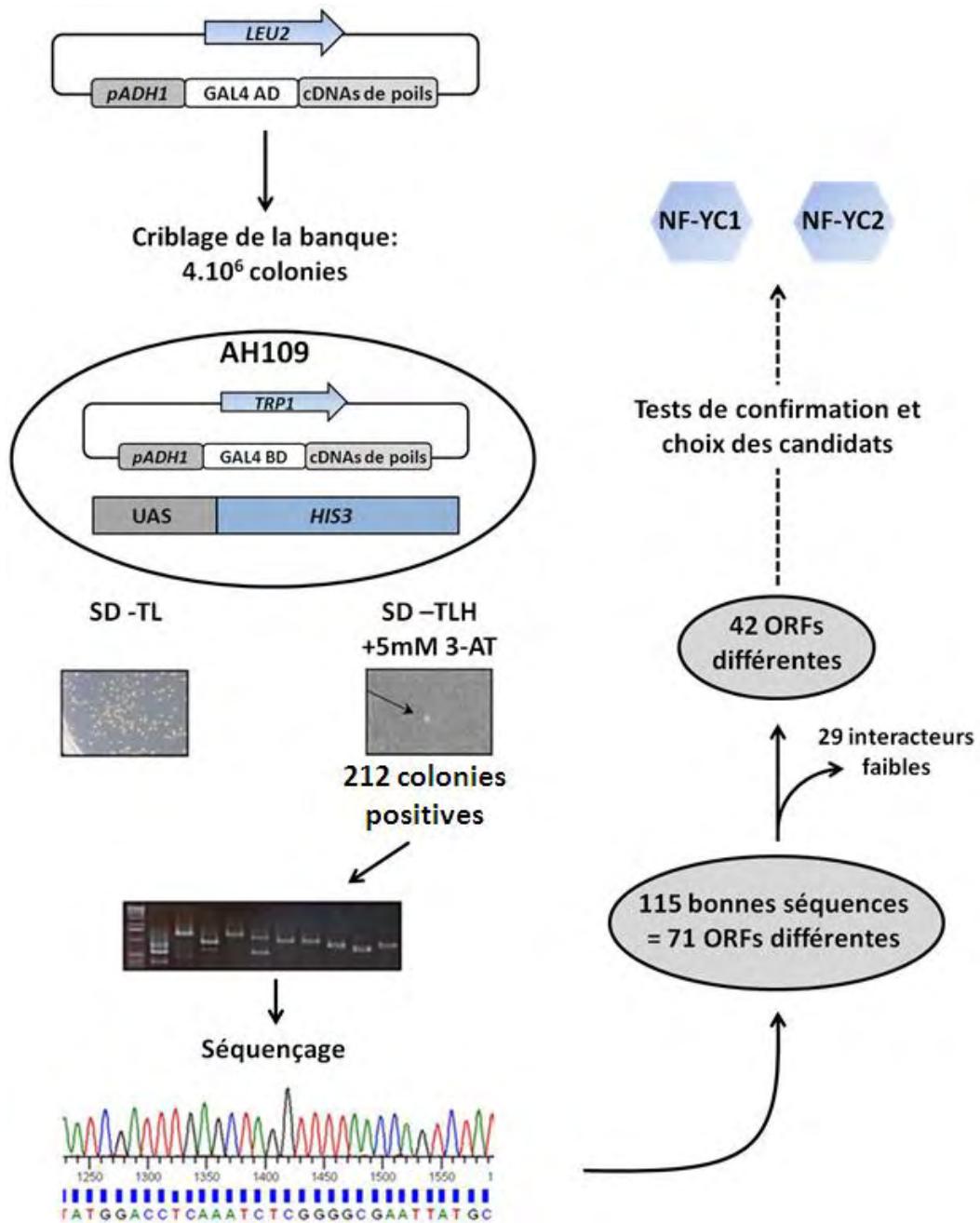


Figure 36. Représentation schématique de la stratégie utilisée pour le criblage de la banque d'ADNc en utilisant MtNF-YA1 comme protéine appât.

séquences obtenues correspondent à 71 ORFs différents. En parallèle, chaque colonie a été ré-étalée sur le même milieu sélectif que celui utilisé pour le criblage, dans le but d'éliminer les faux positifs (les faux positifs correspondent à 29 ORFs différents).

Parmi les séquences obtenues, nous avons identifié deux ORFs codant pour deux sous-unités NF-YCs différentes, appelées NF-YC1 et NF-YC2 (clones C38 et C50). Après avoir vérifié que les ORFs correspondant à ces deux clones étaient de pleine longueur et en phase avec le domaine AD de GAL4, les interactions observées ont été confirmées après extraction, amplification, et re-transformation des plasmides AD contenant *NF-YC1* et *NF-YC2* dans la levure (Figure 37A). Comme contrôle négatif d'interaction, des levures transformées par les constructions BD-p53 et AD-NF-YC1/2 ne sont pas capables de croître sur un milieu sélectif d'interaction (données non montrées).

Comme mentionné en introduction, les gènes *NF-YC1* et *NF-YC2* codent pour une des trois sous-unités putatives du complexe NF-Y, et ont une taille de 256 et 260 acides aminés, respectivement. Les protéines codées par ces deux gènes ont des séquences très similaires et partagent plus de 80% d'identité (Figure 37B). Comme attendu, des analyses PFAM des séquences protéiques correspondantes montrent qu'elles possèdent le domaine conservé HFM responsable de l'interaction au sein de l'hétéro-trimère NF-Y et de la liaison à l'ADN (Figure 37B). Dans le but de caractériser ces interactions dans un contexte symbiotique, nous avons regardé les profils d'expression de *NF-YC1* et *NF-YC2* au cours de la nodulation en utilisant la base de données MtGEA (*Medicago truncatula* gene expression atlas) (<http://mtgea.noble.org/v3/>), et les données produites par le projet ANR SYMBIMICS (Pascal Gamas, communication personnelle) (Figure 32C). Les données présentées sur le site du MtGEA correspondent à une synthèse des profils d'expression de la majorité des gènes de *Medicago truncatula* dans une grande partie des organes végétaux (racines, nodules, tiges, pétioles, bourgeons végétatifs, fleurs, et graines), obtenues à l'issue d'analyses transcriptomiques par micro-array (Affymetrix Medicago Gene Chip). Chez *Medicago truncatula*, les gènes *NF-YC1* et *NF-YC2* présentent des profils d'expression ubiquitaires. Cependant, bien que le niveau de transcrits de *NF-YC1* reste stable au cours de la nodulation, celui de *NF-YC2* est plus de deux fois supérieur dans les jeunes nodules, en comparaison à son niveau dans les racines avant inoculation (MtGEA). De plus, l'expression spatio-temporelle de ce gène est étroitement corrélée à celle de *NF-YA1*. En effet, les transcrits *NF-YC2* sont majoritairement présents dans les zones apicales des nodules matures de *Medicago*

A

	SD -TL	SD -TLH	SD -TLH +2,5mM 3-AT	SD -TLH +5mM 3-AT	SD -TLH +10mM 3-AT
BD-NF-YA1 AD-NF-YC2					
BD-NF-YC2 AD-NF-YA1					
BD-K171E AD-NF-YC2					
BD-NF-YC2 AD-K171E					
BD-p53 AD-T-Ag					

B



Figure 37. Spécificités d'interactions entre MtNF-YA1 et MtNF-YC2.

(A) Une goutte de suspension de levures à une densité optique (DO) de 0,1 a été déposée sur milieux sélectifs pour l'expression des constructions appât et proie (SD -TL), ou pour l'interaction entre l'appât et la proie (SD -TLH + 3-AT). Il est à noter une absence d'auto-activation du gène rapporteur *HIS3* par la protéine appât NF-YA1-K171E sur milieu SD-TLH. (B) Alignement des protéines MtNF-YC1 et MtNF-YC2 à l'aide du logiciel ClustalW montrant une forte conservation de séquences entre ces deux sous-unités. Le motif HFM est représenté par la double flèche grise en pointillés. Les domaines prédits de liaison à l'ADN (trait noir), d'interaction avec les sous-unités NF-YA (traits roses) et NF-YB (trait bleu), sur la base des résultats obtenus pour les protéines NF-Ys animales, sont représentés.

truncatula (Figure 32C), et l'expression du gène *NF-YC2* est spécifiquement sur-régulée dans la zone de pré-infection épidermique en réponse à un traitement aux NFs de 4 heures (projet ANR SYMBIMICS, Pascal Gamas, communication personnelle). De manière intéressante, *MtNF-YC2* code pour l'orthologue le plus proche de *PvNF-YC1*, également impliqué dans la nodulation chez *Phaseolus vulgaris* (Zanetti et al., 2010). Ensemble, ces données suggèrent que *NF-YC2* est un interacteur probable de *NF-YA1*, au sein d'un complexe hétéro-trimérique contrôlant l'infection rhizobienne et l'organogénèse nodulaire. *NF-YC1* est également bien exprimé dans les mêmes tissus que *NF-YA1* et pourrait donc jouer un rôle au moins partiellement redondant avec *NF-YC2* au sein de complexes symbiotiques avec *NF-YA1*.

2.4 Spécificités d'interaction

Même si les sous-unités NF-Ys présentent une forte conservation de leurs domaines protéiques actifs au sein des règnes animaux et végétaux, aucune étude structure-fonction ayant pour but de déterminer les acides aminés impliqués dans l'assemblage du complexe NF-Y n'a été effectuée à ce jour chez les plantes. Chez les animaux, des analyses de structure-fonction par mutagenèse dirigée couplée à des expériences de co-immunoprécipitation (CoIP) ont été menées dans le but de déterminer les acides aminés clés impliqués dans l'interaction de *NF-YA* avec le complexe *NF-Y* (MANTOVANI et al., 1994). Ces études ont permis de montrer que les lysines en position 270 et 277 sur la sous-unité *NF-YA* de l'homme sont requises pour l'interaction au sein du complexe *NF-Y*. Etant donné la forte conservation de ces résidus chez tous les *NF-YAs* (Laloum et al., 2012), nous avons testé l'effet d'une mutation ponctuelle K171E (Lysine 171 → Glutamate) sur la capacité de *NF-YA1* à interagir avec les sous-unités *NF-YC1* et *NF-YC2*. Un alignement des domaines conservés des *NF-YAs* d'*Homo sapiens* et de *Medicago truncatula* montre en effet que le résidu K171 de *Medicago truncatula* correspond au résidu K270 de l'homme. Après amplification par PCR d'une version mutée de *MtNF-YA1* appelée *K171E* à l'aide d'amorces présentant un « mismatch » conférant la mutation en question, cette version a été clonée dans les vecteurs permettant son expression en fusion traductionnelle avec les domaines AD et BD dans la levure. Après transformation et repiquage des colonies de levures sur un milieu SD –TLH complémenté de 5 mM de 3-AT, les levures contenant les constructions BD-K171E/AD-NF-YC2 ou BD-NF-YC2/AD-K171E sont incapables de croître, à l'inverse des levures transformées par les contrôles positifs BD-NF-YA1/AD-NF-YC2 ou BD-NF-YC2/AD-NF-

YA1 (Figure 37A). Ces résultats suggèrent que tout comme chez les mammifères, le résidu K171 de NF-YA1 est requis pour l'interaction entre NF-YA et NF-YC chez les plantes. Les mêmes expériences de double hybride ont été réalisées avec la sous-unité NF-YC1, et les résultats obtenus sont identiques (données non montrées). De manière intéressante, les levures qui expriment la construction BD-K171E sont incapables de croître sur un milieu SD –TLH, signe d'une perte d'auto-activation du gène rapporteur *HIS3*.

2.5 Conclusions

L'approche de criblage en double hybride a démontré que l'utilisation de ce système dans le but d'identifier les sous-unités agissant en complexe avec NF-YA1 au cours des étapes précoces de la symbiose entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti* est concluante. En effet, ce criblage nous a permis d'identifier deux sous-unités NF-YCs comme partenaires potentiels de NF-YA1. Le rôle de l'orthologue de NF-YC2 chez *Phaseolus vulgaris* (haricot), ainsi que le profil d'expression spatio-temporelle de ce gène chez *Medicago truncatula* appuient l'hypothèse selon laquelle NF-YC2 agit effectivement en partenariat avec NF-YA1. Cependant, le criblage de la banque de poils absorbants ne nous a pas permis d'identifier de sous-unité NF-YB comme interacteur potentiel de NF-YA1. La recherche de sous-unités NF-YBs impliquées dans ce complexe putatif sera discutée dans le dernier chapitre du manuscrit et fait l'objet du sujet de thèse de Maël Baudin, un autre doctorant de l'équipe d'accueil.

3. Dynamique d'association du complexe NF-Y chez les plantes

Cette partie de ma thèse a consisté en l'étude de la localisation subcellulaire des sous-unités NF-YA, NF-YB et NF-YC, ainsi que de la dynamique d'assemblage du complexe NF-Y. Ce type d'étude a été mené dans le domaine de recherche animal, par des expériences d'immuno-localisation et de fusions traductionnelles à la YFP (yellow fluorescent protein) des sous-unités NF-Ys endogènes, dans des fibroblastes, des myocytes, et des cellules épithéliales d'homme et de souris (Frontini et al., 2004). Alors que les sous-unités NF-YA et NF-YB sont localisées dans le noyau de ces cellules, la localisation subcellulaire de la sous-unité NF-YC est à la fois cytoplasmique et nucléaire. De plus, lorsque la sous-unité NF-YC est co-exprimée avec la sous-unité NF-YB dans ces cellules, sa localisation change et devient majoritairement nucléaire. Ainsi, ces résultats suggèrent que la sous-unité NF-YB est responsable de la localisation nucléaire de NF-YC (Frontini et al., 2004).

Pour étudier la localisation subcellulaire des sous-unités NF-Ys de *Medicago truncatula*, celles-ci ont été exprimées en fusion traductionnelle avec la YFP dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana*, puis la localisation de l'expression des protéines chimériques a été observée à l'aide d'un microscope à épifluorescence. Etant donné que nous n'avions pas pu identifier de sous-unité NF-YB comme membre potentiel d'un complexe comprenant NF-YA1 et NF-YC1/2, nous avons choisi une sous-unité NF-YB, appelée NF-YB2, sur la base de son profil d'expression spatio-temporelle au cours de la nodulation, ainsi que des séquences génomiques disponibles à ce moment. Le gène *NF-YB2* est constitutivement exprimé dans tous les tissus de *Medicago truncatula* analysés à ce jour (MtGEA) et la protéine codée par ce gène présente les domaines conservés retrouvés chez les sous-unités NF-YBs de plantes et de mammifères. De plus, son interaction avec NF-YC1 et NF-YC2 a récemment été confirmée dans la levure (M. Baudin, communication personnelle).

3.1 Localisation subcellulaire de NF-YA1, NF-YB2, et NF-YC2

Les différentes sous-unités NF-YA1, NF-YB2, et NF-YC2 ont été clonées dans un vecteur permettant l'expression constitutive (promoteur 35S) de ces protéines en fusion à la YFP du côté N-terminal de la protéine exprimée. Une suspension de souches d'*Agrobacterium tumefaciens*, transformées par les vecteurs d'expression utilisés, a été agro-infiltrée dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana*. Une construction permettant la surexpression de la protéine YFP seule, localisée à la fois dans le noyau et le cytoplasme des cellules de *Nicotiana benthamiana*, nous a servi de contrôle positif lors de ces expériences (Figure 38A). Après infiltration des feuilles de *Nicotiana benthamiana*, le signal fluorescent d'une fusion traductionnelle YFP-NF-YA1 est exclusivement accumulé dans les noyaux des cellules (Figure 38B). A l'inverse, l'expression de la fusion traductionnelle YFP-NF-YB2 est exclusivement localisée dans le cytoplasme (Figure 38D), alors que l'expression de la fusion traductionnelle YFP-NF-YC2 est localisée à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules épidermique de *Nicotiana benthamiana* (Figure 38C). Les résultats de localisation obtenus pour les sous-unités NF-YA1 et NF-YC2 sont en accord avec l'étude réalisée par Frontini et al. (2004) dans les cellules animales. Cependant, au vu de cette étude, les résultats obtenus pour la localisation exclusivement cytoplasmique de NF-YB2 sont en contradiction avec la localisation de NF-YB uniquement nucléaire chez l'homme et la souris (Frontini et al.,

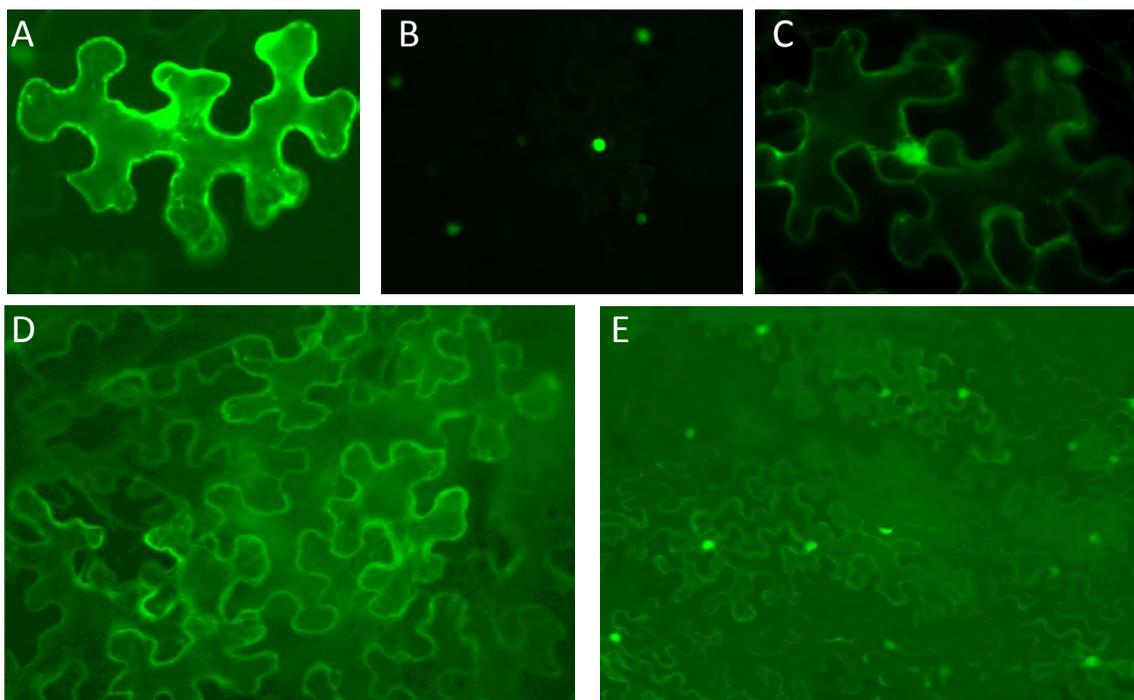


Figure 38. Localisation subcellulaire des sous-unités NF-YA1, NF-YB2, et NF-YC2 de *Medicago truncatula*.

Des feuilles de *Nicotiana benthamiana* ont été agro-infiltrées par des vecteurs permettant l'expression transitoire des protéines chimériques YFP-NF-YA1 (B), YFP-NF-YC2 (C), YFP-NF-YB2 (D). Une expérience de co-expression de YFP-NF-YB2 avec 3HA-NF-YC2 a également été effectuée (E). La protéine YFP a été utilisée comme contrôle positif de l'expérience, et est localisée à la fois dans le cytoplasme et le noyau des cellules épidermiques de *Nicotiana benthamiana* (A).

2004). Ainsi, ces données suggèrent l'existence de différences possibles entre le règne animal et végétal dans la régulation de l'assemblage du complexe NF-Y.

3.2 Dynamique possible d'assemblage du complexe NF-YA1/NF-YB2/NF-YC2

Dans le but d'approcher la dynamique d'assemblage du complexe putatif NF-YA1/NF-YB2/NF-YC2, nous avons réalisé des expériences de co-expression de deux sous-unités différentes dans les feuilles de *Nicotiana benthamiana*. Ces expériences avaient pour objectif d'analyser l'effet de l'expression d'une sous-unité NF-Y sur la localisation de l'expression d'une autre sous-unité. Dans ces expériences, une protéine est exprimée en fusion traductionnelle N-terminale avec un tag 3HA, et l'autre sous-unité est exprimée en fusion traductionnelle N-terminale avec la YFP. Dans ce système, aucune sous-unité n'a d'influence sur la localisation des fusions traductionnelles YFP-NF-YA1 ou YFP-NF-YC2 (données non montrées). Par contre, concernant la sous-unité NF-YB2, nous avons pu montrer que le signal fluorescent émis par la construction YFP-NF-YB2 est en grande partie accumulé dans le noyau des cellules épidermiques de *Nicotiana benthamiana* lorsque cette sous-unité est co-exprimée avec la fusion traductionnelle 3HA-NF-YC2 (Figure 38E), alors que le signal fluorescent de la fusion YFP-NF-YB2 infiltrée seule est uniquement cytoplasmique (Figure 38D). Ces données tendent à montrer que NF-YB2 et NF-YC2 peuvent interagir dans le cytoplasme *in planta*, et que cette interaction permettrait la translocation du dimère formé dans le noyau, où il rejoindrait la sous-unité NF-YA1. Cette dynamique d'association serait cohérente à celle décrite pour le complexe NF-Y animal.

4. Conclusions générales du chapitre

Cette partie de ma thèse a permis à l'équipe d'accueil d'initier la caractérisation de complexes trimériques impliquant NF-YA1 au cours des étapes précoces de la symbiose entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. Dans un domaine plus fondamental, j'ai également pu initier l'étude de la cinétique d'association d'un complexe NF-Y trimérique de plantes. L'approche de criblage en double hybride a été une approche concluante pour identifier des sous-unités NF-YCs comme membres putatifs du/des complexe(s) NF-Y(s) recherché(s). Bien qu'aucune sous-unité NF-YB n'ait pu être identifiée lors de ce criblage, l'utilisation des données génomiques publiques nous a aidés à caractériser un membre potentiel NF-YB de ce(s) complexe(s), NF-YB2. Le rôle de complexes trimériques impliquant

NF-YA1 et NF-YC2 au cours de la nodulation chez *Medicago truncatula* fait l'objet d'étude de la thèse de Maël Baudin, un doctorant arrivé récemment dans l'équipe. Par des analyses d'interactions protéine-protéine dans la levure et des expériences de BiFC dans *Nicotiana benthamiana*, il a pu confirmer la présence prédite de NF-YB2 dans le(s) complexe(s) NF-Y(s) étudié(s). Un autre criblage en double hybride en utilisant NF-YC2 comme protéine appât a de plus permis d'identifier de nouvelles sous-unités NF-YBs agissant en partenariat avec NF-YC2 au cours de la nodulation, et l'interaction de ces sous-unités avec NF-YC2 ont également été confirmées *in planta* par la méthode de BiFC. De plus l'analyse fonctionnelle du rôle de NF-YC2 et de ses interacteurs NF-YBs est entreprise dans l'équipe par des approches de RNAi.

**Chapitre III : Implication des
facteurs de transcription MtNF-YA1
et MtNF-YA2 au cours de la
signalisation NF et de l'infection
rhizobienne**

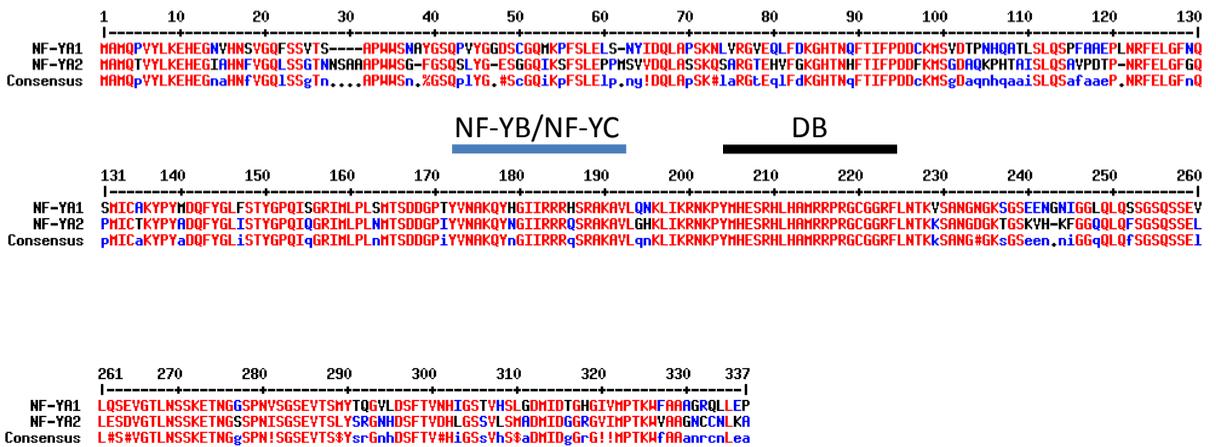


Figure 39. Alignement des séquences protéiques MtNF-YA1 et MtNF-YA2.

L'alignement des séquences a été réalisé à l'aide du logiciel Multalin (Corpet, 1988). Le domaine prédit d'interaction avec les sous-unités NF-YB et NF-YC (trait bleu) et de liaison aux éléments *cis* CCAAT (DB, trait noir) sont représentés.

1. Profils d'expression de *NF-YA1* et *NF-YA2* au cours des étapes précoces de la nodulation chez *Medicago truncatula*

Au-delà de son rôle au cours de la mise en place du nodule, l'observation des phénotypes d'infection épidermique du mutant *nf-ya1-1* et l'induction de l'expression du gène *NF-YA1* dans les poils absorbants en réponse aux NFs (Figure 33) suggèrent que ce gène est très probablement requis pour les événements de pré-infection et d'infection rhizobienne. Chez *Medicago truncatula*, le gène *NF-YA2* est un très proche homologue de *NF-YA1* (Laloum et al., 2012, Figure 32). Les séquences des protéines codées par ces deux gènes présentent plus de 70% d'identité (Figure 39), et les transcrits correspondants sont très majoritairement accumulés dans les tissus symbiotiques tels que les racines et les nodules chez *Medicago* (MtGEA). Ensemble, ces observations nous ont poussés à étudier les rôles respectifs de *NF-YA1* et *NF-YA2* pendant les étapes de pré-infection et d'infection rhizobienne chez *Medicago truncatula*. Dans un premier temps, nous avons étudié les profils d'expression spatio-temporelle des gènes *NF-YA1* et *NF-YA2* en réponse aux NFs, ou au cours des stades précoces d'infection rhizobienne, par des analyses de fusions transcriptionnelles *promoteur : GUS*, ainsi que par des analyses de PCR quantitative en temps réel.

1.1 L'expression de *NF-YA1* est fortement liée aux étapes de pré-infection et d'infection rhizobienne

1.1.1 Expression spatio-temporelle de *NF-YA1* en réponse à l'inoculation par *Sinorhizobium meliloti*

Les phénotypes de progression anormale des cordons d'infection dans les poils absorbants racinaires du mutant *nf-ya1-1* suggèrent que *NF-YA1* est requis pour l'infection rhizobienne. A l'exception de ces données génétiques, l'implication de ce gène dans la régulation de l'infection n'a pas été déterminée à ce jour. Pour comprendre cela, Philippe Laporte, stagiaire post-doctoral dans l'équipe d'accueil, a construit une fusion transcriptionnelle *pNF-YA1 : GUS* et suivi le profil d'expression de *NF-YA1* au cours de l'infection par *S. meliloti* et des premiers stades de développement nodulaire. La construction comprend une région promotrice de 2,2 kb en amont du site d'initiation de la transcription (TSS) de *NF-YA1* et la région 3'UTR de ce gène, connu pour être ciblée par miR169a (Figure 40A). La localisation de l'activité β -glucuronidase a été suivie après inoculation par

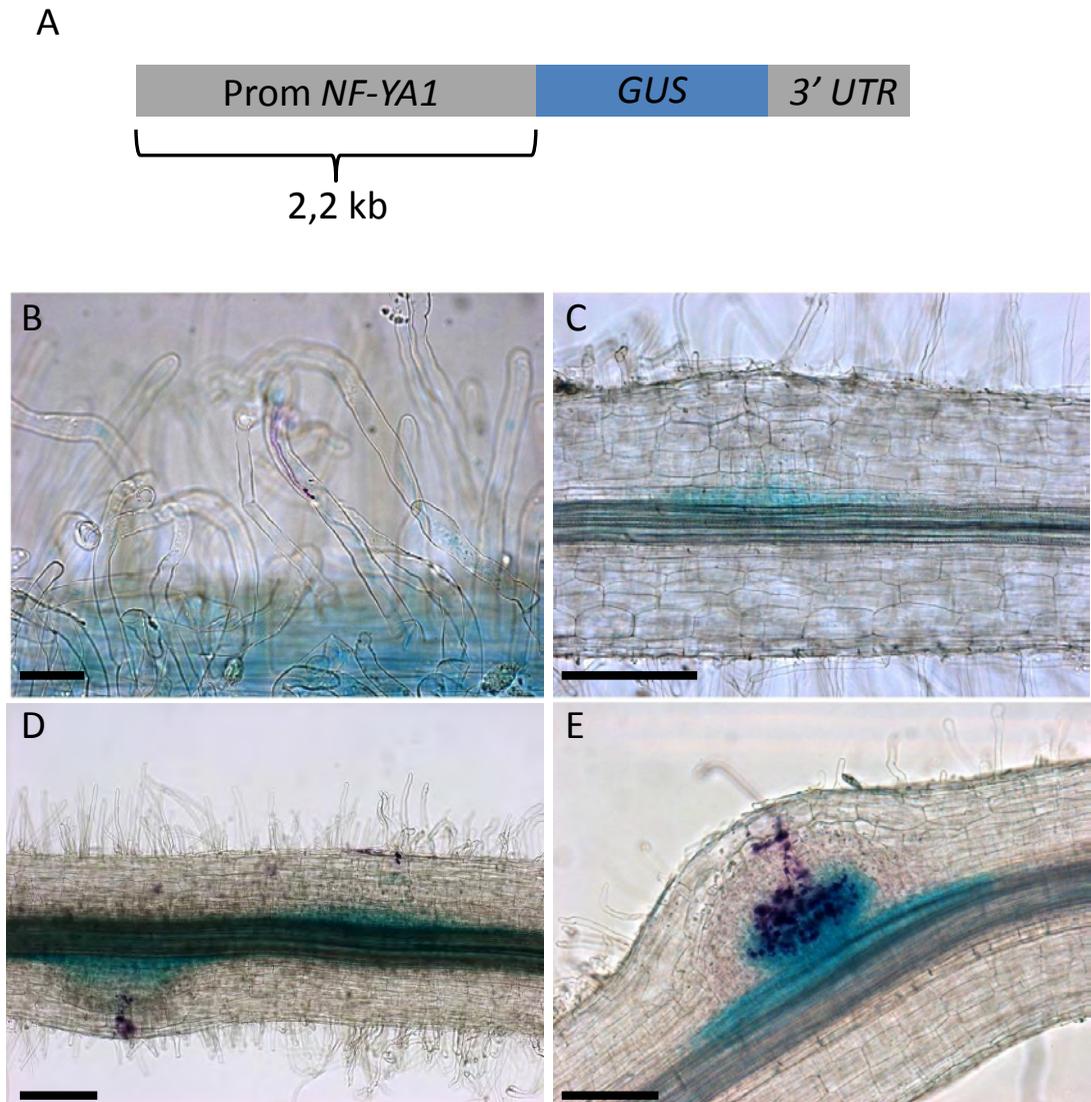


Figure 40. Localisation tissulaire de l'expression de *MtNF-YA1* au cours des étapes précoces de la symbiose entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*.

(A) Représentation schématique de la construction utilisée. Un fragment d'ADN génomique de 2,2 kb en amont du site d'initiation de la transcription de *NF-YA1* a été cloné en 5' du gène *GUS* codant pour la β -glucuronidase. La région 3'UTR de *NF-YA1* a été clonée en 3' du gène rapporteur *GUS*. (B-E) L'expression de la fusion transcriptionnelle *pNF-YA1 : GUS* a été analysée au cours de la progression du cordon d'infection dans les poils absorbants racinaires (B-C), puis dans les étapes de pénétration dans les cellules du cortex externe (D, E). La souche de *Sinorhizobium meliloti* utilisée exprime constitutivement la β -galactosidase (magenta). Au cours de la progression du cordon d'infection à travers un poil absorbant, l'activité *GUS* importante est observée dans les poils absorbants infectés (B). Un marquage bleu est également observé dans les cellules du cortex interne associées à la formation du primordium nodulaire, avant que le cordon d'infection ait pénétré dans ce tissu (C, D). Barres = 20 μ m (B), 2 mm (C-E).

D'après Philippe Laporte.

Sinorhizobium meliloti dans des racines transgéniques de *Medicago truncatula* exprimant la construction *pNF-YAI : GUS* décrite précédemment (Figure 40).

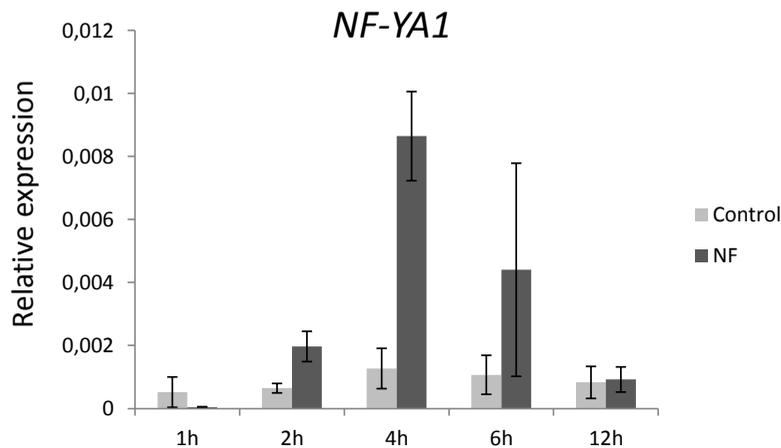
Alors que l'expression de la fusion *pNF-YAI : GUS* est très faible dans les racines non inoculées de *Medicago truncatula*, elle est sur-réglée dans les poils absorbants racinaires au cours des étapes de formation et de progression du cordon d'infection (Figure 40B). L'association de l'expression de *pNF-YAI : GUS* avec la croissance du cordon d'infection est également visualisée dans des étapes plus tardives d'infection, telles que la progression des bactéries dans les cellules corticales racinaires, où l'activité GUS est observée dans les cellules qui hébergent le cordon d'infection, ainsi que les cellules adjacentes à celles-ci (Figure 40E). L'expression de *NF-YAI* est également fortement associée à la formation du primordium nodulaire. En effet, en plus du processus d'infection à proprement parler, l'induction de l'activité *pNF-YAI : GUS* est observée dans les cellules du cortex interne, et peut être du péricycle, en amont du cordon d'infection (Figure 40C-D). L'observation microscopique de coupes fines nous permettra de définir plus précisément la nature des cellules qui expriment *NF-YAI* dans les tissus racinaires internes (expériences en cours). Le profil d'expression de *NF-YAI* suggère que ce gène pourrait être associé à la mise en place du processus d'organogénèse nodulaire. La forte expression de *NF-YAI* est également observée dans les cellules en division des « bumps » nodulaires (non montré). Ensemble, ces données montrent que *NF-YAI* est très précocément exprimé au cours de la nodulation chez *Medicago truncatula*. Cette expression est à la fois associée aux processus d'infection dans l'épiderme et le cortex racinaire, et à la formation des primordia nodulaires dans le cortex interne, en corrélation avec les premières divisions cellulaires. De manière intéressante, ce profil d'expression à la fois épidermique et dans le cortex interne en réponse aux rhizobia est également observé pour le gène codant pour le facteur de transcription NIN (Schäuser et al., 1999), régulateur essentiel de la réponse aux NFs au cours de l'infection rhizobienne et l'organogénèse nodulaire.

1.1.2 Expression de *NF-YAI* en réponse aux facteurs Nods

i. Dans des plantes sauvages de *Medicago truncatula*

Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressé à l'implication de *MtNF-YAI* au cours des étapes de pré-infection. Dans le but d'étudier la régulation de son expression racinaire en réponse aux NFs, des expériences de cinétique ont été réalisées. Pour ce faire, des

A



B

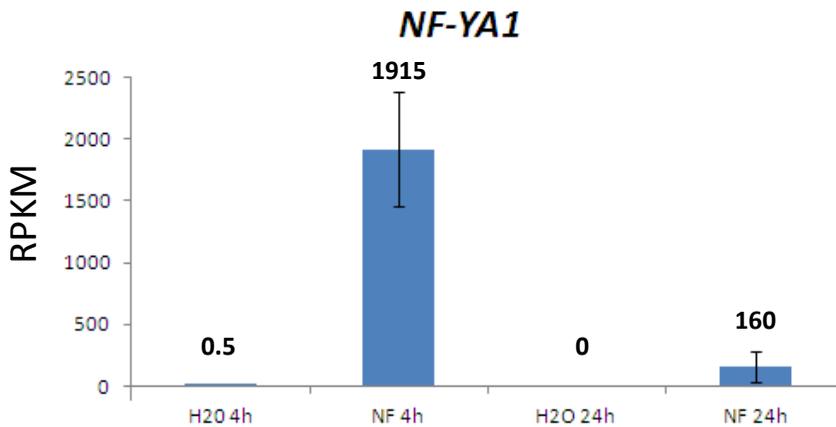


Figure 41. Expression de *NF-YA1* en réponse aux NFs.

(A) Niveaux relatifs des transcrits *NF-YA1* dans des racines de *Medicago truncatula* après 1, 2, 4, 6, ou 12 heures de traitement contrôle (gris clair), ou par des NFs concentrés à 10^{-8} M (gris foncé). Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types des moyennes d'expressions relatives dans 30 à 50 racines (trois répétitions biologiques). (B) Quantité de transcrits *NF-YA1* dans l'épiderme de la zone racinaire de pré-infection après 4 ou 24 heures de traitement contrôle (H_2O) ou par des NFs concentrés à 10^{-8} M. La quantité de transcrits est mesurée en RPKM, correspondant au nombre de lectures par millions de paires de bases séquencées.

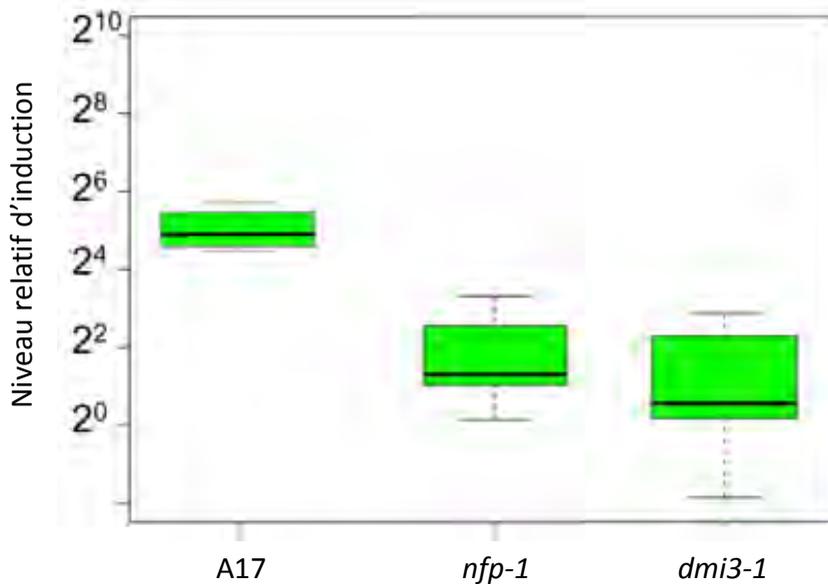
(B) D'après Pascal Gamas, version de décembre 2012 (communication personnelle).

jeunes plantules de *Medicago truncatula* ont été mises en culture dans des conditions aéroniques permettant une croissance rapide du système racinaire (système de caisson). Cinq jours après mise en culture, les plantes ont été transférées dans une solution contenant des NFs à une concentration de 10^{-8} M pendant 1, 2, 4, 6 et 12 heures. L'expression de *NF-YAI* dans les racines de *Medicago* a ensuite été mesurée par qRT-PCR. Une induction très précoce de l'expression de *NF-YAI* a pu être visualisée dès 2 heures de traitement aux NFs (Figure 41A). Dans les racines de *Medicago*, l'expression maximale de *NF-YAI* est observée après 4 heures de traitement, avec une induction d'un facteur dix dans ces conditions. L'expression de *NF-YAI* est transitoire, puisqu'une diminution du taux de transcrits racinaires est observée à partir de 6 heures après traitement, et un retour à son niveau basal d'expression est observé après 12 heures de traitement. En parallèle dans l'équipe, une analyse de quantification des transcrits de l'épiderme racinaire avant et après traitement aux NFs a été réalisée par la méthode de séquençage d'ARNs (projet ANR SYMBIMICS, P. Gamas, communication personnelle). Les plantes utilisées pour ces expériences ont été mises en croissance selon les mêmes conditions que celles décrites précédemment, et la région épidermique correspondant à la zone de pré-infection, déterminée par la région d'expression la plus forte d'une fusion transcriptionnelle *pENOD11 : GUS*, a été extraite après 4 ou 24 heures de traitement aux NFs, par la méthode de dissection au laser. Par cette méthode, il apparaît que *NF-YAI* est un des gènes les plus fortement induits par les NFs dans la zone épidermique de pré-infection après 4 heures de traitement aux NFs (Figure 41B). 24 heures après traitement, le niveau absolu de transcrits *NF-YAI* dans l'épiderme racinaire a fortement diminué, même s'il reste supérieur au niveau de transcrits présents dans les racines non-traitées (Figure 41B). Ces résultats confortent les données d'expression précédemment obtenues au cours de ma thèse, et indiquent que Mt*NF-YAI* joue probablement un rôle clé au cours des étapes de pré-infection dans l'épiderme racinaire chez *Medicago truncatula*.

ii. *NF-YAI* et la voie de signalisation NF

Dans le but de savoir si l'induction de l'expression de *NF-YAI* par les NFs dépend de la voie de signalisation NF et afin de tenter, le cas échéant, de positionner *NF-YAI* dans cette voie, nous avons analysé l'expression de *NF-YAI* en réponse aux NFs dans des plantes de *Medicago truncatula* mutées sur plusieurs gènes de la voie de signalisation NF, par des analyses de qRT-PCR. Les mutants utilisés lors de ces expériences sont *nfp*, *dmi3*, *nsp1*, *nsp2*, *bit1* (*ern1*), et *nin*. La quantification des transcrits a été réalisée dans des racines entières

A



B

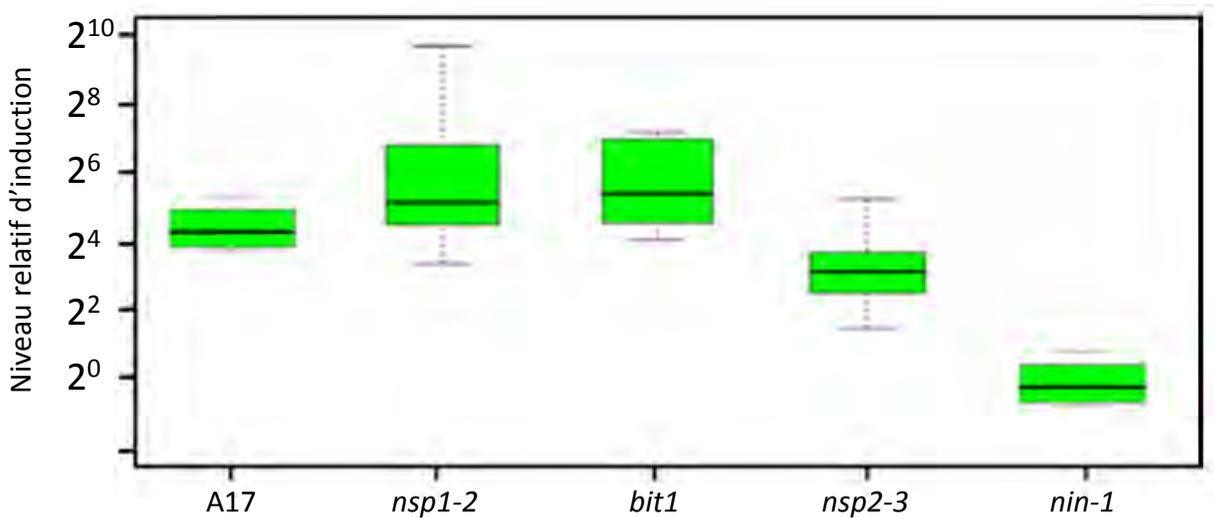


Figure 42. Expression relative de *NF-YA1* en réponse aux NFs dans les racines de mutants sur des gènes de la voie de signalisation NF.

(A) Boîtes à moustaches représentant les niveaux d'induction de l'expression de *NF-YA1* dans les racines de plantes de *Medicago truncatula* sauvages (A17) ou de mutants *nfp-1* et *dmi3-1* (30 à 50 racines, 3 à 5 répétitions biologiques). L'induction de l'expression de *NF-YA1* après 4 heures de traitement par des NFs (10^{-8} M) n'est pas observée chez les mutants *nfp-1* et *dmi3-1*. (B) Boîtes à moustaches représentant les niveaux d'induction de l'expression de *NF-YA1* dans les racines de plantes sauvages ou de mutants *nsp1-2*, *bit1*, *nsp2-3*, et *nin-1* (30 à 50 racines, 3 à 5 répétitions biologiques). L'induction de l'expression de *NF-YA1* par les NFs est absente dans les racines du mutant *nin-1*, alors qu'elle reste présente chez les mutants *nsp1-2*, *bit1*, et *nsp2-3*.

ayant subi 4 heures de traitement par des NFs. Lors de ces expériences, nous avons pu observer que le niveau de transcrits *NF-YA1* dans des racines traitées aux NFs est en moyenne 25 fois supérieur à celui observé après un traitement contrôle (Figure 42). Comme attendu, aucune induction de l'expression de *NF-YA1* par les NFs n'a pu être observée dans les racines de plantes mutées sur le gène *NFP* ou *DMI3* (Figure 42A). Ces résultats suggèrent que l'induction de *NF-YA1* dépend de la perception et de la cascade de signalisation activée par les NFs, et que *NF-YA1* agirait très probablement en aval de *DMI3*. Dans les racines des mutants *nsp1* et *bit1*, nous avons pu observer que l'expression de *NF-YA1* est induite par les NFs, et que ce niveau d'induction est comparable à celui observé dans les racines de plantes sauvages (Figure 42B). Dans le mutant *nsp2*, alors que l'induction de *NF-YA1* par les NFs est également observée, cette induction semble moins forte que celle observée chez les plantes sauvages, même si cette différence n'est pas statistiquement significative (Figure 42B). Cette observation met en avant l'existence de rôles potentiellement différents pour NSP1 et NSP2 en réponse aux NFs. En contraste avec les mutants pour les facteurs de transcription NSP1, NSP2 et ERN1, nous avons également observé que l'induction de *NF-YA1* est totalement inhibée dans les racines du mutant *nin* (Figure 42B). Ensemble, ces données suggèrent que l'action de *NF-YA1* est dépendante de la voie commune de signalisation en réponse aux NFs. L'induction de *NF-YA1* dans les mutants *nsp1* et *nsp2* suggère une action possible en amont ou en parallèle de ces facteurs de transcription. Néanmoins, l'absence d'induction de *NF-YA1* observée chez le mutant *nin* pourrait indiquer que NIN est directement ou indirectement impliqué dans la régulation positive de l'expression de *NF-YA1* lors des réponses précoces aux NFs.

iii. Expression de *NSP1*, *ERN1* et *ENOD11* chez le mutant *nf-ya1-1*

L'induction très précoce de l'expression de *NF-YA1* est dépendante de la perception des NFs et de la cascade de signalisation menant à l'activation de *DMI3*, mais semble indépendante des facteurs de transcription agissant en aval de cette voie de signalisation, et permettant l'expression de nodulines précoces telles qu'*ENOD11*. Nous avons donc testé l'hypothèse d'une action de *NF-YA1* en amont de l'induction d'*ENOD11*. La quantification des transcrits *NSP1*, *ERN1* et *ENOD11*, inductibles par les NFs dans des racines de plantes sauvages, a été réalisée dans des racines de plantes mutantes *nf-ya1-1* après 4 heures de traitement aux NFs, par la méthode de qRT-PCR. Dans ces conditions, nous n'avons pas détecté de différence significative concernant les niveaux d'accumulation des transcrits *NSP1*,

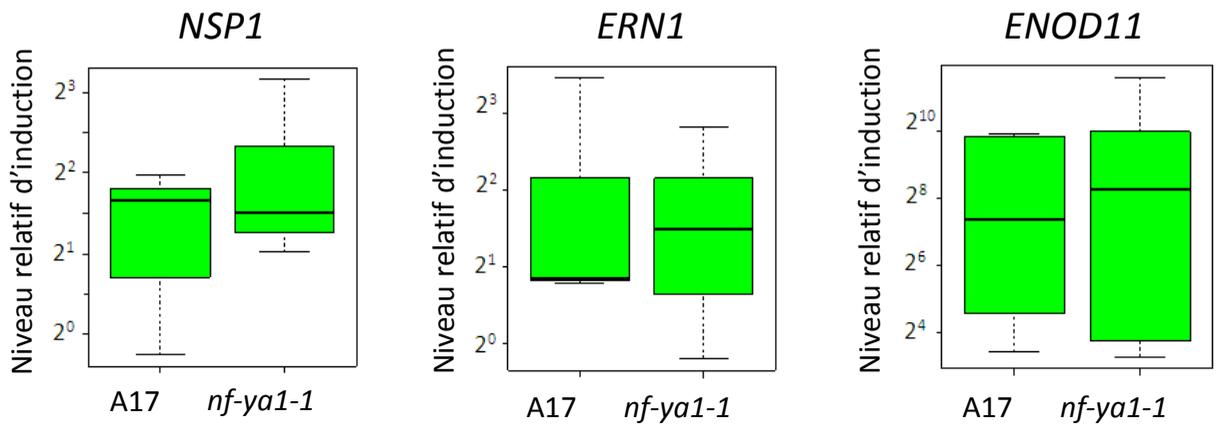


Figure 43. Expression relative des gènes *NSP1*, *ERN1* et *ENOD11* en réponse aux NFs dans les racines du mutant *nf-ya1-1*.

Boîtes à moustaches représentant les niveaux d'induction de l'expression de *NSP1*, *ERN1* et *ENOD11* dans les racines de plantes de *Medicago truncatula* sauvages (A17) ou du mutant *nf-ya1-1* (30 à 50 racines, 4 répétitions biologiques). Les niveaux d'induction de l'expression de ces gènes par les NFs (10^{-8} M) sont comparables entre les racines de plantes A17 et *nf-ya1-1*.

ERN1 ou *ENOD11* après traitement aux NFs entre les racines de plantes sauvages et du mutant *nf-ya1-1* (Figure 43). Néanmoins, ces données sont en contradiction avec des résultats obtenus dans l'équipe (A. Andriankaja, A. Niebel), selon lesquels des racines de mutants *nf-ya1-1* ou dans lesquelles l'expression de *NF-YA1* est sous-réglée présentent une induction d'*ENOD11* par les NFs plus faible que des racines contrôles, même si les temps de traitement aux NFs réalisés étaient de 16 heures.

1. 2 Analyse de l'expression spatio-temporelle de *NF-YA2*

Comme mentionné dans l'introduction, *MtNF-YA2* est le plus proche homologue de *MtNF-YA1* chez *Medicago truncatula*. De manière intéressante, les données de transcriptomique disponibles montrent que ce gène est très majoritairement exprimé dans les racines et les nodules de *Medicago* (MtGEA). Au cours de ma thèse, j'ai donc cherché à comprendre quels pourraient être les rôles relatifs de *NF-YA1* et *NF-YA2* au cours des étapes de mise en place de la symbiose entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*.

Dans un premier temps, nous avons analysé l'expression de *NF-YA2* à l'aide d'une fusion transcriptionnelle. La construction contient un fragment de 2,6 kb en amont de l'ATG de *NF-YA2*, cloné en 5' du gène *GUS*. Nous avons analysé l'expression de *NF-YA2* dans des racines transgéniques exprimant la construction *pNF-YA2 : GUS*. Que ce soit dans des racines non traitées ou traitées par une solution de NFs, nous avons observé une accumulation majoritaire de l'activité GUS dans l'épiderme racinaire et les traces vasculaires (Figure 44A-B). De plus, aucune différence en termes de niveau d'expression ou de localisation de l'activité GUS n'a pu être détectée avant ou après inoculation par *Sinorhizobium meliloti* (données non montrées). Cependant, ces résultats restent préliminaires, et des analyses plus fines de l'expression de la fusion transcriptionnelle *pNF-YA2 : GUS* sont en cours dans l'équipe d'accueil. De plus, ces observations sont en partie contradictoires avec le profil d'expression de *NF-YA2* dans les données provenant du projet ANR SYMBMICS (P. Gamas, communication personnelle), selon lesquelles en présence ou en absence de traitement par des NFs, les transcrits *NF-YA2* sont également présents dans le cortex racinaire.

Nous avons également mesuré le niveau relatif d'expression de *NF-YA2* dans les échantillons provenant des expériences de cinétique de traitement aux NFs décrites dans la partie 1. 1. 2. En accord avec les résultats obtenus par l'analyse de l'expression de la fusion transcriptionnelle *pNF-YA2 : GUS*, nous n'avons pas observé de différence dans

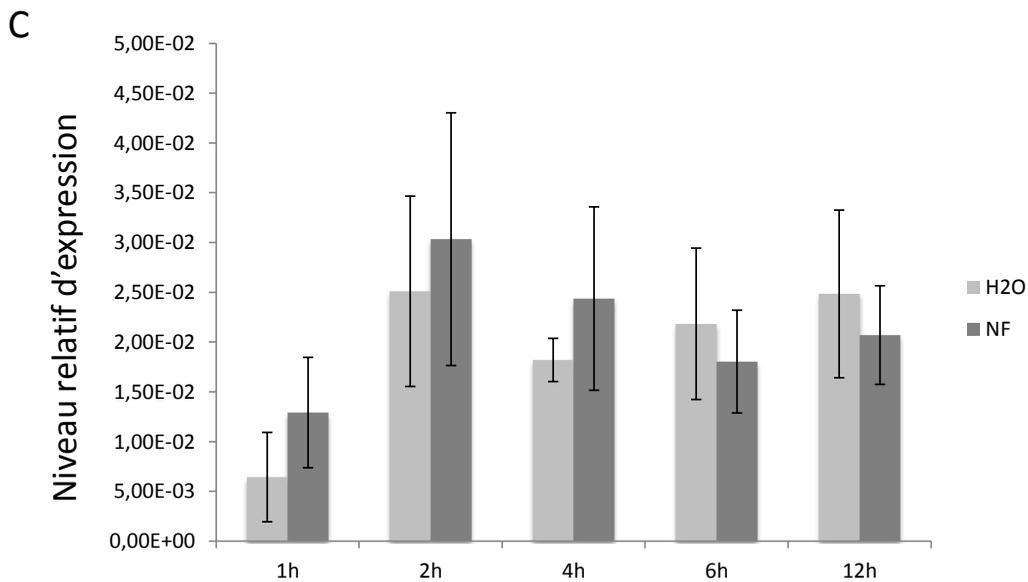
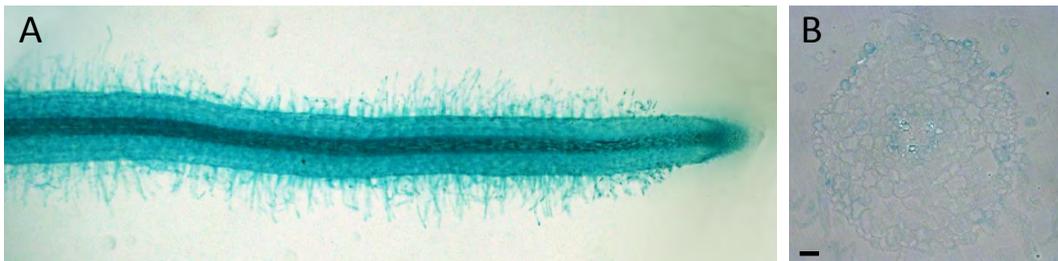


Figure 44. Analyses de l'expression de MtNF-YA2 en réponse aux NFs.

(A, B) L'expression de la fusion transcriptionnelle *pNF-YA2 : GUS* a été analysée dans des racines transgéniques après un traitement par des NFs concentrés à 10^{-9} M. L'activité GUS est accumulée dans les poils absorbants racinaires (A), ainsi que dans l'épiderme et les traces vasculaires (B). Barres = $10\mu\text{m}$. (C) Niveaux relatifs de transcrits *NF-YA2* dans des racines de *Medicago truncatula* après 1, 2, 4, 6, ou 12 heures de traitement contrôle (gris clair), ou par des NFs concentrés à 10^{-8} M (gris foncé). En comparaison au traitement contrôle (H₂O), le niveau relatif de transcrits *NF-YA2* n'est pas augmenté après les différents temps de traitement aux NFs réalisés. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types des moyennes d'expressions relatives dans 30 à 50 racines (trois répétitions biologiques).

l'accumulation des transcrits *NF-YA2* en réponse aux différents temps de traitement aux NFs réalisés (Figure 44C). Ensemble, ces résultats suggèrent que si *NF-YA2* joue effectivement un rôle au cours des étapes de pré-infection en réponse aux NFs, ce rôle ne semble pas pouvoir s'expliquer par un changement dans l'activité transcriptionnelle de ce gène.

1.3 Conclusions

Cette partie de ma thèse a consisté en la caractérisation fine de la régulation de l'expression de *MtNF-YA1* et *MtNF-YA2* au cours des étapes de mise en place de la nodulation chez *Medicago truncatula*. Par des analyses de fusions transcriptionnelles *promoteur : GUS*, nous avons pu montrer que *NF-YA1* est très majoritairement exprimé dans les tissus symbiotiques tels que l'épiderme racinaire ainsi que les cellules en division à l'origine des primordia nodulaires. Son expression semble de plus étroitement corrélée à l'infection rhizobienne dans les poils absorbants racinaires. L'analyse quantitative de l'expression de *NF-YA1* a montré également que ce gène est très fortement et très rapidement induit dans l'épiderme racinaire en réponse aux NFs, de manière dépendante de la cascade de signalisation NF, suggérant un rôle au cours des étapes de pré-infection. Les données d'expression recueillies lors de ces analyses indiquent que *NF-YA1* agit en aval du facteur de transcription *MtNIN* en réponse aux NFs. Cependant, si *NF-YA1* agit au cours de la signalisation en réponse aux NFs, son positionnement génétique dans la voie de signalisation décrite n'est pas élucidé. En effet, au cours de ma thèse, nous n'avons pas pu identifier de gène impliqué dans cette voie dont l'expression est dérégulée chez le mutant *nf-ya1-1*. Une des explications possibles à cela est l'existence de fonctions redondantes entre *NF-YA1* et *NF-YA2*, son plus proche homologue chez *Medicago truncatula*. Dans le but de comprendre les rôles relatifs de *NF-YA1* et *NF-YA2* au cours des étapes de pré-infection, nous avons donc dans un premier temps analysé le profil d'expression de *NF-YA2*. Même si l'expression de ce gène n'est pas inductible par les NFs, l'analyse de fusions transcriptionnelles *pNF-YA2 : GUS* a montré que cette expression est largement accumulée dans l'épiderme, et notamment dans la région décrite de pré-infection. Ces observations font de *NF-YA2* un candidat potentiel pour jouer un rôle au moins partiellement redondant avec *NF-YA1* au cours des étapes de réponses épidermiques aux NFs. L'hypothèse d'une action redondante dans le contrôle des étapes de pré-infection chez *Medicago truncatula* a donc été testée, et les résultats obtenus seront détaillés dans la seconde partie de ce chapitre.

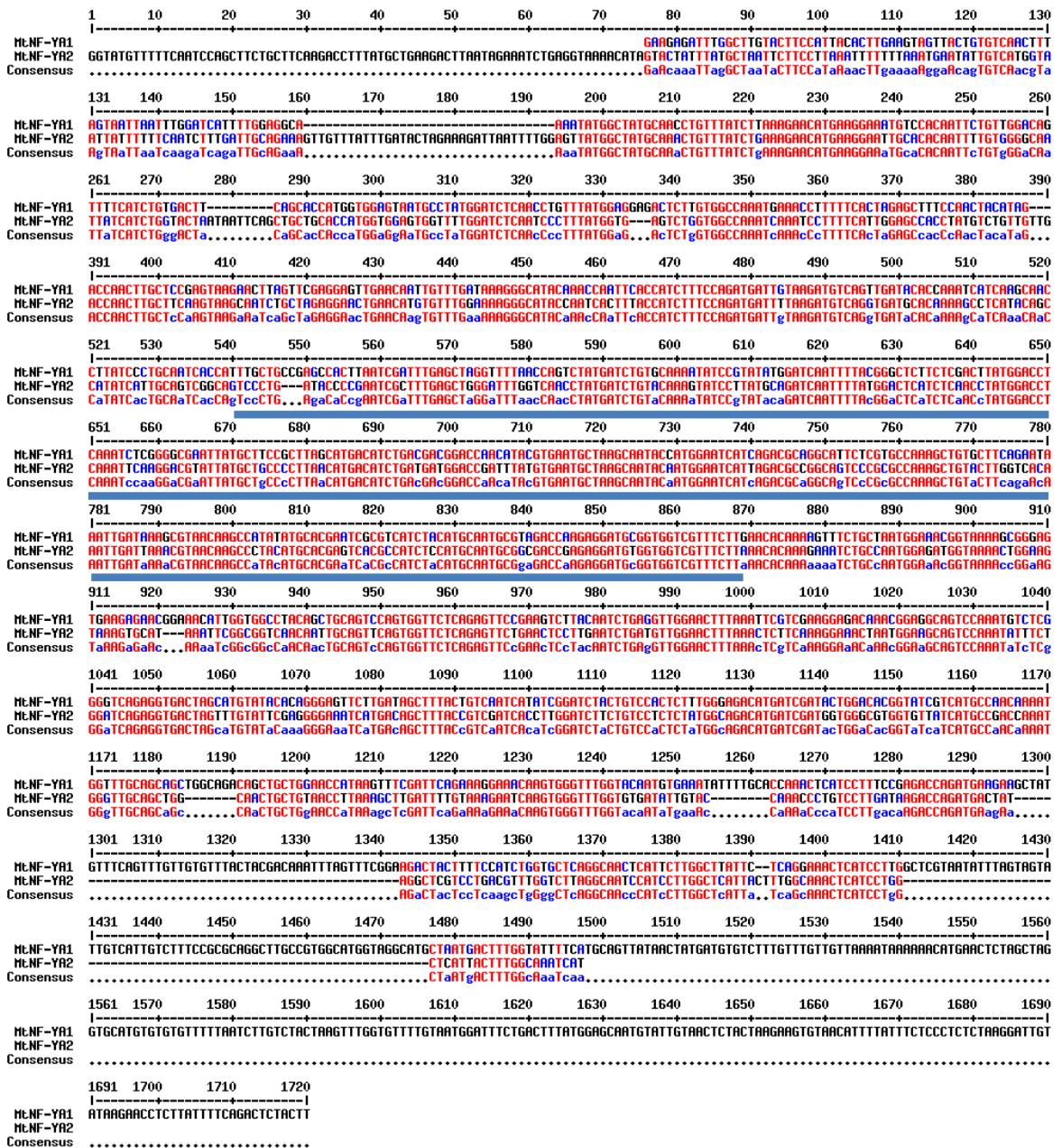


Figure 45. Alignement des séquences transcrits de *MtNF-YA1* et *MtNF-YA2*.

L'alignement des séquences a été réalisé à l'aide du logiciel Multalin (Corpet, 1988). La région ciblée par la construction *NF-YA* RNAi est soulignée par les barres bleues épaisses, et présente un fort niveau de conservation nucléotidique (~80%).

2. Etude fonctionnelle de *NF-YA1* et *NF-YA2* au cours des étapes de pré-infection

Dans le but de tester l'hypothèse de rôles redondants entre Mt*NF-YA1* et Mt*NF-YA2*, nous avons choisi d'exprimer une construction RNAi permettant de réduire l'expression de ces deux gènes dans des racines transgéniques de *Medicago truncatula*. Les ADN complémentaires correspondant à *NF-YA1* et *NF-YA2* partagent 71% d'identité. Ce score est de plus largement augmenté (81%) dans la région codant pour les domaines conservés d'interaction protéine-protéine au sein du trimère NF-Y et de liaison aux boîtes CCAAT des promoteurs cibles. Nous avons donc décidé d'amplifier un fragment d'ADN correspondant à la région codant pour les domaines conservés chez *NF-YA1*, puis ce fragment a été cloné en sens et en anti-sens dans un vecteur permettant l'expression d'une structure en tige-boucle du fragment d'ADN cloné, appelée *NF-YA RNAi*. La région d'ADNc cloné est indiquée dans la figure 45.

2.1 Gènes ciblés par la construction *NF-YA RNAi*

Nous avons dans un premier temps testé l'efficacité de la construction *NF-YA RNAi* dans des racines transgéniques de *Medicago truncatula* non traitées, ou ayant subi un traitement de 6 heures par des NFs. Ainsi, les niveaux de transcrits codant pour toutes les sous-unités NF-YAs identifiées à ce jour chez *Medicago truncatula* ont été mesurés dans les racines des plantes transgéniques *NF-YA RNAi* et *GUS RNAi*, par PCR quantitative en temps réel. Dans les racines transformées par la construction *NF-YA RNAi*, nous avons pu observer une diminution des niveaux de transcrits de *NF-YA1* et *NF-YA2* d'un facteur 5 en moyenne par rapport aux racines de plantes transformées par la construction contrôle *GUS RNAi*, que ce soit après un traitement contrôle (eau), ou après un traitement par des NFs (Figure 46A-B). De plus, dans les racines *NF-YA RNAi*, nous n'avons pas observé de différence dans l'accumulation des transcrits pour tous les autres *NF-YAs*, à l'exception du gène *NF-YA6*, pour lequel une faible diminution de l'expression a été observée (Figure 46C). Néanmoins, alors que toutes les racines dont l'expression de *NF-YA1* est réduite montrent également une réduction de l'expression de *NF-YA2*, les racines dont l'expression de *NF-YA6* est réduite sont distribuées aléatoirement. Ainsi, la majorité des racines dans lesquelles les taux de transcrits *NF-YA1* et *NF-YA2* sont réduits ne montrent pas de réduction pour les taux de transcrits *NF-YA6*. Ensemble, ces résultats suggèrent que la construction *NF-YA RNAi* permet de diminuer

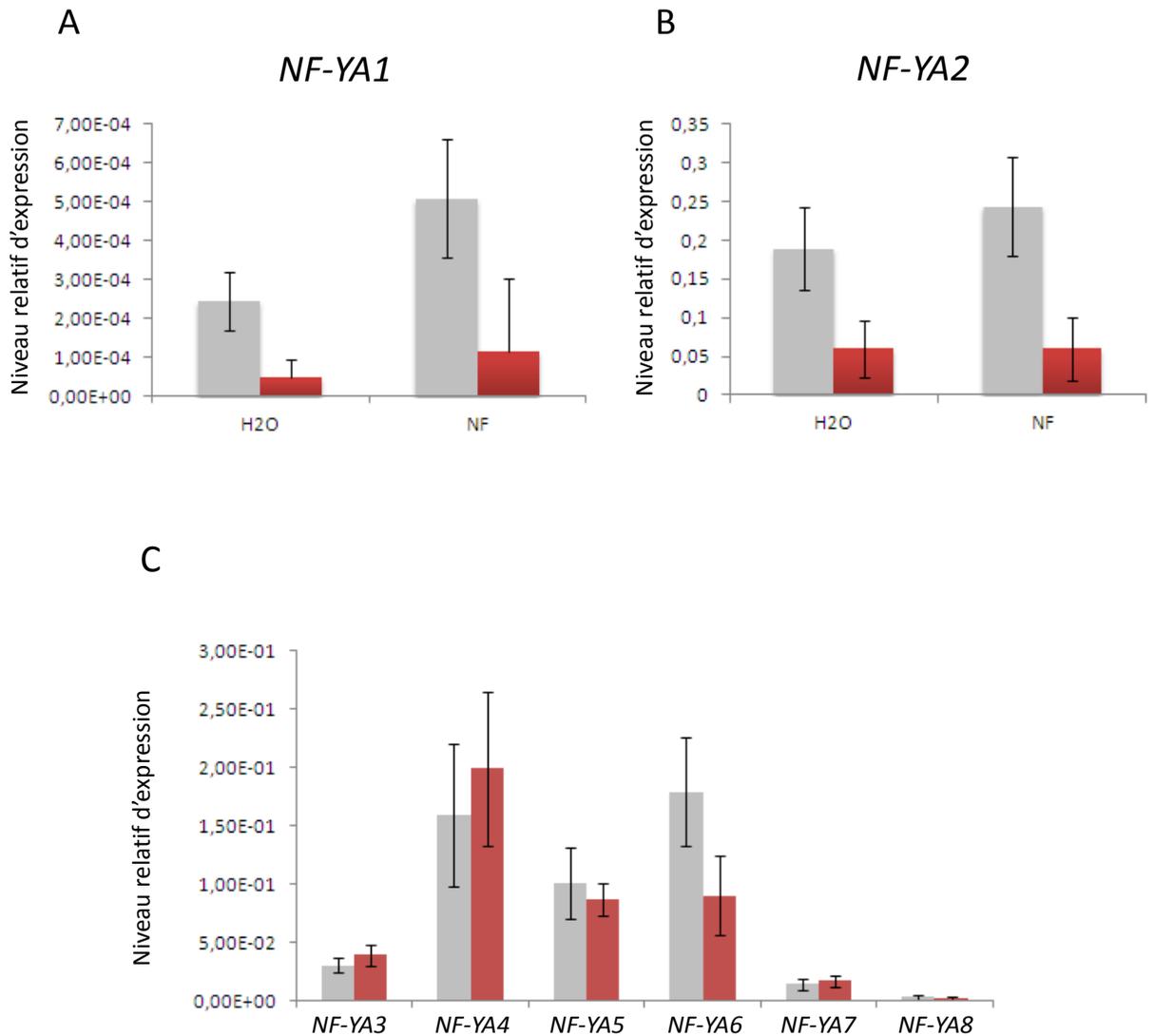


Figure 46. Analyse par qRT-PCR de l'expression des gènes *NF-YAs* dans des racines transgéniques *NF-YA RNAi* de *Medicago truncatula*.

(A, B) Les niveaux de transcrits *NF-YA1* (A) et *NF-YA2* (B) sont fortement réduits dans les racines *NF-YA RNAi* (rouge) en comparaison aux racines contrôles *GUS RNAi* (gris), en réponse à un traitement contrôle (H2O) ou par des NFs (10^{-9} M). (C) Analyse de l'expression des autres *NF-YAs* répertoriés à ce jour chez *Medicago truncatula* dans des racines *GUS RNAi* (gris) ou *NF-YA RNAi* (rouge). Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types des moyennes d'expressions relatives dans 20 à 30 échantillons individuels.

spécifiquement l'expression de *NF-YA1* et *NF-YA2*. Cet outil s'avère donc efficace pour étudier la redondance fonctionnelle probable entre ces deux gènes.

2.2 Expression de *NSPI*, *ERN1* et *ENOD11* en réponse aux NFs

Après avoir vérifié que la construction *NF-YA* RNAi permettait la réduction de l'expression de *NF-YA1* et *NF-YA2*, nous avons analysé les phénotypes des plantes *NF-YA* RNAi dans des étapes précoces de la symbiose rhizobienne telles que les premières réponses des racines aux NFs. Ainsi, nous avons testé l'expression de gènes précocement induits par les NFs et jouant un rôle au cours de la voie de signalisation NF. Les gènes testés sont *NSPI*, *ERN1*, et *ENOD11*. Pour ce faire, des racines transgéniques provenant de plantes composites *NF-YA* RNAi et *GUS* RNAi ont été traitées par des NFs pendant 6 heures, puis les niveaux de transcrits *NSPI*, *ERN1*, et *ENOD11* ont été quantifiés par la méthode de qRT-PCR. Dans les racines des plantes transformées par le vecteur *GUS* RNAi, l'expression de *NSPI* en réponse aux NFs est induite d'un facteur 2 en moyenne (Figure 47A), alors qu'une induction de 4 fois en moyenne a pu être observée pour l'expression de *ERN1* (Figure 47B). De plus, en accord avec les données connues sur l'expression du gène marqueur *ENOD11* en réponse aux NFs, nous avons observé une très forte induction de son expression en réponse aux NFs. Cependant, les transcrits *ENOD11* sont très faiblement accumulés dans des racines non traitées par les NFs, et par conséquent, le niveau relatif d'induction de ce gène par les NFs n'a pu être quantifié. Dans les racines *NF-YA* RNAi, alors que l'expression de *NSPI* est induite par un traitement aux NFs selon le même ratio que celui observé dans des racines *GUS* RNAi (Figure 47A), nous avons observé une très forte diminution de l'induction du gène *ENOD11* (Figure 47C). Comme l'expression d'*ENOD11* est régulée positivement par le facteur de transcription ERN1 au cours des étapes de pré-infection en réponse aux NFs (Andriankaja et al., 2007; Cerri et al., 2012), nous avons également analysé le niveau d'induction de *ERN1* dans les racines de plantes *NF-YA* RNAi. En accord avec le rôle décrit de ERN1 comme régulateur positif de l'expression d'*ENOD11*, nous avons observé une forte diminution du niveau de transcrits *ERN1* dans les racines RNAi traitées par des NFs (Figure 47B). Ensemble, ces données suggèrent que *NF-YA1* et/ou *NF-YA2* sont des régulateurs positifs directs ou indirects de l'expression de *ERN1* et *ENOD11* dans les racines de *Medicago truncatula* en réponse aux NFs. En outre, dans les racines *NF-YA* RNAi, il est possible que la dérégulation de l'expression de *NF-YA2* seule soit suffisante à la diminution de l'expression de *ERN1* et

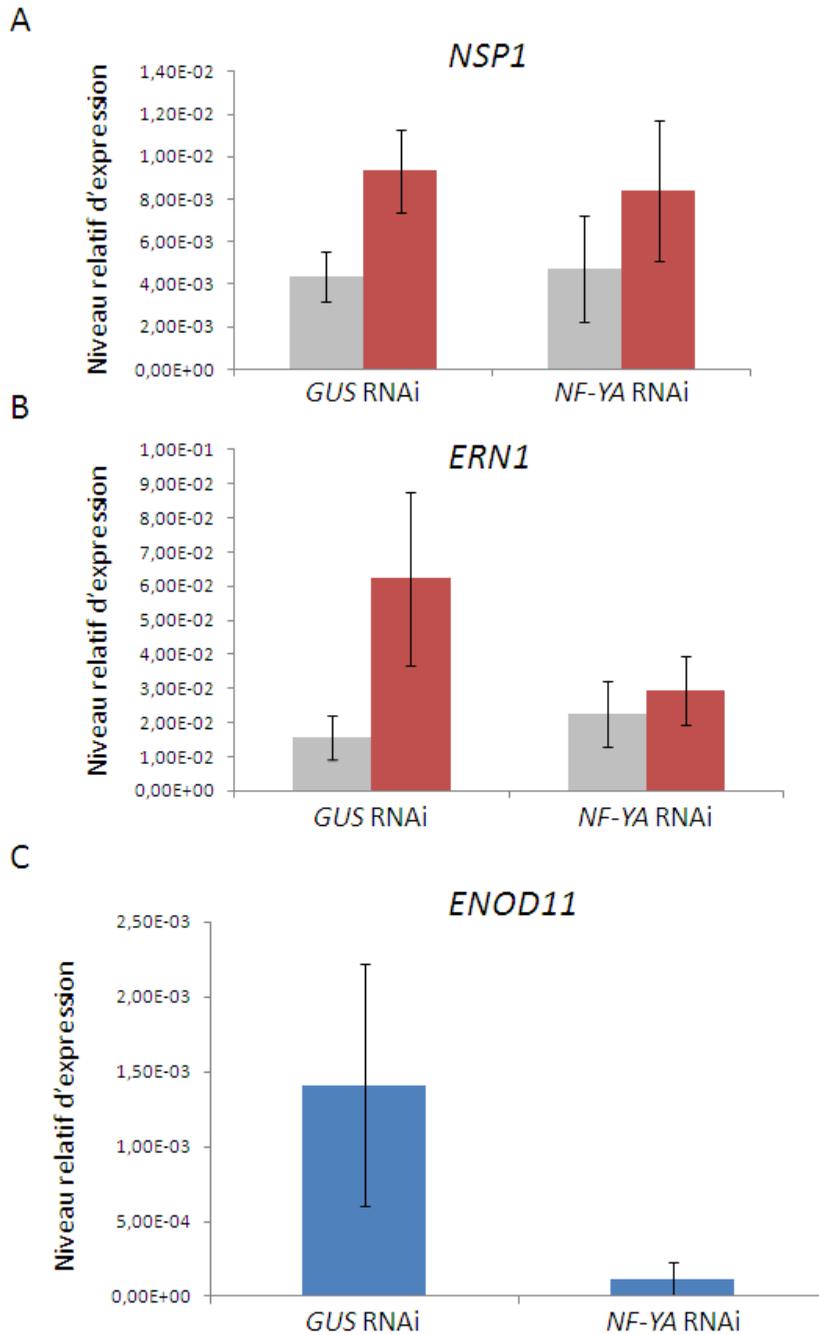


Figure 47. L'expression de *ERN1* et *ENOD11* en réponse aux NFs est très altérée chez les plantes *NF-YA* RNAi. (A, B) Analyse par qRT-PCR de l'expression des gènes *NSP1*, *ERN1* dans les racines de plantes *GUS* RNAi et *NF-YA* RNAi, après un traitement contrôle (gris), ou par des NFs concentrés à 10^{-9} M (rouge). (C) Niveaux relatifs d'expression d'*ENOD11* dans les racines de plantes *GUS* RNAi et *NF-YA* RNAi après un traitement par des NFs concentrés à 10^{-9} M. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types des moyennes d'expressions relatives dans 20 à 30 échantillons individuels.

ENOD11, et nous ne pouvons pas exclure des résultats obtenus que seul NF-YA2 puisse accomplir ce rôle en amont de *ERN1* et *ENOD11*.

2.3 Les plantes *NF-YA* RNAi sont sévèrement affectées dans les étapes de pré-infection et d'infection par *Sinorhizobium meliloti*

Nous avons également analysé les phénotypes des racines transformées par la construction *NF-YA* RNAi après inoculation par *Sinorhizobium meliloti*. Tout d'abord, nous avons compté le nombre de nodules formés à 7, 12, et 16 jours après inoculation sur des racines de plantes *NF-YA* RNAi en comparaison aux racines de plantes transformées par la construction RNAi *GUS*. Comme l'indique la figure 48, le nombre de nodules par racine de plantes *NF-YA* RNAi est très fortement réduit en comparaison au nombre de nodules par racine de plantes contrôles à 7, 12, ou 16 jours après inoculation (Figure 48A). En effet, alors qu'en moyenne nous avons compté 6, 8, et 9 nodules par racine de plantes contrôles à 7, 12, 16 jours après inoculation, respectivement, une moyenne de seulement un ou deux nodules par plante *NF-YA* RNAi a été calculée. De plus, alors qu'à 16 jours après inoculation, toutes les plantes transformées par la construction *GUS* RNAi ont formé des nodules, encore 50% de plantes *NF-YA* RNAi ne présentent pas de nodule (Figure 48B), suggérant que ces plantes sont retardées voir bloquées dans le processus de nodulation.

L'infection rhizobienne a également été suivie dans les plantes *NF-YA* RNAi. Alors que les cordons d'infection formés sur les racines contrôles forment des structures linéaires caractéristiques (Figure 48E) et parviennent à progresser à travers les tissus racinaires plus internes, la plupart des cordons d'infection formés sur les plantes RNAi sont très précocement arrêtés, le plus souvent au stade de micro-colonies formées à l'apex des poils absorbants racinaires (Figure 48C). Cependant, certains cordons d'infection peuvent également progresser à travers les tissus racinaires plus internes et déclencher la formation de nodules infectés. Cette observation est probablement liée au fait que même si la construction RNAi permet de réduire considérablement l'expression de *NF-YA1* et *NF-YA2*, l'efficacité de réduction de l'expression de ces gènes n'est pas la même pour chaque plante. Néanmoins, à trois jours après inoculation, alors que les racines transformées par la construction *GUS* RNAi présentent de nombreux « bumps » infectés par les rhizobia (Figure 48F), les « bumps » nodulaires ne sont que très rarement observés chez les plantes *NF-YA* RNAi quand les

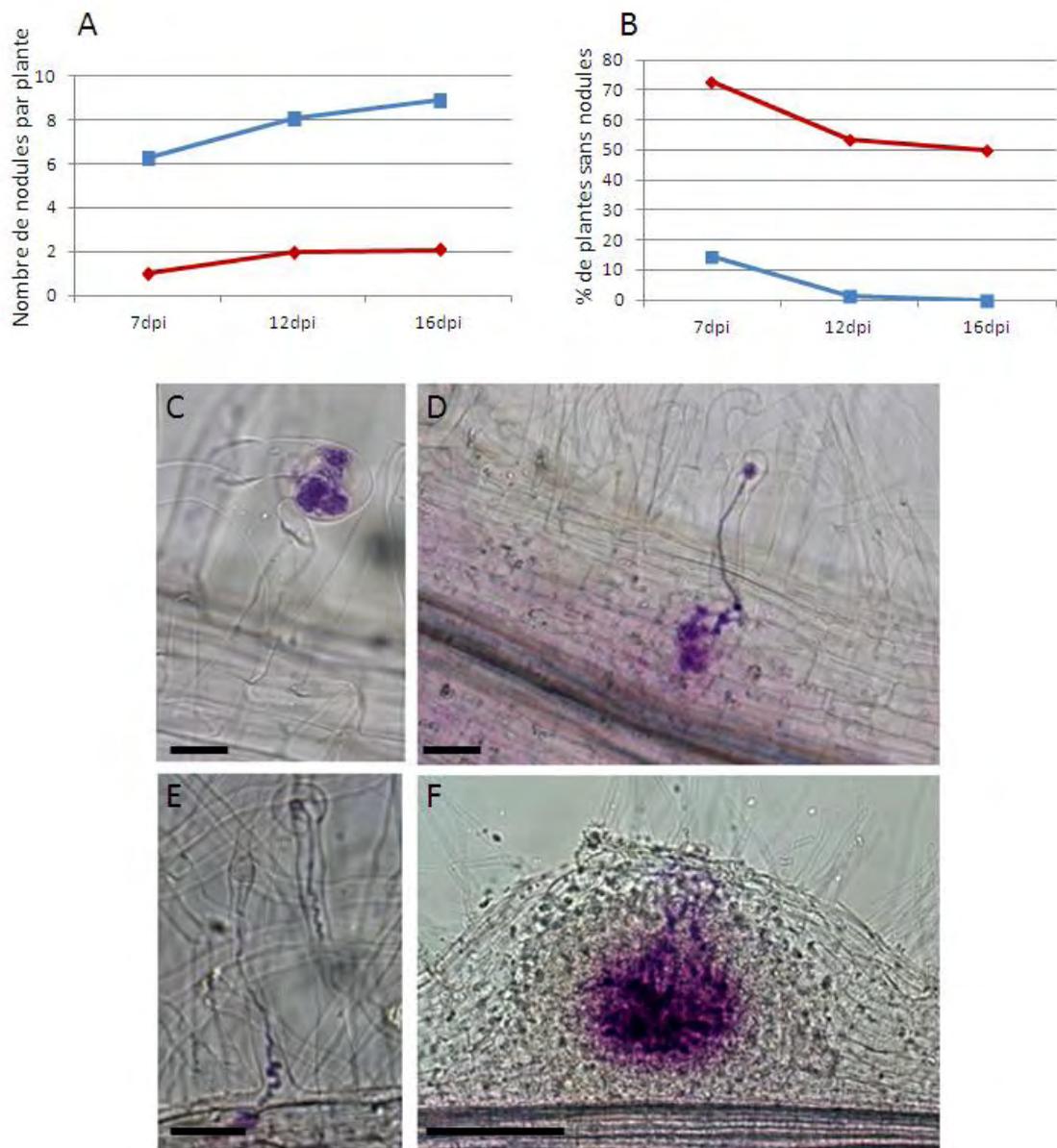


Figure 48. Les racines *NF-YA* RNAi sont altérées dans les étapes précoces de la nodulation chez *Medicago truncatula*.

(A, B) Les racines *NF-YA* RNAi présentent une forte réduction du nombre de nodules formés après inoculation par *Sinorhizobium meliloti*. (A) Nombre de nodules comptés par système racinaire de plantes *NF-YA* RNAi (rouge) et *GUS* RNAi (bleu) à 7, 12, et 16 jours après inoculation (dpi). (B) Pourcentage de plantes sans nodule à 7, 12, et 16 dpi. (C-F) Phénotypes des racines *NF-YA* RNAi (C, D) et *GUS* RNAi (E, F) trois jours après inoculation par une souche de *Sinorhizobium meliloti* exprimant le gène *LacZ* (magenta). Les cordons d'infection observés dans les poils absorbants des plantes *NF-YA* RNAi sont majoritairement arrêtés à l'apex des poils où une accumulation exagérée de rhizobia est observée (C), alors que la majorité des cordons observés dans les poils absorbants des plantes *GUS* RNAi progressent sous forme de structures linéaires (E). Certains cordons d'infection parviennent à progresser dans les tissus racinaires internes des plantes *NF-YA* RNAi (D) mais la formation de primordia nodulaires comme ceux observés dans les racines des plantes *GUS* RNAi (F) ne se produit que très rarement. Barres = 10 μ m (C), 20 μ m (D, E) et 2 mm (F).

bactéries progressent dans les tissus corticaux racinaires (Figure 48D). Ensemble, ces données suggèrent que la dérégulation des gènes *NF-YA1* et *NF-YA2* aboutit à un blocage ou une altération drastique de l'organogénèse nodulaire et de l'infection rhizobienne dans les poils absorbants racinaires. Il est très probable que les phénotypes altérés d'infection et d'organogénèse nodulaire observés soient une conséquence de la dérégulation de l'expression des gènes *ERN1* et *ENOD11* dans les racines des plantes *NF-YA* RNAi. La génération de lignées *NF-YA* RNAi stables est en cours dans l'équipe d'accueil.

2.4 Initiation de l'étude fonctionnelle de *NF-YA2* en réponse aux NFs

Dans le but de tester l'hypothèse selon laquelle *NF-YA2* est le seul *NF-YA* de *Medicago truncatula* impliqué dans le contrôle de l'expression de *ERN1* et *ENOD11* en réponse précoce aux NFs, nous avons choisi d'exprimer une construction RNAi visant à réduire spécifiquement l'expression de *NF-YA2* dans des racines transgéniques de *Medicago truncatula*. Pour ce faire, un fragment d'ADN de la région 3'UTR du gène *NF-YA2* a été cloné en sens et en anti-sens pour permettre l'expression d'une structure en tige-boucle de cette région, appelée *NF-YA2* RNAi, dans les racines de *Medicago truncatula*. Dans le but de s'assurer que la construction *NF-YA2* RNAi réduit spécifiquement l'expression de *NF-YA2* et non celle des autres *NF-YAs* de *Medicago truncatula*, nous avons analysé l'expression de tous les Mt*NF-YAs* dans les racines transgéniques *GUS* RNAi ou *NF-YA2* RNAi. Dans les racines transgéniques *NF-YA2* RNAi, nous avons observé une diminution de l'accumulation des transcrits *NF-YA2* d'un facteur 4 en moyenne (Figure 49A). De plus, aucun des autres *NF-YAs* ne voit son expression dérégulée dans les racines *NF-YA2* RNAi en comparaison aux racines transgéniques *GUS* RNAi (Figure 49B-C). Ces résultats suggèrent que la construction RNAi utilisée dérégule spécifiquement l'expression de *NF-YA2* dans les racines de *Medicago truncatula*. Nous avons ensuite analysé l'expression de *NSP1*, *ERN1* et *ENOD11* dans les racines de plantes *NF-YA2* RNAi en réponse à un traitement de 6 heures par des NFs, et comparé ces niveaux relatifs d'expression avec ceux des racines de plantes *GUS* RNAi. Dans ces conditions nous n'avons pas observé de différence significative dans l'accumulation des transcrits correspondants entre les racines contrôles et les racines RNAi (Figure 49D). Ces résultats suggèrent que la réduction de l'expression de *NF-YA2* seule ne suffit pas à inhiber l'induction par les NFs de l'expression de *ERN1* ou *ENOD11*, comme c'est le cas lorsque les expressions de *NF-YA1* et *NF-YA2* sont toutes les deux réduites. Cependant, nous ne pouvons

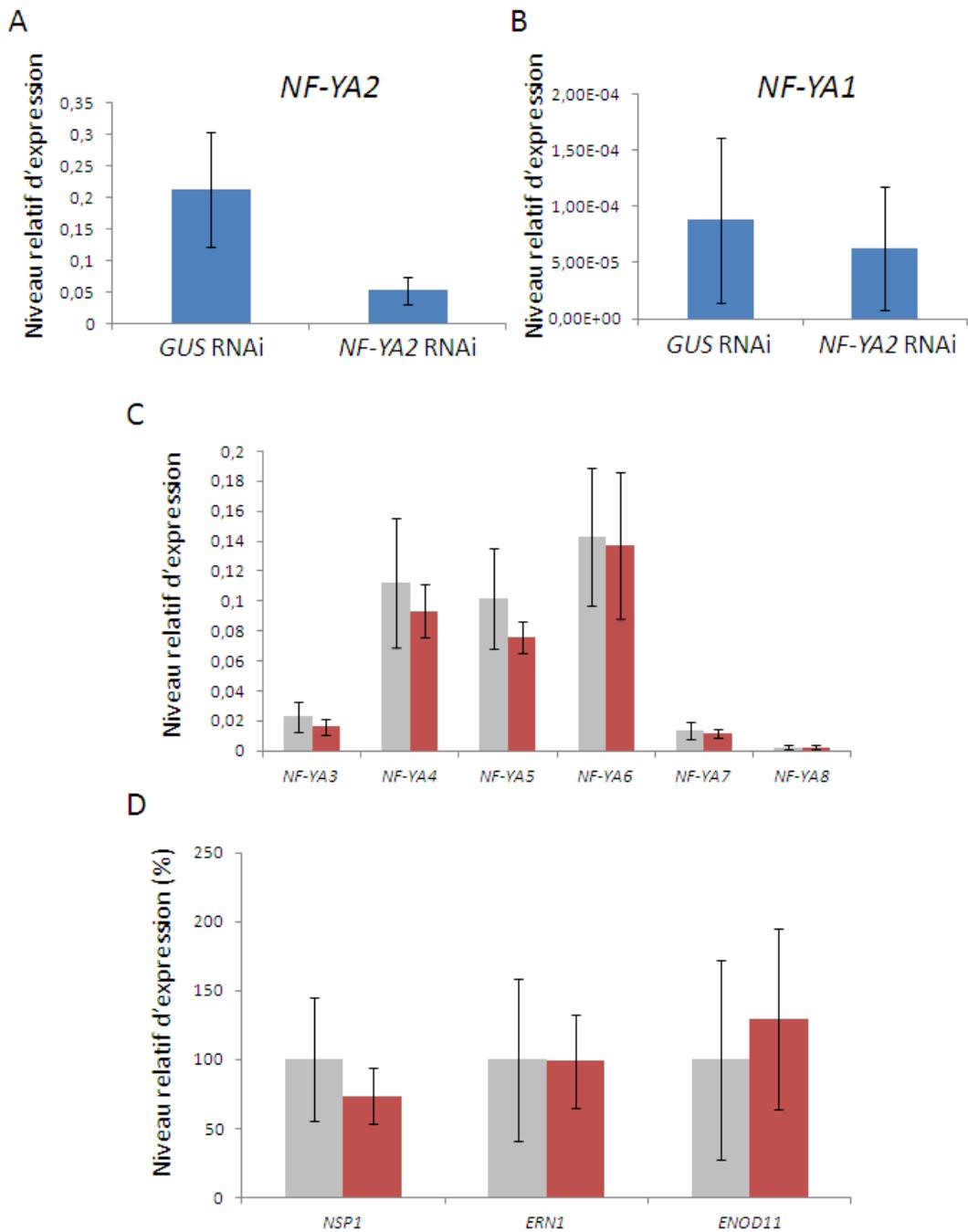


Figure 49. L'expression d'*ENOD11* et de *ERN1* n'est pas affecté dans les racines des plantes *NF-YA2* RNAi en réponse aux NFs.

(A-C) La construction *NF-YA2* RNAi réduit spécifiquement l'expression de *NF-YA2* dans les racines transgéniques de *Medicago truncatula*. (A, B) Expression de *NF-YA2* (A) et *NF-YA1* (B) dans des racines *GUS* RNAi ou *NF-YA2* RNAi traitées pendant 6 heures par des NFs concentrés à 10^{-9} M. (C, D) Expression des autres *NF-YAs* de *Medicago truncatula* et de *NSP1*, *ERN1*, et *ENOD11* en réponse aux NFs dans des racines de plantes *GUS* RNAi (gris) ou *NF-YA2* RNAi (rouge). Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types des moyennes d'expressions relatives dans 20 à 30 échantillons individuels.

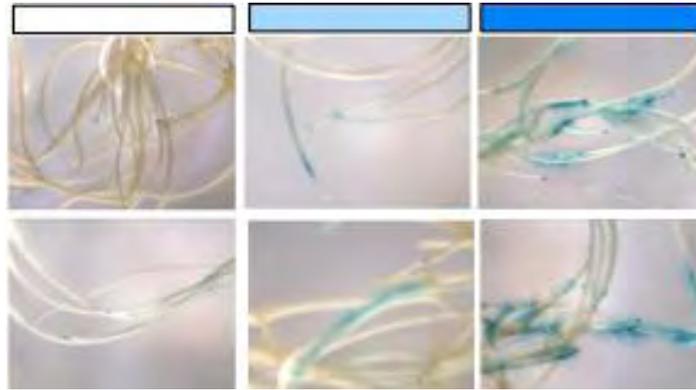
pas exclure que le niveau résiduel de transcrits présents dans les racines *NF-YA2* RNAi soit suffisant à l'activité des gènes qu'il régule en aval. De plus, les résultats obtenus ici restent préliminaires, et seulement une répétition biologique a été réalisée à ce jour.

2.5 Conclusions

Cette partie de ma thèse a eu comme objectif principal d'étudier la redondance fonctionnelle probable entre *NF-YA1* et *NF-YA2* au cours des étapes de pré-infection chez *Medicago truncatula*. L'utilisation d'une construction RNAi dérégulant spécifiquement l'expression de *NF-YA1* et *NF-YA2* a permis de montrer que ces deux gènes sont impliqués très précocement au cours de la symbiose entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. Les racines *NF-YA* RNAi présentent des phénotypes d'infection dans les poils absorbants encore plus sévères que le mutant *nf-ya1-1*, avec une majorité de cordons d'infections arrêtés au stade de formation des micro-colonies à l'apex des poils. Nous avons également montré que ces phénotypes sont très probablement associés à une forte réduction de l'expression de *ERN1* et *ENOD11* en réponse aux NFs de *Sinorhizobium meliloti*. Ces données suggèrent que *NF-YA1* et/ou *NF-YA2* sont impliqués positivement dans la régulation directe ou indirecte de *ERN1* et *ENOD11*. De manière intéressante, les défauts d'infection rhizobienne observés dans les racines inoculées des plantes composites *NF-YA* RNAi sont très similaires à ceux observés chez le mutant *bit1-1* (*ern1*) qui est également sévèrement affecté dans l'initiation des cordons d'infection (Middleton et al., 2007).

Dans le but de savoir si la réduction seule de l'expression de *NF-YA2* aboutissait également à une réduction de l'expression de *ERN1* et *ENOD11* en réponse aux NFs, nous avons initié l'étude fonctionnelle spécifique de ce gène, également par une approche de RNAi. Même si les résultats restent préliminaires, l'induction encore présente de l'expression de *ERN1* et *ENOD11* dans les racines *NF-YA2* RNAi traitées par des NFs suggère que *NF-YA2* n'est pas responsable à lui seul du contrôle de l'expression de ces gènes. De plus, cette observation vient appuyer l'hypothèse d'une redondance fonctionnelle entre les facteurs de transcription *NF-YA1* et *NF-YA2* dans le contrôle des étapes de pré-infection via la régulation positive des gènes *ERN1* et *ENOD11*, puisqu'une telle réduction de l'activité transcriptionnelle de ces gènes en réponse aux NFs n'est ni observée chez le mutant *nf-ya1-1*, ni dans les racines de plantes *NF-YA2* RNAi. Cependant, même si ces résultats pourraient suggérer une action de *NF-YA1* et *NF-YA2* en amont de l'induction de l'expression de *ERN1*

A



B

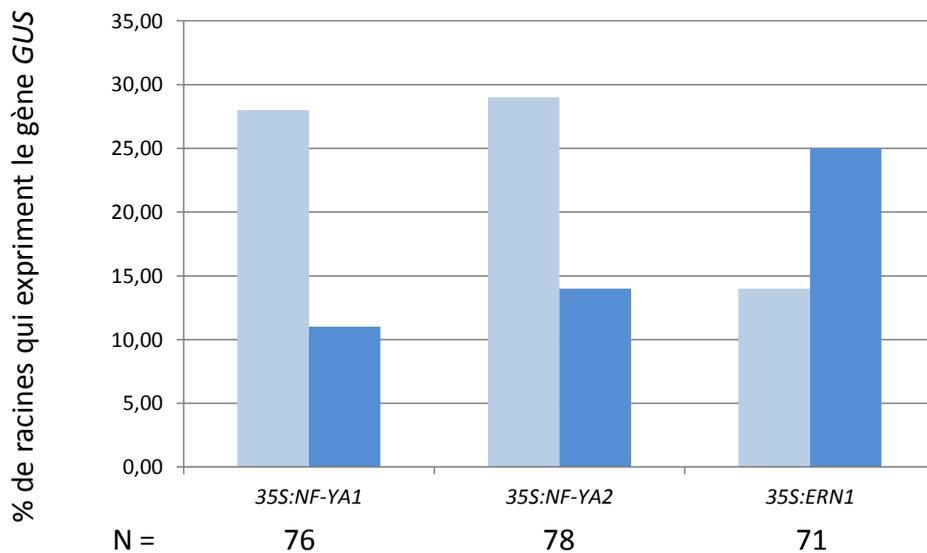


Figure 50. NF-YA1 et NF-YA2 activent la transcription d'*ENOD11* dans les racines de *Medicago truncatula*.

Des racines de *Medicago truncatula* L416 portant une fusion transcriptionnelle *pENOD11 : GUS* ont été transformées par une construction *p35S : NF-YA1* ou *p35S : NF-YA2* permettant l'expression constitutive de ces deux gènes, via *Agrobacterium rhizogenes*. (A) Différentes intensités de l'activité glucuronidase ont été observées après transformation des constructions *p35S : NF-YA1* ou *p35S : NF-YA2*. Blanc, expression non-symbiotique de *pENOD11 : GUS* dans les pointes racinaires et les traces vasculaires ; Bleu clair, expression modérée de *pENOD11 : GUS* ; Bleu foncé, forte expression de *pENOD11 : GUS*. (B) Pourcentage de racines qui expriment modérément (bleu clair) ou fortement (bleu foncé) la fusion transcriptionnelle *pENOD11 : GUS*. Le nombre de plantes analysées pour chaque construction est indiqué (N).

et *ENOD11*, les modes d'action de NF-YA1 et NF-YA2 dans le contrôle de l'expression de ces gènes au cours des étapes de pré-infection restent à élucider.

3. NF-YA1 et NF-YA2 agissent en amont de l'activation d'*ENOD11* dans la voie de réponse aux NFs

Les données présentées précédemment suggèrent que NF-YA1 et NF-YA2 jouent un rôle positif en aval de DMI3 dans la voie de signalisation NF aboutissant à l'induction de nodulines précoces telles qu'*ENOD11*. Cette partie de ma thèse a eu pour objectif de caractériser le mode d'action par lequel NF-YA1 et NF-YA2 contrôlent l'expression d'*ENOD11* pendant les étapes de pré-infection, par des expériences de transactivation dans les racines de *Medicago truncatula*, ou dans le système hétérologue *Nicotiana benthamiana*.

3.1 NF-YA1 et NF-YA2 activent l'expression d'*ENOD11* dans les racines de *Medicago truncatula*

Comme l'expression d'*ENOD11* en réponse aux NFs est sévèrement réduite dans les racines des plantes dont l'expression de *NF-YA1* et *NF-YA2* est dérégulée, nous avons à l'inverse testé l'effet de la surexpression de *NF-YA1* ou *NF-YA2* sur l'expression d'*ENOD11* dans des racines transgéniques de *Medicago truncatula*. Pour cela, les ORFs codant pour NF-YA1 et NF-YA2 ont été clonées en aval du promoteur *p35S*. Nous avons utilisé des plantes sauvages ou mutantes de la lignée transgénique L416 dont une construction contenant une région promotrice d'*ENOD11* de 2,3 kb en fusion transcriptionnelle avec le gène rapporteur *GUS* est stablement intégrée dans le génome (Journet et al., 2001). Nous avons ensuite réalisé des analyses histochimiques de l'activité *pENOD11 : GUS* dans les racines de plantes transgéniques qui surexpriment *NF-YA1* ou *NF-YA2*, et les racines transgéniques ont été classées suivant l'intensité de la coloration observée (Figure 50A). Le facteur de transcription ERN1 étant connu pour réguler positivement l'expression d'*ENOD11* (Andriankaja et al., 2007), nous avons de plus utilisé une construction *p35S : ERN1* comme contrôle positif dans ces expériences.

Lorsque *NF-YA1* ou *NF-YA2* sont exprimés constitutivement dans les racines de *Medicago truncatula* sauvages L416, une induction de l'activité *pENOD11 : GUS* est observée dans les tissus épidermiques pour une grande proportion de racines transgéniques, en absence de traitement aux NFs (Figure 50B). Cependant l'intensité de l'activité GUS observée

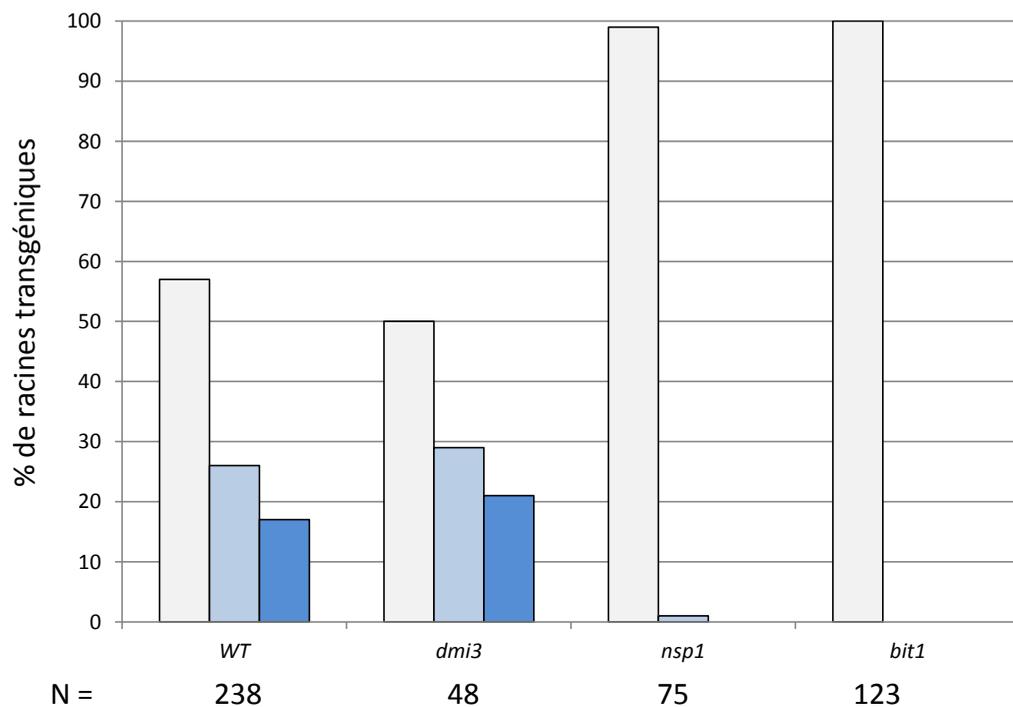


Figure 51. L'activation de la transcription d'*ENOD11* par NF-YA1 est dépendante de *NSP1* et *ERN1*.

Des racines de *Medicago truncatula* L416 sauvages ou mutées pour les gènes *dmi3*, *nsp1*, et *ern1* (*bit1*) ont été transformées par une construction *p35S : NF-YA1* via *Agrobacterium rhizogenes*. Cette figure représente le pourcentage de racines qui n'expriment pas (blanc), modérément (bleu clair) ou fortement (bleu foncé) la fusion transcriptionnelle *pENOD11 : GUS*. Le nombre de plantes analysées est indiqué (N).

D'après Lisa Frances et Fernanda de Carvalho-Niebel, communication personnelle.

dans ces racines n'est pas aussi forte que celle visualisée lorsque le facteur de transcription ERN1 est exprimé constitutivement dans les racines de L416 (Figure 50B). Une des explications à cela pourrait être que la surexpression seule d'une sous-unité NF-YA n'est pas suffisante à une activation optimale de l'expression de ses gènes cibles qui nécessiterait également une plus forte accumulation des deux autres sous-unités NF-YB et NF-YC. Pour NF-YA1, nous avons également testé sa capacité à induire l'expression d'*ENOD11* dans les racines de plantes L416 mutantes pour les gènes *DMI3*, *NSP1* ou *ERN1*. De manière intéressante, alors que l'expression constitutive de *NF-YA1* dans les racines de plantes *dmi3/L416* aboutit à une activation de la fusion transcriptionnelle *pENOD11 : GUS* dans les tissus épidermiques racinaires, cette activation n'est plus observée dans les racines de plantes *nsp1/L416* ou *ern1/L416* (Figure 51). Ensemble, ces résultats indiquent que l'expression constitutive de *NF-YA1* ou *NF-YA2* peut contourner la perception des NFs et une partie de la cascade de signalisation engendrée par cette perception. Cependant, l'activation de l'expression d'*ENOD11* par *NF-YA1* est clairement dépendante de la présence de *NSP1* et *ERN1*. Au moins deux hypothèses peuvent être proposées quant au rôle de *NF-YA1* en amont de l'induction de l'expression d'*ENOD11*. La première serait que ce facteur de transcription agisse au sein de complexes multi-protéiques sur le promoteur d'*ENOD11* au cours de la voie de signalisation NF, de concert avec le facteur de transcription *ERN1*. Une deuxième possibilité serait que *NF-YA1* agirait directement ou indirectement en amont de l'induction de l'expression de *ERN1* en réponse aux NFs, ensemble avec les facteurs de transcription *NSPs*. L'hypothèse d'une action de *NF-YA1* en amont de l'induction de *NSP1* est peu probable au vu des résultats présentés dans la partie 2. de ce chapitre, selon lesquels l'activation de l'expression de ce gène est toujours présente dans les racines des plantes *NF-YA* RNAi.

3.2 NF-YA1 et NF-YA2 activent l'expression de *ERN1* dans les cellules de *Nicotiana benthamiana*

L'expression conjointe de *NF-YA1* et *NF-YA2* est requise pour l'activation de la transcription d'*ENOD11* et de *ERN1* en réponse aux NFs. De plus, l'expression constitutive de *NF-YA1* ou *NF-YA2* dans les racines de *Medicago truncatula* aboutit à l'activation de la transcription d'*ENOD11* en absence de signal symbiotique. Pour évaluer en détail la capacité de ces deux FTs à activer la transcription d'*ENOD11*, nous avons choisi de réaliser des expériences de transactivation dans *Nicotiana benthamiana*. Ainsi, les protéines *NF-YA1* ou *NF-YA2* ont été co-exprimés avec des fusions transcriptionnelles reportrices *pENOD11 :*

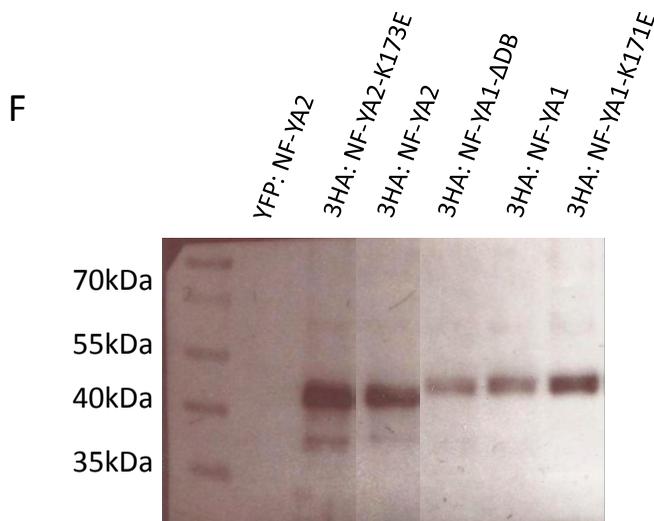
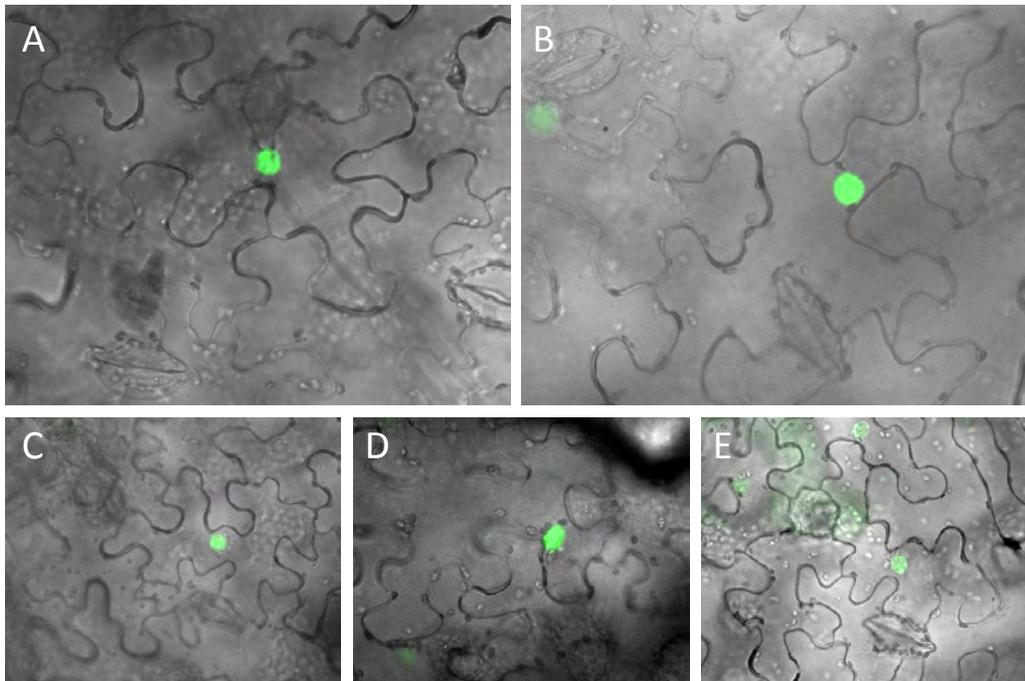


Figure 52. NF-YA1, NF-YA2 et les versions mutantes de ces protéines sont localisées dans le noyau des cellules foliaires de *Nicotiana benthamiana*.

(A-E) Localisation subcellulaire des fusions traductionnelles YFP - NF-YA1 (A), YFP - NF-YA2 (B), YFP - NF-YA1-ΔDB (C), YFP - NF-YA1-K171E (D), YFP - NF-YA2-K173E (E) 36 heures après agro-infiltration de feuilles de *Nicotiana benthamiana*. (F) Western blot montrant la présence des protéines chimériques NF-YA1, NF-YA2, NF-YA1-ΔDB, NF-YA1-K171E, NF-YA2-K173E exprimées en fusion traductionnelle avec un tag 3HA. L'anticorps utilisé est dirigé contre l'épitope 3HA. Les protéines provenant de feuilles infiltrées par la construction YFP - NF-YA2 servent de contrôle négatif.

GUS ou *pERN1 : GUS* dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana* par la méthode d'agro-infiltration, et l'activation de la transcription des gènes rapporteurs a été évaluée.

3.2. 1 Expression des constructions utilisées dans les cellules épidermiques de *Nicotiana benthamiana*

Pour réaliser les expériences de transactivation décrites précédemment, il a d'abord fallu vérifier que les protéines NF-YA1 et NF-YA2 utilisées étaient bien produites dans les cellules foliaires épidermiques de *Nicotiana benthamiana*, et que la localisation subcellulaire de ces protéines était bien nucléaire. En plus de NF-YA1 et NF-YA2, nous avons utilisé une version de NF-YA1 mutée sur son domaine de liaison à l'ADN. Nous avons recherché dans la littérature animale quels sont les acides aminés requis pour la liaison de la sous-unité NF-YA aux régions promotrices CCAAT. Une étude structure fonction a permis de montrer qu'une substitution de trois acides aminés (positions 312 à 315) dans le domaine de liaison à l'ADN de la sous-unité NF-YA de souris (RGE→AAA) aboutit à une perte de liaison à l'ADN sans altérer la capacité de cette protéine à interagir avec les autres sous-unités NF-Y ; cette version de NF-YA a été appelée YA29 (Mantovani et al., 1994). Par analogie des séquences protéiques de NF-YA chez la souris et chez *Medicago truncatula*, nous avons pu identifier les trois acides aminés correspondant sur la protéine NF-YA1 (RGC, positions 214 à 217). Sur la base de ces analogies de séquences protéiques, des expériences de mutagenèse dirigée nous ont permis d'amplifier une version mutée de *NF-YA1* codant pour une protéine dont les résidus RGC ont été substitués par trois alanines ; cette version mutée de MtNF-YA1 est appelée NF-YA1- ΔDB. Les ORFs codant pour NF-YA1, NF-YA2, et NF-YA1- ΔDB ont été clonés dans des vecteurs permettant la surexpression des protéines correspondantes en fusion traductionnelle avec trois épitopes HA dans les feuilles de *Nicotiana benthamiana*. Après agro-infiltration, la présence des protéines chimériques 3HA-NF-YA1, 3HA-NF-YA2 et 3HA- NF-YA1- ΔDB a été vérifiée par Western Blot en utilisant des anticorps dirigés contre l'épitope HA (Figure 52F), de même que la localisation nucléaire des protéines chimériques YFP-NF-YA1, YFP-NF-YA2 et YFP- NF-YA1- ΔDB (Figure 52A-C).

3.2. 2 Transactivation de *pERN1 : GUS* et *pENOD11 : GUS*

i. Transactivation de *pENOD11 : GUS*

Deux régions distinctes sur le promoteur d'*ENOD11* dirigent son expression au cours de la voie de signalisation et de l'infection rhizobienne. En réponse à la signalisation NF,

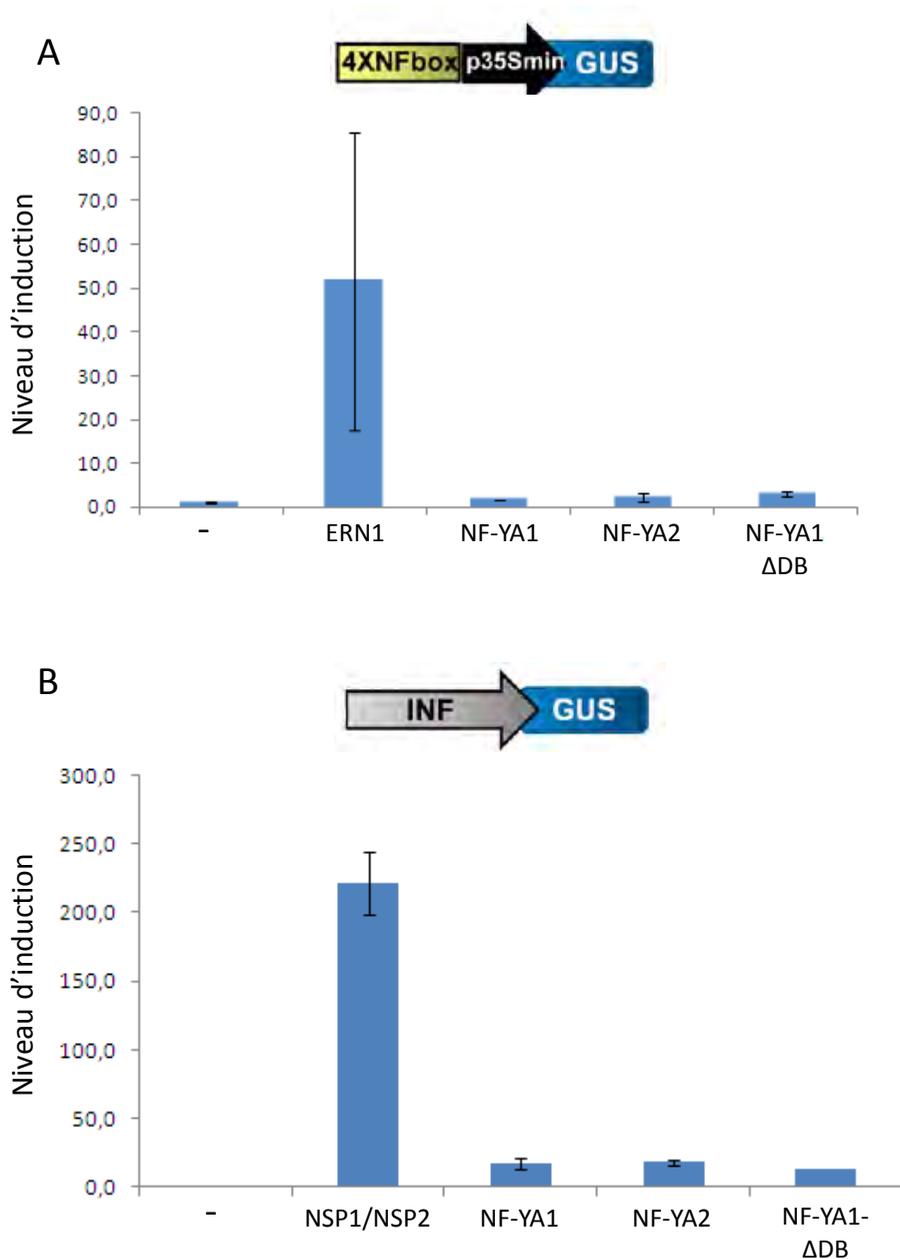


Figure 53. NF-YA1 et NF-YA2 n'activent pas l'expression d'*ENOD11* dans les feuilles de *Nicotiana benthamiana*.

Des feuilles de *Nicotiana benthamiana* ont été co-infiltrées par des constructions activatrices *p35S* : *3HA - NF-YA* et les gènes rapporteurs *NF-box* : *GUS* (A) ou *INF* : *GUS* (B). L'activité du gène rapporteur *GUS* a été mesurée dans les disques foliaires après infiltration des constructions *NF-box* : *GUS* ou *INF* : *GUS* seules (-), ou combinées aux protéines activatrices NF-YAs, ERN1, ou NSPs exprimées en fusions traductionnelles avec un épitope 3HA, et sous le contrôle d'un promoteur *p35S*. L'activité *GUS* dans les disques foliaires a été déterminée 36 heures après infiltration. Les données sont représentées sous forme de niveaux d'induction par rapport à l'échantillon contrôle (-). Les barres d'erreurs représentent les écarts types de la moyenne des activités *GUS* provenant de 10 à 20 échantillons individuels (trois répétitions biologiques).

D'après Lisa Frances et Fernanda de Carvalho-Niebel, communication personnelle.

l'expression d'*ENOD11* est positivement régulée par le facteur de transcription ERN1 via sa liaison à la séquence promotrice NF-box située entre les positions -398 et -358 (Andriankaja et al., 2007). En plus des évènements précoces de signalisation en réponse aux NFs, *ENOD11* est également exprimé au cours des étapes subséquentes d'infection rhizobienne. Cette expression est sous le contrôle d'une région promotrice de 257 paires de bases située en aval de la NF-box, et juste en amont du codon d'initiation de la traduction d'*ENOD11* (Boisson-Dernier et al., 2005). Le facteur de transcription dimérique NSP1/NSP2 régule l'expression d'*ENOD11* au cours de l'infection rhizobienne via cette région promotrice (Cerri et al., 2012). De plus, les NFs seuls ne sont pas suffisants pour activer cette région régulatrice qui requiert la présence des bactéries (Boisson-Dernier et al., 2005). Au laboratoire, deux constructions différentes de *pENOD11 : GUS* ont été générées (F. de Carvalho-Niebel). La première, suffisante pour diriger l'expression d'*ENOD11* dans les poils absorbants de *Medicago truncatula* en réponse aux NFs (Andriankaja et al., 2007), comprend un tétramère de NF-box (4 x NF-box) et le promoteur minimal *p35S* fusionnés en 5' du gène *GUS* (*NF-box : GUS*). La deuxième, suffisante pour diriger l'expression d'*ENOD11* au cours de l'infection rhizobienne, comprend la région de 257 paires de bases en amont du codon d'initiation de la traduction fusionnée en 5' au gène *GUS* (*INF : GUS*) (Boisson-Dernier et al., 2005). Nous avons testé la capacité des protéines chimériques 3HA-NF-YA1, 3HA-NF-YA2, et 3HA-NF-YA1- Δ DDB à activer la transcription des fusions transcriptionnelles reportrices *pENOD11 : GUS* décrites précédemment dans les feuilles de *Nicotiana benthamiana* (L. Frances, F. de Carvalho-Niebel). Les protéines chimériques 3HA-ERN1 et 3HA-NSP1 / 3HA-NSP2 ont été utilisées comme contrôles positifs d'activation des gènes rapporteurs *NF-box : GUS* et *INF : GUS*, respectivement. Dans ces conditions, la transcription d'aucun des deux gènes rapporteurs utilisés n'est activée par NF-YA1 ou NF-YA2 (Figure 53A-B). Ces résultats indiquent que même si NF-YA1 et NF-YA2 sont capables d'activer la transcription d'*ENOD11* dans les racines de *Medicago truncatula*, il est peu probable que ce gène soit une cible directe de NF-YA1 et NF-YA2 au cours des étapes de pré-infection ou d'infection rhizobienne.

ii. Transactivation de *pERN1 : GUS*

Pour analyser l'effet de la surexpression de NF-YA1 ou NF-YA2 sur la transcription de *ERN1*, nous avons utilisé comme gène rapporteur une région de 2,3 kb en amont du codon d'initiation de la traduction de *ERN1* fusionnée en 5' du gène *GUS* (Cerri et al., 2012). Le dimère NSP1/NSP2 active l'expression de *ERN1* au cours de la signalisation NF. Nous avons

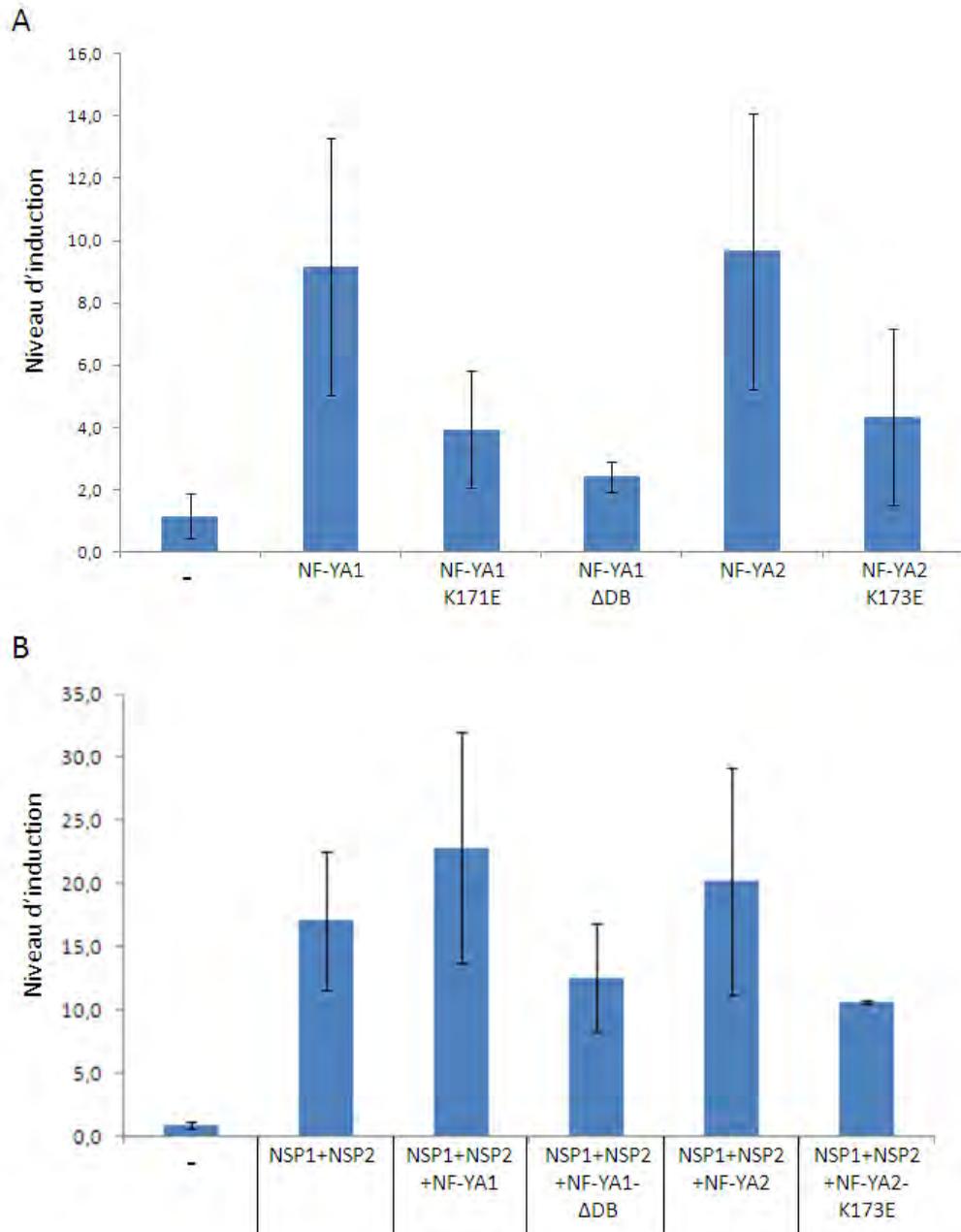


Figure 54. NF-YA1 et NF-YA2 activent l'expression de *ERN1* dans les feuilles de *Nicotiana benthamiana*.

(A, B) L'activité du gène rapporteur *GUS* dirigé par une région promotrice de *ERN1* de 2,3 kb a été mesurée dans des disques foliaires après infiltration de la construction *pERN1 : GUS* seule (-), ou combinée aux protéines activatrices NF-YAs (A) et/ou NSPs (B) exprimées en fusions traductionnelles avec un épitope 3HA, et sous le contrôle d'un promoteur *p35S*. L'activité *GUS* dans les disques foliaires a été déterminée 36 heures après infiltration. Les données sont représentées sous forme de niveaux d'induction par rapport à l'échantillon contrôle (-). Les barres d'erreurs représentent les écarts types de la moyenne des activités *GUS* provenant de 10 à 20 échantillons individuels (trois répétitions biologiques).

(B) d'après Lisa Frances et Fernanda de Carvalho-Niebel, communication personnelle.

donc utilisé ce facteur de transcription comme contrôle positif d'activation de *pERN1 : GUS* dans nos expériences. L'activité glucuronidase a été mesurée 36 heures après co-infiltration des constructions 3HA : NF-YA1 ou 3HA : NF-YA2 et *pERN1 : GUS*. Dans ces conditions, l'expression de NF-YA1 ou NF-YA2 mène à une forte activation transcriptionnelle du gène rapporteur *pERN1 : GUS* (Figure 54A), qui reste néanmoins plus faible que l'activation de ce gène rapporteur par NSP1/NSP2 (Figure 54B). De manière intéressante, l'expression de *pERN1 : GUS* n'est pas activée par la protéine chimérique 3HA-NF-YA1- Δ DB (Figure 54A). Ensemble, ces données suggèrent que NF-YA1 et NF-YA2 régulent positivement la transcription de *ERN1*. De plus, de manière équivalente à l'action de NF-YA chez les mammifères, les résidus R, G, et C entre les positions 214 et 217 de NF-YA1 jouent un rôle clé dans la régulation de la transcription de *ERN1*. Au vu de la forte conservation des séquences protéiques NF-YAs entre les animaux et les plantes, il est très probable que ces trois résidus soient impliqués dans la liaison à l'ADN cible de NF-YA1.

Chez les animaux, la liaison à l'ADN du complexe NF-Y et l'activation subséquente de ses gènes cibles est absolument dépendante de la présence des trois sous-unités (Mantovani, 1999). Il est donc probable que, pour l'activation de la transcription de *pERN1 : GUS*, NF-YA1 et NF-YA2 agissent en complexe trimérique avec les sous-unités endogènes NF-YB et NF-YC de *Nicotiana benthamiana*. Pour tester cette hypothèse, ensemble avec la construction *pERN1 : GUS*, nous avons donc co-exprimé des versions mutantes de NF-YA1 et NF-YA2 affectées dans leur capacité à interagir avec les autres membres du trimère NF-Y. Ces protéines sont K171E pour NF-YA1 et son équivalent K173E pour NF-YA2. Comme les versions sauvages de NF-YA1 et NF-YA2, des fusions traductionnelles de ces protéines à la YFP sont exprimées dans le noyau des cellules de *Nicotiana benthamiana* (Figure 52D-E). Après co-infiltration des constructions 3HA-K171E ou 3HA-K173E avec *pERN1 : GUS*, même si le niveau d'activation de *pERN1 : GUS* n'est pas nul dans ces conditions, nous avons pu observer une diminution de l'activité glucuronidase (Figure 54A). Il est donc très probable que NF-YA1 et NF-YA2 interagissent avec des sous-unités NF-YB et NF-YC endogènes de *Nicotiana benthamiana* pour activer la transcription du gène rapporteur, et que cette interaction soit altérée pour les protéines mutantes NF-YA1-K171E et NF-YA2-K173E. Le niveau résiduel de l'activité GUS observée pourrait être une conséquence d'interactions encore possibles entre les versions mutantes utilisées et les sous-unités NF-Y endogènes. Une proposition alternative serait que NF-YA1 ou NF-YA2 seuls peuvent induire la transcription de leurs gènes cibles, même si l'efficacité de cette transcription est réduite.

Comme le dimère NSP1/NSP2 active également l'expression de *ERN1* au cours des étapes de pré-infection (Cerri et al., 2012), nous avons testé l'hypothèse d'une coopérativité entre NF-YA1 ou NF-YA2 et NSP1/NSP2. Pour ce faire nous avons co-infiltré les constructions 3HA-NSP1, 3HA-NSP2 et 3HA-NF-YA1 ou 3HA-NF-YA2, avec la construction *pERN1 : GUS*, puis nous avons dosé l'activité glucuronidase (L. Frances, F. de Carvalho-Niebel). Une légère augmentation de l'activité GUS a été systématiquement observée dans ces conditions en comparaison à l'activité induite par le dimère NSP1/NSP2 seul, même si cette augmentation n'est pas significative. L'hypothèse d'un mode d'action coopératif entre NF-YA et NSP reste tout à fait envisageable, et nous pensons qu'une différence plus forte de l'activité *pERN1 : GUS* pourrait être observée en réponse à la co-expression d'un trimère NF-Y avec le dimère NSP1/NSP2. Ces expériences sont en cours dans l'équipe d'accueil.

3.3 Conclusions

Cette partie de ma thèse a permis d'identifier des gènes cibles candidats de NF-YA1 et NF-YA2 au cours des étapes de pré-infection chez *Medicago truncatula*. Alors qu'une réduction de l'expression de *NF-YA1* et *NF-YA2* dans des racines transgéniques de *Medicago truncatula* aboutissent à une forte dérégulation de l'expression d'*ENOD11* en réponse aux NFs (partie 2. 3), nous avons pu montrer qu'à l'inverse, l'expression constitutive de *NF-YA1* ou *NF-YA2* mène à une augmentation de l'activité transcriptionnelle d'*ENOD11* dans l'épiderme racinaire. Cependant, comme le montrent les résultats de transactivation dans les feuilles de *Nicotiana benthamiana*, l'induction de l'expression d'*ENOD11* n'est pas le résultat d'une activation directe de NF-YA1 ou NF-YA2, mais pourrait être la conséquence de l'activation de la transcription de *ERN1*. Cette hypothèse est appuyée par l'observation selon laquelle dans les cellules foliaires de *Nicotiana benthamiana*, la surexpression de *NF-YA1* ou *NF-YA2* mène à l'induction de l'expression du gène rapporteur *pERN1 : GUS*. De plus, pour réguler l'expression de *pERN1 : GUS*, il est très probable que NF-YA1 ou NF-YA2 agissent au sein de trimères NF-Y dont les sous-unités NF-YB et NF-YC sont des sous-unités endogènes exprimées dans les cellules foliaires de *Nicotiana benthamiana*.

Chapitre IV: Discussion

1. *NF-YA1* et la voie de signalisation NF

La perception du signal NF rhizobien mène à l'activation d'une cascade de signalisation qui implique la génération et le décodage d'oscillations calciques par la protéine CCaMK dans l'épiderme racinaire. En aval de CCaMK, deux facteurs de transcription de la famille des GRAS (NSP1 et NSP2) (Kalo et al., 2005; Smit et al., 2005), un ERF (ERN1) (Andriankaja et al., 2007; Middleton et al., 2007), et NIN (Schauser et al., 1999; Marsh et al., 2007), sont impliqués dans l'activation génique des nodulines précoces. Cette voie de signalisation active deux processus développementaux différents, bien que temporellement très coordonnés : l'initiation de l'infection rhizobienne dans l'épiderme racinaire, et l'induction de divisions cellulaires dans le cortex, via un signal diffusible de nature inconnue à ce jour. Au cours de ma thèse, nous avons montré que l'expression de *NF-YA1* est fortement et précocement induite dans l'épiderme racinaire en réponse à un traitement aux NFs. De plus, l'utilisation d'une fusion transcriptionnelle *pNF-YA1 : GUS* a mis en évidence une induction de l'expression de ce gène dans le cortex interne en réponse à une inoculation par *Sinorhizobium meliloti*. Par ailleurs, l'analyse du mutant *nf-ya1-1* ou de plantes dont l'expression racinaire de *NF-YA1* est réduite a montré que ce gène est à la fois impliqué dans les étapes d'infection rhizobienne et d'organogénèse nodulaire. Ce rôle double a également été constaté pour les facteurs de transcription NSP1, NSP2 et NIN, dont les mutants correspondants sont incapables de former des nodules ou des cordons d'infection dans les fonds génétiques *snf1* (CCaMK auto-active) ou *snf2* (LHK1 auto-actif). De manière intéressante, les plantes de *Phaseolus vulgaris* dont l'expression de *NF-YC1* est réduite sont aussi affectées dans ces deux processus en réponse à *Rhizobium etli* (Zanetti et al., 2010). Nous avons montré que l'orthologue le plus proche de PvNF-YC1 (MtNF-YC2) interagit avec NF-YA1 dans la levure. Au vu des rôles très similaires pour MtNF-YA1 et PvNF-YC1, il est donc probable que chez *Medicago truncatula*, NF-YA1 et NF-YC2 agissent au sein d'un même complexe pour contrôler l'infection et la formation des primordia nodulaires.

1.1 Rôle au cours de l'organogénèse nodulaire

A l'exception des études d'expression spatio-temporelle de *NF-YA1* en réponse à *Sinorhizobium meliloti*, je n'ai pas abordé d'étude sur l'implication de ce gène au cours de l'organogénèse nodulaire durant ma thèse. Cependant, au vu de son profil d'expression et des résultats obtenus dans d'autres laboratoires, il est tentant de spéculer que *NF-YA1* joue un rôle

clé dans ce processus. Il a récemment été montré que l'expression de *NF-YA1* est induite en réponse à un traitement aux cytokinines dans les racines de *Lotus japonicus*, selon un profil d'expression temporelle similaire à celui de *NIN* (Heckmann et al., 2011). Par analogie avec *Lotus japonicus*, il serait intéressant d'analyser la régulation transcriptionnelle de *NF-YA1* en réponse aux cytokinines dans les racines de *Medicago truncatula*. La construction *pNF-YA1 : GUS* serait un bon outil pour visualiser une potentielle régulation fine de l'expression de ce gène en réponse aux cytokinines. Chez les mammifères, le facteur de transcription NF-Y régule l'expression de gènes impliqués dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire (Caretti et al., 2003; Dolfini et al., 2012), et notamment les gènes *cdc2*, *cdc25*, et *CYCB* impliqués dans la transition G2/M. Chez les légumineuses, l'expression de ces gènes est induite très précocement en réponse à une application de NFs ou à une inoculation par *Sinorhizobium meliloti* (Yang et al., 1994; Foucher and Kondorosi, 2000). NF-YA1, de concert avec NF-YC2, pourrait être impliqué dans la régulation positive de l'expression de ces gènes. Cette hypothèse s'appuie sur les données obtenues par Zanetti et al. (2011), selon lesquelles les racines de *Phaseolus vulgaris* dont les niveaux de transcrits de *PvNF-YC1* sont réduits ou exprimés constitutivement présentent respectivement une réduction ou une augmentation de l'expression de ces trois régulateurs du cycle cellulaire. Une direction forte prise par l'équipe d'accueil pour le futur consiste en la compréhension du rôle de NF-YA1 dans le contrôle du cycle cellulaire au sein du méristème nodulaire.

1.2 Rôle dans l'épiderme au cours des étapes de pré-infection

Nous avons pu montrer que l'expression de *NF-YA1* est fortement induite dans la zone de développement des poils absorbants (zone de pré-infection) en réponse à un court traitement aux NFs. L'absence d'induction observée dans les racines des mutants *nfp* et *dmi3* suggère que NF-YA1 agit en aval de DMI3 en réponse aux NFs. Alors que l'induction de l'expression de *NF-YA1* par les NFs est dépendante de *NFP* et *DMI3*, nous avons aussi montré qu'elle est indépendante des gènes *NSP1*, *NSP2* ou *ERN1*. Ces résultats sont en partie contradictoires avec une étude récente dans laquelle l'expression de *NF-YA1* n'est pas induite par les NFs dans les racines des mutants *nsp1* et *nsp2* (Horvath et al., 2011). Cependant, dans cette étude, les racines ont subi un traitement aux NFs d'une durée beaucoup plus longue (16 heures), pour laquelle nous avons observé une accumulation des transcrits *NF-YA1* beaucoup plus faible qu'après 4 heures de traitement. Ainsi, il est tentant de spéculer que l'activation transcriptionnelle de *NF-YA1* en réponse aux NFs ne dépend pas de la présence des facteurs

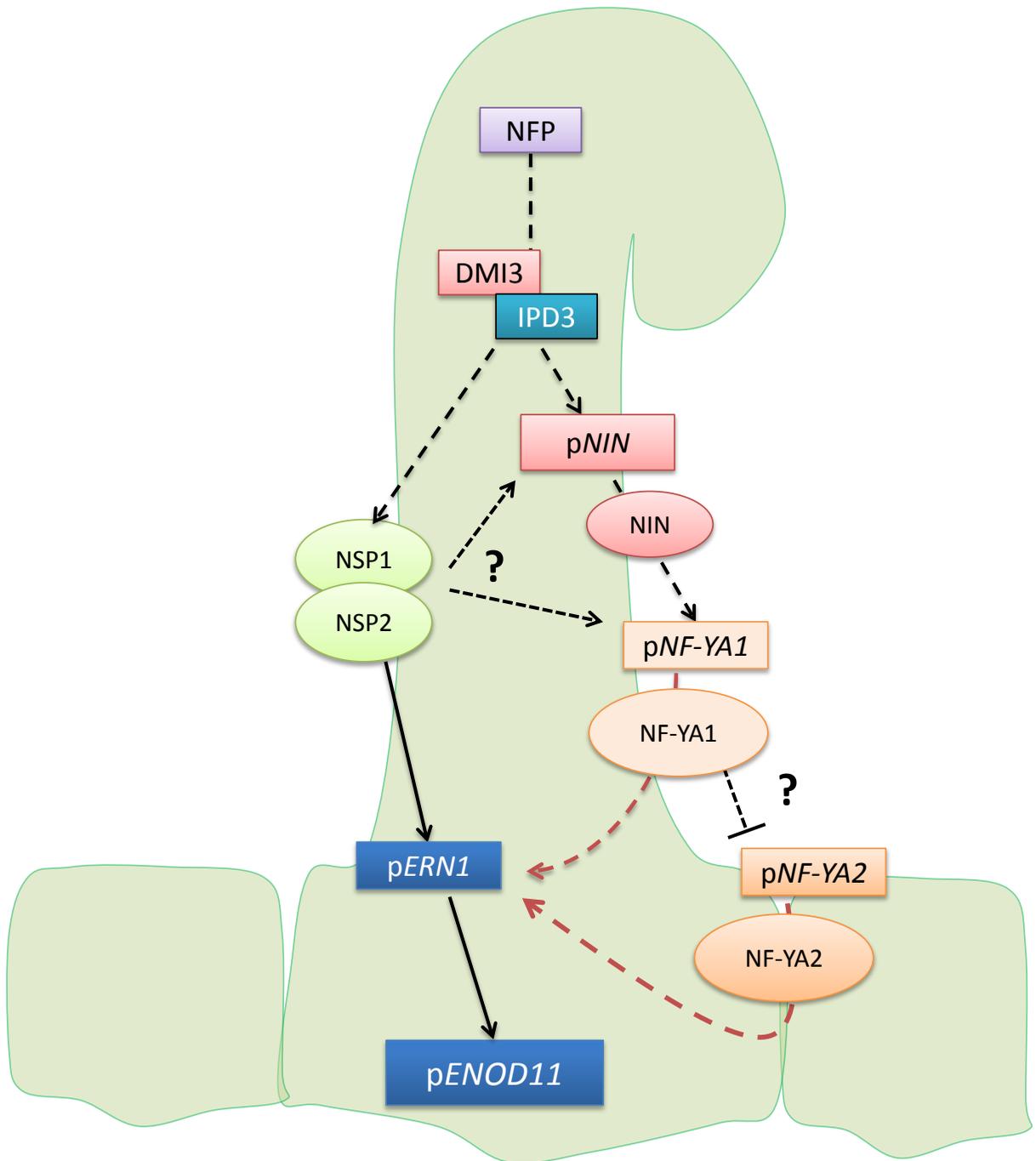


Figure 55. Modèle hypothétique décrivant l'implication de *NF-YA1* et *NF-YA2* dans la voie de signalisation de réponse aux NFs pendant les étapes de pré-infection.

de transcription NSP1 ou NSP2, mais ces derniers sont probablement requis pour le maintien d'une expression suffisante de *NF-YA1* le long des étapes symbiotiques subséquentes. Nous avons également montré que l'induction de l'expression de *NF-YA1* est absolument dépendante du gène *NIN*, plaçant ce dernier comme un régulateur essentiel de *NF-YA1* en réponse aux NFs. Chez *Lotus japonicus*, il a récemment été montré que la protéine CYCLOPS (IPD3), substrat de la protéine kinase CCaMK (DMI3), est un facteur de transcription qui se lie au promoteur de *NIN* et active sa transcription dans le système hétérologue *Nicotiana benthamiana* (M. Parniske, données non publiées). Par analogie chez *Medicago truncatula*, il serait intéressant d'analyser l'expression de *NF-YA1* dans les racines du mutant *ipd3* en réponse aux NFs, afin de voir si la phosphorylation de IPD3 par DMI3 aboutit à une accumulation des transcrits *NF-YA1* et de positionner ce dernier dans la voie DMI3/IPD3/NIN. De plus, le facteur de transcription NSP1 peut se lier au promoteur de *NIN* *in vitro* (Hirsch et al., 2009). En supposant que *NIN* soit le régulateur principal de l'expression de *NF-YA1* en réponse aux NFs, il est probable que le maintien d'une expression suffisante de *NF-YA1* tout au long de la voie de signalisation NF soit le résultat d'une boucle de régulation positive exercée par NSP1 via sa liaison au promoteur de *NIN*.

Comme les facteurs de transcription NSP1/NSP2 et ERN1, NF-YA1 pourrait agir positivement sur l'expression d'*ENOD11*. Nous avons en effet montré que l'expression constitutive de *NF-YA1* dans les racines de *Medicago truncatula* aboutit à l'activation d'une fusion transcriptionnelle *pENOD11 : GUS*, sans traitement par des NFs. Cependant l'induction des fusions transcriptionnelles *NF-box : GUS* et *INF : GUS* ne sont pas activées par une surexpression de *NF-YA1* dans *Nicotiana benthamiana*. Il semble donc peu probable que NF-YA1 agisse directement sur le promoteur d'*ENOD11*, et la transactivation de l'expression de *pENOD11 : GUS* dans les racines de *Medicago truncatula* pourrait alors être le résultat d'une augmentation de l'expression de *ERN1*. Cette hypothèse est appuyée par les résultats obtenus dans *Nicotiana benthamiana*, selon lesquels NF-YA1 transactive l'expression de *ERN1* mais pas d'*ENOD11*. De plus, dans les racines de *Medicago truncatula*, la transactivation de l'expression de *pENOD11 : GUS* par NF-YA1 requiert la présence de NSP1, suggérant que NF-YA1 seul n'est pas suffisant pour activer l'expression d'*ENOD11*. Ainsi, soit NF-YA1 agirait en amont de NSP1, soit NF-YA1 et NSP1 agirait ensemble sur le promoteur de *ERN1*. L'expression de *NSP1* étant toujours induite par les NFs dans les racines de plantes *NF-YA* RNAi ou dans le mutant *nf-ya1-1*, nous privilégions la seconde hypothèse selon laquelle NF-YA1 et NSP1 agissent de concert sur le promoteur de *ERN1*

pour activer sa transcription en réponse aux NFs, et par conséquent, l'expression d'*ENOD11*. L'activité transcriptionnelle d'*ENOD11* n'est dirigée par ERN1 qu'au cours des étapes de pré-infection via sa liaison à la *NF-box*, alors que son expression au cours de l'infection rhizobienne est indépendante de ERN1, mais dépend du dimère NSP1/NSP2, via sa liaison à la région promotrice *INF* (Cerri et al., 2012). Ainsi, le contrôle indirect de l'expression d'*ENOD11* par NF-YA1 via l'activation de l'expression de *ERN1* est très probablement liée aux étapes de pré-infection en réponse aux NFs, alors qu'il est peu probable que NF-YA1 agisse sur l'expression d'*ENOD11* au cours de l'infection rhizobienne.

Au-delà du rôle que peut jouer NF-YA1 au cours de la voie de signalisation NF, les résultats obtenus au cours de ma thèse soulèvent l'existence d'un réseau d'actions complexes des facteurs de transcription agissant en aval de la voie de signalisation NF. Cette complexité est probablement le résultat d'un contrôle de l'expression génique très finement régulé au cours du temps. Dans ce sens, il est très probable que les facteurs de transcription en aval de la voie de signalisation NF agissent sur l'expression de gènes cibles différents au long des étapes de pré-infection, notamment à travers des boucles de régulation positives ou négatives dans la voie de signalisation NF. Un modèle hypothétique décrivant l'implication de NF-YA1 dans la voie de signalisation NF est proposé dans la figure 55.

En outre, de nombreux composants de la voie de signalisation NF sont partagés avec la symbiose endomycorhizienne (Oldroyd et al., 2011). Au vu de l'implication de *NF-YA1* dans la voie de signalisation NF, nous nous posons la question du rôle que pourrait jouer ce gène dans la mycorhization. Des analyse phénotypiques du mutant *nf-ya1-1* et de plantes transgéniques *NF-YA* RNAi sont en cours dans l'équipe d'accueil et devraient nous permettre de répondre à cette question.

2. NF-YA1 et NF-YA2, des fonctions redondantes ?

Ce travail a également permis d'aborder la question des relations fonctionnelles entre NF-YA1 et son proche homologue NF-YA2. Nous avons montré que ces facteurs de transcription NF-YAs sont tous deux capables d'activer la transcription de *ERN1* dans le système hétérologue *Nicotiana benthamiana*. Alors qu'en réponse à 4 heures de traitement par des NFs, aucune réduction de l'expression d'*ENOD11* ou de *ERN1* n'a été observée dans les racines du mutant *nf-ya1-1* ou dans les racines transgéniques *NF-YA2* RNAi, l'accumulation des transcrits *ERN1* et *ENOD11* est sévèrement diminuée dans les racines *NF-YA* RNAi pour

lesquelles nous avons montré une forte diminution des transcrits *NF-YA1* et *NF-YA2*. Ces résultats soulèvent la probabilité d'une action au moins partiellement redondante entre *NF-YA1* et *NF-YA2* au cours de la voie de signalisation NF. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que dans les racines *NF-YA2* RNAi, l'expression résiduelle de *NF-YA2* soit suffisante pour l'induction de l'expression des gènes *ERN1* et *ENOD11* en réponse aux NFs. Les analyses futures de mutants *nf-ya2* et de doubles mutants *nf-ya1-nf-ya2* aideront très probablement à mieux comprendre l'importance relative de *NF-YA2* vis à vis de *NF-YA1* au cours de la signalisation NF. Chez *Arabidopsis thaliana*, plusieurs études ont montré l'existence de fonctions redondantes entre des membres *NF-Y* de la même famille (Kumimoto et al., 2008 ; Kumimoto et al., 2010 ; Mu et al., 2012), notamment dans le contrôle du temps de floraison (Ben-Naim et al., 2006; Wenkel et al., 2006). *NF-YB2* et *NF-YB3* sont tous les deux essentiels pour une induction normale de la floraison en conditions de photopériode « jours longs » et régulent positivement la transcription du gène *FLOWERING LOCUS T (FT)*, via leur liaison à un élément CCAAT présent sur le promoteur de ce dernier (Kumimoto et al., 2008). Dans cette étude, alors que chez les mutants simples *nf-yb2* et *nf-yb3*, l'expression de *FT* est faiblement réprimée, une très forte réduction de l'expression de ce gène a été observée chez le double mutant *nf-yb2-nf-yb3*. *NF-YB2* et *NF-YB3* interagissent tous les deux avec *NF-YC3*, *NF-YC4*, et *NF-YC9*. De manière similaire aux sous-unités *NF-YB2* et *NF-YB3*, les simples mutants *nf-yc3*, *nf-yc4* et *nf-yc9* ne sont pas affectés dans le temps de floraison, alors que la floraison du triple mutant *nf-yc3-nf-yc4-nf-yc9* est très retardée (Kumimoto et al., 2010).

La probabilité de fonctions redondantes entre *NF-YA1* et *NF-YA2* est appuyée par le niveau d'identité très élevé entre les séquences de ces deux protéines. En effet, entre ces deux protéines, les domaines conservés d'interaction avec les autres sous-unités *NF-Y* et de liaison à l'ADN sont identiques à 90% et 100%, respectivement. La conservation de ces sous-unités se reflète au niveau fonctionnel puisqu'elles sont toutes les deux capables de transactiver l'expression d'*ENOD11* dans les racines de *Medicago truncatula* et l'expression de *ERN1* dans les feuilles de *Nicotiana benthamiana*. Tout comme *NF-YA1*, des expériences de double hybride dans la levure ont de plus montré que *NF-YA2* interagit également avec *NF-YC1* et *NF-YC2* (M. Baudin, communication personnelle). Dans les racines de *Medicago truncatula*, *NF-YA1* et *NF-YA2* ont des profils d'expression chevauchants, et compatibles avec des rôles au cours de la voie de signalisation NF et de l'infection rhizobienne, puisqu'ils sont tous deux exprimés dans la zone de pré-infection correspondant à la zone d'expression d'*ENOD11*.

Cependant, l'expression de *NF-YA1* est très faible en conditions non symbiotiques, et fortement inductible par les NFs ou par *Sinorhizobium meliloti*, alors que l'expression de *NF-YA2* adopte un profil ubiquitaire dans la racine, que ce soit en présence ou en absence de signal symbiotique. Nous proposons que chez *Medicago truncatula*, les protéines NF-YA1 et NF-YA2 aient un mode d'action similaire, alors que la diversification fonctionnelle de ces deux facteurs de transcription serait principalement liée à des différences d'expression spatio-temporelle. Une manière de vérifier cette hypothèse consisterait à compléter le phénotype défectueux de nodulation chez le mutant *nf-ya1-1* par une construction permettant l'expression de *NF-YA2* sous le contrôle du promoteur de *NF-YA1* dans les racines de *Medicago truncatula*.

Alternativement à un rôle redondant entre *NF-YA1* et *NF-YA2* au cours de la signalisation NF, nous ne pouvons pas exclure l'existence de mécanismes de compensation entre ces deux gènes. Dans ce sens, nous avons observé une légère augmentation du taux de transcrits *NF-YA2* dans les racines du mutant *nf-ya1-1* (données non montrées). Dans un contexte sauvage, il est donc possible qu'en plus d'agir positivement sur l'expression de *ERN1* en réponse aux NFs, NF-YA1 exerce une régulation négative sur l'expression de *NF-YA2*. Dans un fond génétique *nf-ya1-1*, l'expression toujours présente d'*ENOD11* et de *ERN1* en réponse aux NFs s'expliquerait alors par une légère augmentation de l'expression de *NF-YA2* qui permettrait de compenser l'absence d'une protéine fonctionnelle NF-YA1. En accord avec cette proposition, les facteurs de transcription NF-Y peuvent agir comme des régulateurs transcriptionnels positifs ou négatifs (Ceribelli et al., 2008), et trois éléments *cis* régulateurs CCAAT sont présents dans une région promotrice de 1000 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription de *NF-YA2*.

Une analyse phylogénétique réalisée au cours de ma thèse a montré que les gènes *NF-YA1* et *NF-YA2* sont le résultat d'une duplication récente chez les légumineuses *Medicago truncatula* et *Glycine max* (soja), alors que cette duplication n'est pas observée chez les non légumineuses *Oriza sativa* et *Arabidopsis thaliana* (Laloum et al., 2012). La comparaison des génomes séquencés de légumineuses a révélé qu'un événement de duplication complète du génome (WGD : whole-genome duplication) a eu lieu il y a 58 millions d'années (Ma) dans la sous-famille des *Papilionidae* (Young et al., 2011). Par la suite, les duplicats générés ont pu évoluer suivant des profils différents : la fonction du gène ancestral s'est partagée entre les deux duplicats (subfonctionnalisation) ; un des deux duplicats a adopté une nouvelle fonction

-878 AACCTTAATGTATTTTCTTGTTTTCTAAGTGATTGGTGATTCCTTATCTTTAATCTTTAG
 CGTGGCTTTAAGATCATTTTATTTGTAGGGTTGCTGGTATTCCACAATAATTCAAATTTAT
 CCAACCAAATATTGCCCAATTGGATTAGAGAAGATCTGAATTTGACAATTTGTTCTAT
 ATTATTGTAAATTTGCTTTTAAAATATTTTTTATGTAGTCTATTGAGTTCGTTCCGTAAT
 ATTGACTTGAAATTTCTGAAGTGTGTTTTCTTCAAGATCTCATGTTGATTATCTTTGGTGT
 TAATATGGGTGTGTTAATTTAACTTCTTCAAAAAATAAATGATGTAATTCATTATGATAAC
 ATTTATTAAATTTGTCTTTAAATTTATCAATTGGAGATTCTATTATTCAAATTTAAAAAATTA
 TTTGATGCAATTTACACATGAGAATTTTCAAAAAATAAACATAACAAAAATACTATGCCAT
 TAAATTTATTAGTTAGGGACAGTATATTGTTAGAAATTTAGAATGTAGGTCTTTAGTTACATAA
 TAATATGCTTTTGAGAAGAAATAAAAAAGATTAAAAATAAACTAGTTGATTTGTTTTGGCA
 CATAACAACCAATTTCCAAGCTTGTCTGCTCCCAAACGACAGCTATAGGAGTGGTCATTCTGT
 TGAAATTTAAGGGCATCACTCAATTTGAAATTTCAAAGGTACCTTGTTCATTATCATACCAAAA
 ATTATACTTATAATCCCAGACAATGTGCATGTAATATATTAATCTCAATTTGCTTGCTGAAA
 AGCTTAACAACTTTTTACACACATATATATAAAGTCTCATAGCTTGCATTTACAACATGA
 AATTTAAGTAATAGCTAGCCTTCCATTATATCTTCATATCACAACATCTTTTTCCACTCAA
 ATACAATTTCTTGAAAAAATTTGTGATG

Figure 56. Séquence de la région promotrice de *ERN1*.

Une région de 878 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription de *ERN1* est représentée. Les motifs CCAAT (rouge) ou AATTT (vert ou souligné) orientés en sens ou en anti-sens sont représentés. La région 5'UTR est surlignée en gris, et le codon d'initiation de la transcription est noté en rouge.

(néofonctionnalisation) ; un des deux duplicats a été délété et un seul gène est donc maintenu. L'évènement de WGD a largement contribué à l'élaboration de la symbiose rhizobienne, via la subfonctionnalisation ou la néofonctionnalisation des duplicats générés (Young et al., 2011; Young and Bharti, 2012). Par exemple chez *Medicago truncatula*, les gènes *NFP* et *LYR1* dérivent de cette WGD (Young et al., 2011), et *NFP* aurait évolué par subfonctionnalisation dans le but d'accomplir une fonction spécifique de la nodulation. *ERN1* et *ERN2* sont également des homologues qui dérivent de la WGD datant de 58 Ma, et *ERN2* peut compléter le phénotype de nodulation défectueuse du mutant *bit1* lorsqu'il est exprimé sous le contrôle du promoteur de *ERN1* (Ceri et al., 2012). Ces données suggèrent que les fonctions différentes des duplicats *ERN1* et *ERN2* seraient le résultat d'une évolution asymétrique des régions régulatrices plus que des régions codantes pour ces deux gènes. Ce type d'évolution a également été proposé pour les duplicats NF-Y (Yang et al., 2005). Les analyses phylogénétiques effectuées pour les sous-unités NF-YA démontrent qu'il est très probable que *NF-YA1* et *NF-YA2* dérivent de la duplication de génome datant de 58 Ma, et que *NF-YA1* ait évolué par des mécanismes de subfonctionnalisation pour adopter un profil d'expression spécifique de la symbiose avec *Sinorhizobium meliloti*. Néanmoins, une méthode d'estimation plus précise de la période au cours de laquelle la duplication de ces deux gènes est survenue est requise. Par extension, ce type d'analyse phylogénique pour être une manière d'identifier des sous-unités NF-YB et NF-YC spécialisées dans la symbiose rhizobienne chez *Medicago truncatula*. Cette méthode s'est par ailleurs montrée efficace pour l'identification des facteurs de transcription de réponse primaire aux cytokinines MtRR9 et MtRR11 qui jouent un rôle clé au cours de la nodulation (den Camp et al., 2011).

3. Mode d'action de NF-YA et gènes cibles ?

Nous avons montré dans le système hétérologue *Nicotiana benthamiana* que NF-YA1 et NF-YA2 peuvent agir comme des régulateurs transcriptionnels positifs de *ERN1*. L'évidence d'un rôle de régulateur positif transcriptionnel pour NF-YA1 est appuyée par l'auto-activation du gène rapporteur *HIS3* observée lorsque cette protéine est exprimée en appât dans la levure. La forte conservation des séquences protéiques des sous-unités NF-Y suggère que très vraisemblablement, les facteurs de transcription NF-Y de plantes se lient aux éléments CCAAT de leurs promoteurs cibles (Petroni et al., 2012). Dans ce sens, tous les promoteurs ciblés par les NF-Y de plantes possèdent des boîtes CCAAT (Kumimoto et al., 2008; Liu and Howell, 2010), et des données biochimiques récentes soulèvent l'importance de

ces éléments CCAAT dans l'activité de liaison à l'ADN du complexe NF-Y (Calvenzani et al., 2012). Sur les promoteurs de gènes humains, les boîtes CCAAT liées par le complexe NF-Y sont généralement positionnées entre -70 et -200 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription (TSS), et un pic de fréquence est observé autour de la position -85 (Dolfini et al., 2009). De manière intéressante, cinq motifs CCAAT ont été identifiés dans une région promotrice de 850 paires de bases en amont du TSS de *ERN1*, et deux d'entre eux sont positionnées entre -90 et -180 paires de bases (Figure 56). Nous avons également analysé les séquences des promoteurs de six autres gènes jouant un rôle en aval de DMI3 au cours de la signalisation NF (*ERN2*, *ERN3*, *NSP1*, *NSP2*, *ENOD11*, *PUB1*). Aucune région promotrice analysée ne présente une telle densité d'éléments CCAAT, et aucune boîte CCAAT n'est présente en aval de la position -300. Ensemble, ces données bio-informatiques indiquent que *ERN1* pourrait bien être une cible directe de NF-Y, même si une telle liaison de NF-Y sur le promoteur de *ERN1* reste à démontrer. Cependant il n'est pas exclu que l'activation de la fusion transcriptionnelle *pERN1 : GUS* par NF-YA1 et NF-YA2 dans les cellules de *Nicotiana benthamiana* puisse être indirecte. Des expériences de ChIP (chromatin immuno-precipitation) sont en cours dans l'équipe d'accueil et permettront sans doute de confirmer ou non cette cible potentielle.

Chez les plantes comme chez les animaux, il est largement démontré que les sous-unités NF-Y agissent au sein de complexes hétéro-trimériques composés des sous-unités NF-YA, NF-YB et NF-YC (Mantovani, 1999 ; Laloum et al., 2012 ; Petroni et al., 2012). Dans ce sens, aucune liaison à l'ADN n'a été caractérisée pour un monomère NF-Y seul jusqu'à présent, que ce soit dans le domaine animal ou végétal (Dolfini et al., 2012 ; Calvenzani et al., 2012 ; Petroni et al., 2012). Nous pensons donc que l'implication de NF-YA1 et NF-YA2 au cours de la symbiose entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti* ne peut pas s'étudier sans la caractérisation des membres NF-YB et NF-YC des complexes trimériques auxquels ils appartiennent. Une partie de ma thèse a eu pour objectif de rechercher les membres NF-YB et/ou NF-YC potentiellement impliqués dans un/des complexe(s) trimérique(s) avec NF-YA1. L'approche de criblage par double hybride dans la levure a été concluante, puisqu'elle nous a permis d'identifier NF-YC1 et NF-YC2 comme interacteurs putatifs de NF-YA1. Néanmoins, ces résultats sont en contradiction avec deux récentes études d'interactions systématiques des sous-unités NF-Y d'*Arabidopsis thaliana* par le système de double hybride, à l'issue desquelles de très faibles ou pas d'interaction entre les sous-unités NF-YAs et NF-YCs n'ont été observées (Calvenzani et al., 2012; Hackenberg et al., 2012).

Dans notre système il est probable que NF-YC1 et NF-YC2 interagissent avec la sous-unité NF-YB de levure, et que les dimères générés permettent la formation d'une surface d'interaction avec la sous-unité NF-YA1. Cette dynamique d'assemblage du complexe NF-Y est clairement démontrée chez les mammifères (Romier et al., 2003; Dolfini et al., 2012). En accord avec cette hypothèse, il a de plus été démontré que des mutants de levure pour le gène HAP5 (NF-YC) sont complétés par l'expression de sous-unités NF-YCs de *Solanum tuberosum* (Ben-Naim et al., 2006), et qu'à l'inverse, deux sous-unités NF-YBs d'*Arabidopsis thaliana* peuvent interagir avec les sous-unités HAP2 et HAP5 (NF-YA et NF-YC, respectivement) de levure (Kumimoto et al., 2008).

Nous avons également recherché les acides aminés requis pour l'interaction entre NF-YA1 et NF-YC2, et nous avons montré par l'utilisation d'une version mutante de NF-YA1 que la lysine en position 171 (K171) joue un rôle crucial dans cette interaction. De manière intéressante ce résidu est très conservé entre les NF-Y de plantes et ceux de mammifères (Laloum et al., 2012 ; Petroni et al., 2012). De plus, alors que la protéine NF-YA1 active la transcription du gène *HIS3* lorsqu'elle est exprimée seule en appât dans la levure, une perte d'auto-activation du gène rapporteur a été observée dans les levures exprimant NF-YA1-K171E. Ce résultat indique que NF-YA1 interagit probablement avec les sous-unités NF-YB et NF-YC de levure, et que cette interaction induirait l'activation du gène rapporteur *HIS3*.

La localisation subcellulaire et la dynamique d'association des sous-unités NF-Y d'*Arabidopsis thaliana* a récemment été étudiée (Calvenzani et al., 2012; Hackenberg et al., 2012). En accord avec les localisations subcellulaires observées pour MtNF-YA1 et MtNF-YA2, tous les NF-YAs d'*Arabidopsis* testés sont exclusivement localisés dans le noyau des cellules de *Nicotiana benthamiana*. Il est à noter que comme chez les mammifères, les NF-YAs de plantes possèdent un signal d'adressage nucléaire (Laloum et al., 2012). De plus, des expériences d'interactions dans la levure, *in planta* ou *in vitro* ont montré que les sous-unités NF-YB et NF-YC interagissent dans la grande majorité des combinaisons testées et que cette interaction relocalise le dimère formé dans le noyau (Calvenzani et al., 2012; Hackenberg et al., 2012). La relocalisation nucléaire observée de NF-YB2 lorsque cette sous-unité est co-exprimée avec NF-YC2 concorde donc avec les données obtenues chez *Arabidopsis thaliana*. Dans le contexte de la symbiose entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*, les NF-YCs identifiés par le criblage en double hybride sont de très bons interacteurs candidats de NF-YA1. Les analyses d'expression tissulaire par séquençage d'ARN (Projet ANR

SYMBIMICS) ont de plus montré que comme *NF-YA1*, l'expression de *NF-YC2* est fortement induite dans l'épiderme racinaire après 4 heures de traitement par des NFs (P. Gamas, communication personnelle). Des analyses de RNAi visant à comprendre les rôles relatifs de *NF-YC1* et *NF-YC2* au cours de la symbiose entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti* sont en cours dans l'équipe d'accueil (M. Baudin). En ce qui concerne *NF-YB2*, nous n'avons aucune évidence suggérant un rôle en partenariat avec *NF-YC1/2* et *NF-YA1/2*, et nous ne pouvons pas exclure que cette sous-unité ne soit pas fonctionnellement impliquée dans la symbiose entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. Les données générées par le projet ANR SYMBIMICS nous permettront très probablement d'identifier et de caractériser d'autres sous-unités *NF-YBs* agissant au sein de ces complexes protéiques au cours des étapes de mise en place de la nodulation chez *Medicago truncatula*.

Au cours des expériences de transactivation dans *Nicotiana benthamiana*, nous avons observé que le niveau d'activation de la fusion transcriptionnelle *pERN1 : GUS* par *NF-YA1* ou *NF-YA2* est moins élevé que celui induit par le dimère *NSP1/NSP2*. Une des explications pourrait être liée au fait que les sous-unités *NF-YAs* ne peuvent pas fonctionner indépendamment des deux autres membres du complexe *NF-Y*. Il est donc très probable que *NF-YA1* et *NF-YA2* recrutent des sous-unités *NF-YB* et *NF-YC* de *Nicotiana benthamiana*, aboutissant à une efficacité réduite de l'activation transcriptionnelle du gène rapporteur *pERN1 : GUS*. En accord avec cette hypothèse, l'expression de versions mutantes *NF-YA1-K171E* et *NF-YA2-K173E* mène à une plus faible activation du gène rapporteur que celle observée en réponse à l'expression de versions *NF-YA1* et *NF-YA2* sauvages. Il sera donc intéressant de reproduire ces expériences en co-exprimant la construction *pERN1 : GUS* avec les trois sous-unités *NF-Ys*. L'absence d'induction de la fusion transcriptionnelle *pERN1 : GUS* en réponse à l'expression de la version mutante *NF-YA1-ΔDB* montre par ailleurs que les acides aminés requis pour l'activité de liaison à l'ADN de la sous-unité *NF-YA* des mammifères sont probablement les mêmes que chez les plantes. Nous proposons que comme chez les mammifères, la version *NF-YA1-ΔDB* se comporte comme un dominant négatif qui peut interagir avec les dimères *NF-YB/NF-YC*, mais empêche la liaison aux éléments *cis* régulateurs *CCAAT* du complexe formé (Donati et al., 2008).

Il a été montré qu'au cours de la voie de signalisation *NF*, l'activité transcriptionnelle de *ERN1* est également sous le contrôle positif du facteur de transcription dimérique *NSP1/NSP2*, via la liaison de *NSP1* sur des boîtes *AATTT* (Hirsch et al., 2009; Cerri et al.,

2012). Les données obtenues au cours de ma thèse soulèvent donc la question des implications relatives de NSP1/NSP2 et NF-Y dans le contrôle de l'expression de *ERN1*. Nous avons observé une augmentation du niveau d'activation de la transcription de *ERN1* lorsque le dimère NSP1/NSP2 est co-exprimé avec NF-YA1, même si cette augmentation reste faible. Néanmoins, il est tout à fait probable que la co-expression de NSP1/NSP2 avec un trimère NF-Y aboutisse à une activation plus importante de l'expression de *ERN1*. Ces expériences sont en cours dans l'équipe d'accueil. Ensemble, ces résultats pourraient suggérer l'existence de mécanismes de coopérativité entre NF-Y et NSP, qui restent néanmoins à démontrer. Chez les plantes, la liste grandissante d'interactions entre NF-Y et d'autres facteurs de transcriptions suggère qu'une des conséquences de l'expansion des NF-Y réside dans l'adaptation à de telles interactions (Masiero et al., 2002; Wenkel et al., 2006; Yamamoto et al., 2009; Liu and Howell, 2010; Li et al., 2011). Chez *Arabidopsis thaliana*, les complexes bZIP28/NF-YB3/NF-YC2/NF-YA4 formés en réponse à un stress lié au mauvais repliement des protéines (ER-stress) (Liu and Howell, 2010), et NF-YC2/LEC1/bZIP67 qui activent des éléments de réponse à l'acide abscissique (Yamamoto et al., 2009) suggèrent que les facteurs de transcription bZIP puissent être les interacteurs privilégiés de NF-Y chez les plantes. De manière intéressante, les facteurs de transcription de la famille des GRAS NSP1 et NSP2 présentent deux domaines LHR qui sont également retrouvés dans la famille des facteurs de transcription bZIP (Hirsch and Oldroyd, 2009). L'analyse du promoteur de *ERN1* nous a permis d'identifier de nombreux motifs AATTT (en orientation sens ou anti-sens), connus pour lier le facteur de transcription NSP1 (Hirsch et al., 2009) (Figure 56). Un de ces motifs est positionné dix paires de bases en amont d'un élément CCAAT, correspondant environ à un tour d'hélice d'ADN. Ensemble, ces données pourraient suggérer une interaction possible entre NF-Y et NSP sur le promoteur de *ERN1*, et la recherche d'une telle interaction a été entreprise dans l'équipe par des expériences dans la levure et *in planta*. Chez les mammifères, il a été proposé que de part la structure de NF-YB et NF-YC ressemblant aux histones H2A et H2B, le facteur de transcription NF-Y s'associe avec les histones H3/H4 pour empêcher la formation de nucléosomes sur les promoteurs de ses gènes cibles (Dolfini et al., 2012). Dans ce schéma, NF-Y pourrait se comporter comme un facteur de transcription général qui faciliterait l'induction de l'expression de *ERN1* par NSP1/NSP2 en influent sur la condensation de la chromatine au niveau du promoteur de ce dernier.

Chapitre V : Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal et bactérien

Plusieurs lignées de *Medicago truncatula* « Jemalong A17 » ont été utilisées dans cette étude : les lignées sauvages et leurs dérivées transgéniques L416 portant une région promotrice d'*ENOD11* de 2,3 kb fusionnée au gène *GUS* (*pENOD11 : GUS*) (Journet et al., 2001), ainsi que les mutants symbiotiques *nfp* (allèle C31) (Ben Amor et al., 2003), *dmi3* (allèle TRV25) (Catoira et al., 2000), *nsp1-1* et *nsp1-2* (allèles B85 et C54, respectivement) (Catoira et al., 2000), *nsp2-3* (allèle D11) (Oldroyd and Long, 2003), *ern1* (*bit1-1*) (Middleton et al., 2007), et *nin-1* (allèle 12S) (Marsh et al., 2007) avec ou sans la fusion *pENOD11 : GUS*. Les graines de plantes ont été scarifiées par traitement dans l'acide sulfurique, puis stérilisées en surface avant leur mise en germination sur un milieu gélosé (voir « *Medicago truncatula* Handbook », <http://www.noble.org/medicagohandbook>). Les ADNc plasmidiques ont été introduits dans les souches DH5 α d'*Escherichia coli*, ARqual d'*Agrobacterium rhizogenes* (Quandt et al., 1993), GV3101 et GV3103 d'*Agrobacterium tumefaciens*, ou AH109 de levure. La souche *Sinorhizobium meliloti* 2011 qui exprime constitutivement la fusion *hemA-lacZ* (*Sm 2011-lacZ*) (Ardourel et al., 1994) a été cultivée dans du milieu TY additionné de CaCl₂ à 6 mM et contenant les combinaisons d'antibiotiques appropriées.

2. Banque d'ADNc et constructions plasmidiques utilisées

La banque d'ADNc utilisée a été construite à partir d'ARNs totaux extraits de poils absorbants de *Medicago truncatula* A17 isolés par une méthode de fractionnement à l'azote liquide. La banque d'ADNc a été préparée à l'aide du kit Creator Smart cDNA library construction (Clontech), à partir d'échantillons regroupés provenant de poils absorbants traités par des NFs (10⁻⁸M) pendant 2, 6, et 18 heures. Les ADNc ont été insérés par clonage directionnel via les sites de restriction SfiI d'un vecteur pGADT7 modifié (F. de Carvalho-Niebel, L. Sauviac, et L. Deslandes, données non publiées). La banque a été générée à l'aide de la reverse transcriptase Powerscript (RNaseH-) qui synthétise préférentiellement des ADNc de pleine taille. La séquence codante de *NF-YA1* a été amplifiée par PCR et clonée par restriction dans le vecteur pGBKT7 (clontech). Les constructions BD-NF-YA1-K171E, BD-NF-YC2, AD-NF-YA1-K171E et AD-NF-YC2 également utilisées dans les expériences de double hybride ont été obtenues après une recombinaison LR par la technologie Gateway (Invitrogen) des séquences codant pour les facteurs de transcription respectifs à partir du vecteur pK207 (pDONR207 modifié permettant une insertion dans le vecteur d'entrée par

Tableau 4. Amorces utilisées au cours de la thèse.

Nom de l'amorce utilisée	Utilité de l'amorce	Séquence 5'-3'
MtNF-YA1_AscI_for	clonage dans pK207	AGGCGCGCTACCATGGCTATGCAACCTGTTTATCTTAAAG
MtNF-YA1_PmeI_rev	clonage dans pK207	AGTTTAAACCTTATGGTTCCAGCAGCTGTCTGCCA
MtNF-YA2_AscI_for	clonage dans pK207	AGGCGCGCTACCATGGCTATGCAAACTGTTTATCTGAAAGAAC
MtNF-YA2_PmeI_rev	clonage dans pK207	AGTTTAAACCTTAGTCACCTCTGATCCAGAAATATTTGGA
MtNF-YB2_AscI_for	clonage dans pK207	AGGCGCGCTACCATGTCCGAAACTCCGGCGAGTCCTGG
MtNF-YB2_PmeI_rev	clonage dans pK207	AGTTTAAACCTACTCTGGACCTTGATAGGAACCATC
MtNF-YC2_AscI_for	clonage dans pK207	AGGCGCGCTACCATGGACCATCAAGGGCATAACCAGAA
MtNF-YC2_PmeI_rev	clonage dans pK207	AGTTTAAACCTTAGTGATCTGGAGATGGTGGTCG
MtNF-YA1 partII For AscI	clonage dans pK207 pour recombinaison dans pFRN	AGGCGCGCTACCTTTGCTGCCGAGCCACTTAATC
MtNF-YA1 partII Stop Rev PmeI	clonage dans pK207 pour recombinaison dans pFRN	TGTTTAAACCTTACAAGAAACGACCACCGCATCCTC
NF-YA1 mut DBD for	clonage NF-YA1 avec mutation ΔB	TGCAGCTGCCAAGACCAAGAGGATGCGGTGGTCG
NF-YA1 mut DBD rev	clonage NF-YA1 avec mutation ΔB	CGACCACCGCATCCTCTTGGTCTTGGCAGCTGCA
MtNF-YA1_K171E_for	clonage NF-YA1 avec mutation K171E	CAACATACGTGAATGCTGAGCAATACC
MtNF-YA1_K171E_rev	clonage NF-YA1 avec mutation K171E	GGTATTGCTCAGCATTCACGTATGTTG
BamHI-NF-YA1-atg-for3	surexpression de NF-YA1 dans Medicago	GGGATCCATGGCTATGCAACCTG
SacI-NF-YA1-rev	surexpression de NF-YA1 dans Medicago	CTGAGCTCAAACCTTATGGTTCCAGC
MtNF-YA2_BamHI_for2	surexpression de NF-YA2 dans Medicago	CGCGGATCCGCGATGGCTATGCAAACTGTTTATC
MtNF-YA2_SacI_rev2	surexpression de NF-YA2 dans Medicago	ACGAGCTCGTCAAGCTTTAAGGTTACAGCAG
RNAi3'NF-YA2rev	clonage dans pK207 pour recombinaison dans pFRN	AAAGTTTAAACCATGATTTGCCAAAGTAATGAGCCAGGA
RNAi3'NF-YA2Fw	clonage dans pK207 pour recombinaison dans pFRN	AAAGGCGCGCTACCATGATCGATGGTGGGCGTG
NF-YA2_K173E_for	RT-qPCR	GTGAATGCTGAGCAATACAATG
NF-YA2_K173E_rev	RT-qPCR	CATTGTATTGCTCAGCATTCAC
NF-YA1_for_qPCR384	RT-qPCR	TCGGATCTACTGTCCACTCTTTGG
NF-YA1_rev_qPCR384	RT-qPCR	TTGGCATGACGATACCCTGTGTC
ENOD11_for3	RT-qPCR	CAGCCTCCACCTAGCATCCA
ENOD11_Rev2	RT-qPCR	CCACATGCCAAAGATGGGACG
ERN1-314-Fw	RT-qPCR	TGTCTCATTGGATTCTCCTCTTGC
ERN1-391-Rev	RT-qPCR	TTGGAGCAGAAGCAACAGCA
NSP1_561F	RT-qPCR	AAGGTGCAGCTAAGGCCAATG
NSP1_624R	RT-qPCR	GCCCACCTACCATCCTTATTGTTTT
NF-YA2_for_qPCR384	RT-qPCR	ACAGCTTTACCGTCGATCACCTT
NF-YA2_rev_qPCR384	RT-qPCR	CCATCGATCATGTCTGCCATAG
NF-YA3_for_qPCR384	RT-qPCR	GTTAGTTGCTTACGCACCGCA
NF-YA3_rev_qPCR384	RT-qPCR	GCTAATCCCATCATTGAGGCA
NF-YA4_for1	RT-qPCR	TTTGAATGGAAATATGTCGGAAC
NF-YA4_rev1	RT-qPCR	AACTCTAACTCCTGTTGCTGCTG
NF-YA5_for1	RT-qPCR	TTACCTTGGTTATCTTCTTGGCA
NF-YA5_rev1	RT-qPCR	TGATTGCTTGAGACTTCAACAGA
NF-YA6_for1	RT-qPCR	TGTGTGGTAGGATATGTTAGGG
NF-YA6_rev1	RT-qPCR	CTCACCTCACCTACAAGGCTAGA
NF-YA7_for1	RT-qPCR	CTCCTTATTCAAACGCACAATTC
NF-YA7_rev1	RT-qPCR	CATGATGCATTTGGTATAGCTGA
NF-YA8_for1	RT-qPCR	TGAAAGAGTACGGAAGGTATCA
NF-YA8_rev1	RT-qPCR	AGCTGCTAGTAGGCCGTTAGAGT

digestion enzymatique Asc1/Pme1 ; L. Deslandes, communication personnelle) vers les vecteurs de destination pGBG et pGADT7 (Clontech). Les constructions BD-p53 et AD-T-Antigen sont fournies par le kit GAL4 Matchmaker (Clontech).

Pour les expériences de transformation transitoire dans *N. benthamiana*, les constructions YFP-NF-Y et 3HA-NF-Y ont été obtenues après recombinaison LR des séquences codantes de ces facteurs de transcription à partir du vecteur pK207 vers le vecteur de destination *PAM-PAT p35S : YFP : GTW* (L. Deslandes) ou *PAM-PAT p35S : 3HA : GTW* (L. Noël). Les constructions *NF-box : GUS* et *INF : GUS* utilisées dans les expériences de transactivation ont été obtenues comme décrit par Andriankaja et al. (2007). La construction *pERN1 : GUS* a été obtenue par clonage d'une région promotrice de 2,2 kb dans le vecteur pLP100 comme décrit par Cerri et al. (2012).

Une région de 2,2 kb en amont du site d'initiation de la transcription de *NF-YA1* et la région 3'UTR de *NF-YA1* ont été respectivement clonées en amont et en aval du gène *uidA* codant pour la β -glucuronidase dans le vecteur binaire pK7m34GW (Karimi et al., 2005) par la technologie Gateway (Invitrogen). Une région de 2,6 kb en amont du codon d'initiation de la traduction de *NF-YA2* a été clonée en amont du gène *uidA* dans le vecteur binaire pKGWFS7 (Karimi et al., 2002) par la technologie Gateway (Invitrogen).

Pour l'expression des constructions *NF-YA RNAi* et *NF-YA2 RNAi*, une région conservée de 340 paires de bases dans la séquence codante de *NF-YA1* et une région de 200 paires de bases dans le 3'UTR de *NF-YA2* ont respectivement été amplifiées par PCR et clonées dans le vecteur pFRN (P. Laporte) par la technologie Gateway (Invitrogen).

Pour les expériences de transactivation dans les lignées L416 de *Medicago truncatula*, les séquences codantes de *NF-YA1*, *ERN1*, et *NF-YA2* ont été amplifiées par PCR et insérées en aval du *p35S* entre les sites BamH1 et Sac1 du vecteur binaire pBI121 (Promega).

Les séquences des amorces utilisées sont indiquées dans le tableau 4.

3. Criblage en double hybride et interactions protéine-protéine dans la levure

Le vecteur BD-NF-YA1 a été transformé dans la souche de levure AH109 par la méthode décrite dans le Yeast Protocols Handbook (Clontech). Les tests d'auto-activation ont

été effectués par dépôt d'une goutte de suspension de la souche de levure résultante AH109 BD-NF-YA1 sur milieu minimum sans tryptophane ni histidine, et additionné ou non de 3-amino-triazol (3-AT) (entre 2,5 et 10 mM).

Pour le criblage en double hybride, la souche AH109 BD-NF-YA1 a été transformée par les ADN plasmidiques issus de la banque d'ADNc décrite dans la partie 2. Environ 4.10^6 transformants de levure ont été criblés pour l'activation du gène rapporteur *HIS3* sur milieu minimum sans leucine, tryptophane, et histidine, additionné de 3-AT à une concentration finale de 5 mM. Les inserts des clones *HIS*⁺ ont été amplifiés par PCR et séquencés. Les logiciels BLASTx et BLASTn (NCBI) ont été utilisés pour identifier les séquences obtenues.

Les interactions avec à priori ont été testées après co-transformation de la souche AH109 par les plasmides BD-NF-Y et AD-NF-Y utilisés et repiquage des transformants d'un milieu sans tryptophane ni leucine sur un milieu sans tryptophane, leucine, histidine, et additionné de 3-AT.

4. Expression transitoire dans les feuilles de *Nicotiana benthamiana*

Les vecteurs binaires *PAM-PAT p35S : YFP : GTW* et *PAM-PAT p35S : 3HA : GTW* contenant les séquences codantes des NF-Ys et les vecteurs binaires pLP100 contenant les fusions *pERN1 : GUS*, *INF : GUS* et *NF-box : GUS*, ont été introduits dans les souches GV3103 (*PAM-PAT*) et GV3101 (pLP100) d'*Agrobacterium tumefaciens*. Les souches bactériennes portant les différentes constructions et celles portant la protéine p19 anti-silencing (Voinnet et al., 2003) (expériences de localisation subcellulaire uniquement) ont été mises en culture à 28°C pendant 16 heures, et resuspendues dans une solution contenant du MgCl₂ (10 mM), du MES (10 mM, pH 5.6) et de l'acétosyringone (100 µM). Après incubation à température ambiante pendant 2 heures, les cultures d'*Agrobacterium tumefaciens* ont été infiltrées dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana* âgées de trois semaines à l'aide d'une seringue de 1 mL. Pour les co-agroinfiltrations, des volumes égaux de chaque culture d'*Agrobacterium tumefaciens* ajustés à une DO₆₀₀ = 0.5 (localisation subcellulaire) ou 0.25 (transactivation) ont été mélangés avant infiltration. Les plantes infiltrées ont été gardées dans une chambre de culture à 21°C (16 heures de photopériode et intensité lumineuse de 70 µE.m⁻².s⁻¹). La localisation subcellulaire des protéines chimériques, l'activité glucuronidase des fusions transcriptionnelles, ou l'expression des protéines

chimériques, ont été analysées sur des disques foliaires prélevés 36 heures après infiltration. Les extraits protéiques ont été chargés dans un gel de poly-acrylamide, et les western-blots ont été réalisés à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-HA couplés à la peroxydase (Roche).

5. Culture des plantes de *Medicago truncatula* et traitements effectués

Pour la transformation des racines de *Medicago truncatula*, des jeunes plantules ont été sectionnées à quelques millimètres de l'apex racinaire avec un scalpel stérile, et mises en co-culture avec une souche d'ARqua1 qui porte la construction appropriée, par application d'une goutte de suspension bactérienne ($DO_{600} = 1$) cultivée dans du milieu Luria-Bertani (LB). Les plantes transformées ont été sélectionnées sur un milieu Fahraeus gélosé additionné de kanamycine à 25 mg.mL^{-1} ou 30 mg.mL^{-1} (L416) trois semaines après inoculation par ARqua1, puis transférées sur milieu gélosé sans azote ni antibiotique recouvert de « papier poche », comme décrit par Boisson-Dernier et al. (2005). Pour les expériences de transactivation, les systèmes racinaires des plantes composites L416, L416 *nsp1*, et L416 *ern1* portant les constructions *p35S : NF-YA1*, *p35S : NF-YA2*, ou *p35S : ERN1* ont été analysés entre 5 et 7 jours après transfert sur papier poche par une coloration GUS histochimique. Les plantes composites A17 portant les constructions *pNF-YA1 : GUS*, *pNF-YA2 : GUS*, *NF-YA RNAi*, ou *NF-YA2 RNAi* ont subi différents traitements avant coloration. Les traitements des racines de *Medicago truncatula* par des NFs, *Sinorhizobium meliloti*, ou de l'eau (contrôle) ont été réalisés comme décrit ci-dessous. Les racines des plantes composites ont été immergées dans de l'eau, dans une solution de NFs à 10^{-9}M , ou dans une suspension de *Sm2011-lacZ* ($DO_{600}=0.01$). Après 1 heure d'incubation, les solutions en excès ont été retirées et les boîtes contenant les plantes composites ont été placées verticalement dans une chambre de culture à 25°C avant la collecte des échantillons. Pour les traitements par des NFs sur les racines de plantes composites, l'incubation des plantes dans la chambre de culture s'est faite pendant 5 heures puis les échantillons ont été prélevés. Les racines des plantes RNAi ont été récoltées pour une extraction d'ARNs, et les racines des plantes *pNF-YA2 : GUS* ont été colorées. Les racines des plantes inoculées par *Sm2011-lacZ* ont été colorées entre 3 et 5 jours après inoculation.

Pour les analyses d'expression dans les mutants symbiotiques, des germinations de *Medicago truncatula* A17 ou des mutants utilisés ont été mises en culture dans des caissons

de brumisation en présence de milieu carencé en azote comme décrit dans le *Medicago truncatula* Handbook. Après 5 jours de culture, les plantules ont été transférées dans 50 mL de Fahraeus liquide additionné de NFs (10-8M) pendant 1, 2, 4, 6, ou 12 heures. Les ARNs des racines ont ensuite été extraits.

6. Colorations GUS et β -galactosidase

La coloration histochimique pour l'activité GUS a été réalisée à l'aide du substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (Biosynth.). Les réactions GUS ont été réalisées dans le noir à 37°C pendant 1 à 6 heures, dans une solution contenant 1 mM de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide, 0.5 mM de ferricyanide de potassium, 0.5 mM de ferrocyanide de potassium, 5 mM de Na₂EDTA, et 0.1 M de tampon phosphate (pH 7.0). Les disques de *Nicotiana benthamiana* ont d'abord été placés sous vide pendant 20 minutes dans le tampon de réaction GUS additionné de triton 0.1% avant l'incubation à 37°C. Les racines transgéniques de *Medicago truncatula* ont directement été incubées dans le tampon GUS. L'intensité de la coloration GUS des racines transgéniques a été analysée par une méthode de quantification visuelle comme décrit par Andriankaja et al. (2007). Pour les tests d'activité GUS enzymatique, les tissus foliaires ont été broyés dans l'azote liquide et homogénéisés dans un tampon d'extraction protéique GUS comme décrit par Andriankaja et al. (2007). Le substrat X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, Biosynth. B7200) a été utilisé pour le marquage de l'activité β -galactosidase dans les cordons d'infection.

7. Méthodes de microscopie

Pour les coupes transversales, les racines colorées ont été fixées dans du tampon phosphate à 0.1 M additionné de glutaraldéhyde (2%), déshydratées dans l'éthanol, et incluses dans une résine Technovit 7100 (Heraeus Kulzer) avant de réaliser des coupes de 5 μ m à l'aide d'un microtome Reichert-Jung 2040. Les tissus racinaires ou nodulaires ont été observés à l'aide d'un microscope optique Axioplan 2 Imaging (Carl Zeiss). Les localisations subcellulaires dans les disques foliaires de *Nicotiana benthamiana* ont été analysées à l'aide d'un microscope optique à épifluorescence (Axiophot2, Carl Zeiss).

8. Analyses de RT-PCR quantitative

Les ARNs ont été extraits des racines de *Medicago truncatula* à l'aide du kit « Macherey-Nagel total RNA isolation » selon le protocole du fournisseur. Les ARN ADN-free ont été quantifiés, et leur intégrité a été vérifiée sur des puces Agilent RNA Nano Chip (Agilent Technologies). La synthèse des brins complémentaires d'ADN a été réalisée à partir de 500 à 1000 ng d'ARN, par hybridation d'un oligo(dT) et avec l'enzyme SuperScript II (Invitrogen) ou Roche reverse transcriptase, en suivant les instructions du fournisseur. Les PCR quantitatives ont été réalisées dans des plaques de 384 puits, à l'aide du système Light Cycler 480 (Roche), et en utilisant un mix de SYBR Green I (Roche), selon les instructions du fournisseur. Chaque réaction a été réalisée avec 1 μL de matrice diluée au 1/10 ou 1/20, des amorces concentrées à 0.1 μM , dans un volume final de 6 μL . Le programme de PCR est décrit ci-dessous : 95°C pendant 5 minutes, 45 cycles à 95°C pendant 15 secondes et 60°C pendant 1 minute. Nous avons utilisé un gène codant pour l'ubiquitine comme standard interne pour la comparaison des échantillons. Les données présentées sont la moyenne de 3 à 5 répétitions biologiques et de deux répétitions techniques.

Références bibliographiques

- Andriankaja, A., Boisson-Demier, A., Frances, L., Sauviac, L., Jauneau, A., Barker, D., 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.D., 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* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* **303**.
- Ardourel, M., Demont, N., Debelle, F.D., Maillet, F., Debilly, 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., Godfroy, O., de Billy, F., Saurat, O., Jauneau, A., and Gough, C.** (2008). The RPG gene of *Medicago truncatula* controls Rhizobium-directed polar growth during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 9817-9822.
- 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* lysine motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant Physiology* **142**, 265-279.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 9883-9888.
- Bateman, A., and Bycroft, M.** (2000). The structure of a LysM domain from E-coli membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). *Journal of Molecular Biology* **299**.
- Ben Amor, B., Shaw, S., Oldroyd, G., Maillet, F., Penmetsa, R., Cook, D., Long, S., 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 Journal* **34**, 495-506.
- Ben-Naim, O., Eshed, R., Parnis, A., Teper-Bamnlker, P., Shalit, A., Coupland, G., Samach, A., and Lifschitz, E.** (2006). The CCAAT binding factor can mediate interactions between CONSTANS-like proteins and DNA. *Plant Journal* **46**, 462-476.
- 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*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **55**, 504-513.
- Benson, D.R., and Dawson, J.O.** (2007). Recent advances in the biogeography and genecology of symbiotic Frankia and its host plants. *Physiologia Plantarum* **130**, 318-330.
- Bersoult, A., Camut, S., Perhald, A., Kereszt, A., Kiss, G.B., and Cullimore, J.V.** (2005). Expression of the *Medicago truncatula* DMI2 gene suggests roles of the symbiotic nodulation receptor kinase in nodules and during early nodule development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**.
- 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**, 1269-1276.
- Brewin, N.J.** (1991). Development of the legume root nodule. *Annual review of cell biology* **7**, 191-226.
- Broghammer, A., Krusell, L., Blaise, M., Sauer, J., Sullivan, J.T., Maolanon, N., Vinther, M., Lorentzen, A., Madsen, E.B., Jensen, K.J., Roepstorff, P., Thirup, S., Ronson, C.W.,**

- Thygesen, M.B., and Stougaard, J.** (2012). Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharide signal molecules by direct binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 13859-13864.
- Calvenzani, V., Testoni, B., Gusmaroli, G., Lorenzo, M., Gnesutta, N., Petroni, K., Mantovani, R., and Tonelli, C.** (2012). Interactions and CCAAT-Binding of *Arabidopsis thaliana* NF-Y Subunits. *Plos One* **7**.
- Cannon, S.B., Sterck, L., Rombauts, S., Sato, S., Cheung, F., Gouzy, J., Wang, X., Mudge, J., Vasdewani, J., Schiex, T., Scheix, T., Spannagl, M., Monaghan, E., Nicholson, C., Humphray, S.J., Schoof, H., Mayer, K.F.X., Rogers, J., Quetier, F., Oldroyd, G.E., Debelle, F., Cook, D.R., Retzel, E.F., Roe, B.A., Town, C.D., Tabata, S., Van de Peer, Y., and Young, N.D.** (2006). Legume genome evolution viewed through the *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 14959-14964.
- Capoen, W., and Oldroyd, G.** (2008). How CYCLOPS keeps an eye on plant symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 20053-20054.
- Capoen, W., Goormachtig, S., De Rycke, R., Schroeyers, K., and Holsters, M.** (2005). SrSymRK, a plant receptor essential for symbiosome formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 10369-10374.
- Capoen, W., Sun, J., Wysham, D., Otegui, M., Venkateshwaran, M., Hirsch, S., Miwa, H., Downie, J., Morris, R., Ane, J., and Oldroyd, G.** (2011). Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 14348-14353.
- Cardenas, L., Feijo, J.A., Kunkel, J.G., Sanchez, F., Holdaway-Clarke, T., Hepler, P.K., and Quinto, C.** (1999). Rhizobium Nod factors induce increases in intracellular free calcium and extracellular calcium influxes in bean root hairs. *Plant Journal* **19**.
- Caretti, G., Salsi, V., Vecchi, C., Imbriano, C., and Mantovani, R.** (2003). Dynamic recruitment of NF-Y and histone acetyltransferases on cell-cycle promoters. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 30435-30440.
- Catoira, R., Timmers, A.C.J., 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**.
- 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**.
- Ceribelli, M., Dolfini, D., Merico, D., Gatta, R., Vigano, A., Pavesi, G., and Mantovani, R.** (2008). The histone-like NF-Y is a bifunctional transcription factor. *Molecular and Cellular Biology* **28**, 2047-2058.
- Cerri, M.R., Frances, L., Laloum, T., Auriac, M.C., Niebel, A., Oldroyd, G.E.D., Barker, D.G., Fournier, J., and de Carvalho-Niebel, F.** (2012). *Medicago truncatula* ERN Transcription Factors: Regulatory Interplay with NSP1/NSP2 GRAS Factors and Expression Dynamics throughout Rhizobial Infection. *Plant Physiology* **160**, 2155-2172.
- Charpentier, M., and Oldroyd, G.** (2010). How close are we to nitrogen-fixing cereals? *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 556-564.
- 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 Physiology* **136**, 3582-3593.
- Chen, T., Zhu, H., Ke, D.X., Cai, K., Wang, C., Gou, H.L., Hong, Z.L., and Zhang, Z.M.** (2012). A MAP Kinase Kinase Interacts with SymRK and Regulates Nodule Organogenesis in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* **24**, 823-838.

- Combiér, J.-P., Frugier, F., de Billy, F., Boualem, A., El-Yahyaoui, F., Moreau, S., Vernie, T., Ott, T., Gamas, P., Crespi, M., and Niebel, A.** (2006). MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes & Development* **20**, 3084-3088.
- Combiér, J.P., de Billy, F., Gamas, P., Niebel, A., and Rivas, S.** (2008). Trans-regulation of the expression of the transcription factor MtHAP2-1 by a uORF controls root nodule development. *Genes & Development* **22**, 1549-1559.
- Cooper, J.E.** (2004). Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology*, Vol 41 **41**, 1-62.
- Cooper, J.E.** (2007). Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 1355-1365.
- Corpet, F.** (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical-clustering. *Nucleic Acids Research* **16**, 10881-10890.
- Cullimore, J., and Denarie, J.** (2003). How legumes select their sweet talking symbionts. *Science* **302**, 575-+.
- De Hoff, P.L., Brill, L.M., and Hirsch, A.M.** (2009). Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Molecular Genetics and Genomics* **282**, 1-15.
- de Ruijter, N.C.A., Bisseling, T., and Emons, A.M.C.** (1999). Rhizobium Nod factors induce an increase in sub-apical fine bundles of actin filaments in *Vicia sativa* root hairs within minutes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**.
- den Camp, R., De Mita, S., Lillo, A., Cao, Q.Q., Limpens, E., Bisseling, T., and Geurts, R.** (2011). A Phylogenetic Strategy Based on a Legume-Specific Whole Genome Duplication Yields Symbiotic Cytokinin Type-A Response Regulators. *Plant Physiology* **157**, 2013-2022.
- 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**.
- Den Herder, G., Yoshida, S., Antolin-Llovera, M., Ried, M.K., and Parniske, M.** (2012). Lotus japonicus E3 Ligase SEVEN IN ABSENTIA4 Destabilizes the Symbiosis Receptor-Like Kinase SYMRK and Negatively Regulates Rhizobial Infection. *Plant Cell* **24**, 1691-1707.
- 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**, 129-137.
- Denarie, J., Debelle, F., and Prome, J.C.** (1996). Rhizobium lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual review of biochemistry* **65**, 503-535.
- Dolfini, D., Gatta, R., and Mantovani, R.** (2012). NF-Y and the transcriptional activation of CCAAT promoters. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **47**, 29-49.
- Dolfini, D., Zambelli, F., Pavesi, G., and Mantovani, R.** (2009). A perspective of promoter architecture from the CCAAT box. *Cell Cycle* **8**, 4127-4137.
- Donati, G., Gatta, R., Dolfini, D., Fossati, A., Ceribelli, M., and Mantovani, R.** (2008). An NF-Y-Dependent Switch of Positive and Negative Histone Methyl Marks on CCAAT Promoters. *Plos One* **3**.
- Downie, J.A.** (2005). Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Current biology : CB* **15**, R196-198.
- Downie, J.A., and Walker, S.A.** (1999). Plant responses to nodulation factors. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 483-489.
- Doyle, J.J.** (1998). Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends in Plant Science* **3**, 473-478.
- Duhoux, M., Nicole, M.** (2004). *Biologie Végétale. Associations et Interactions chez les plantes.* Dunod.
- Edwards, A., Heckmann, A.B., Yousafzai, F., Duc, G., and Downie, J.A.** (2007). Structural implications of mutations in the pea SYM8 symbiosis gene, the DMI1 ortholog, encoding a predicted ion channel. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**.

- 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**.
- Ehrhardt, D.W., Wais, R., and Long, S.R.** (1996). Calcium spiking in plant root hairs responding to Rhizobium nodulation signals. *Cell* **85**.
- El Yahyaoui, F., Kuster, H., Ben Amor, B., Hohnjec, N., Puhler, A., Becker, A., Gouzy, J., Vernie, T., Gough, C., Niebel, A., Godiard, L., and Gamas, P.** (2004). Expression profiling in *Medicago truncatula* identifies more than 750 genes differentially expressed during nodulation, including many potential regulators of the symbiotic program(1 w). *Plant Physiology* **136**, 3159-3176.
- 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**.
- Engstrom, E.M., Ehrhardt, D.W., Mitra, R.M., and Long, S.R.** (2002). Pharmacological analysis of nod factor-induced calcium spiking in *Medicago truncatula*. Evidence for the requirement of type IIA calcium pumps and phosphoinositide signaling. *Plant Physiology* **128**.
- Esseling, J.J., and Emons, A.M.C.** (2004). Dissection of Nod factor signalling in legumes: cell biology, mutants and pharmacological approaches. *Journal of Microscopy-Oxford* **214**.
- Esseling, J.J., Lhuissier, F.G.P., and Emons, A.M.C.** (2003). Nod factor-induced root hair curling: Continuous polar growth towards the point of nod factor application. *Plant Physiology* **132**, 1982-1988.
- Fang, Y.W., and Hirsch, A.M.** (1998). Studying early nodulin gene ENOD40 expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa. *Plant Physiology* **116**, 53-68.
- 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**.
- 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**.
- Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A., and Schultze, M.** (1999a). Nod factors modulate the concentration of cytosolic free calcium differently in growing and non-growing root hairs of *Medicago sativa* L. *Planta* **209**.
- Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A., and Schultze, M.** (1999b). Elevation of the cytosolic free Ca²⁺ is indispensable for the transduction of the nod factor signal in alfalfa. *Plant Physiology* **121**.
- Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.-H., Lin, Y.-H., Reid, D.E., and Gresshoff, P.M.** (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of integrative plant biology* **52**, 61-76.
- Ferrer, J.L., Austin, M.B., Stewart, C., and Noe, J.P.** (2008). Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**, 356-370.
- Fields, S., and Song, O.K.** (1989). A novel genetic system to detect protein protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Foucher, F., and Kondorosi, E.** (2000). Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Molecular Biology* **43**, 773-786.
- Fournier, J., Timmers, A.C.J., 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 Physiology* **148**, 1985-1995.
- Frontini, M., Imbriano, C., Manni, I., and Mantovani, R.** (2004). Cell cycle regulation of NF-YC nuclear localization. *Cell Cycle* **3**, 217-222.
- Gage, D.J.** (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR **68**, 280-300.
- 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., Vandenbol, 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 (New York, N.Y.)* **293**, 668-672.
- Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J.-C., Jaubert, M., Simon, D., Cartieaux, F., Prin, Y., Bena, G., Hannibal, L., Fardoux, J., Kojadinovic, M., Vuillet, L., Lajus, A., Cruveiller, S., Rouy, Z., Mangenot, S., Segurens, B., Dossat, C., Franck, W.L., Chang, W.-S., Saunders, E., Bruce, D., Richardson, P., Normand, P., Dreyfus, B., Pignol, D., Stacey, G., Emerich, D., Vermeglio, A., Medigue, C., and Sadowsky, M. (2007). Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science (New York, N.Y.)* **316**, 1307-1312.
- Gleason, C., Chaudhuri, S., Yang, T., Munoz, A., Poovaiah, B., and Oldroyd, G. (2006). Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature* **441**, 1149-1152.
- 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.
- Goormachtig, S., Mergaert, P., Van Montagu, M., and Holsters, M. (1998). The symbiotic interaction between *Azorhizobium caulinodans* and *Sesbania rostrata* molecular cross-talk in a beneficial plant-bacterium interaction. *Sub-cellular biochemistry* **29**, 117-164.
- Graham, P.H., and Vance, C.P. (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology* **131**, 872-877.
- Groth, M., Takeda, N., Perry, J., Uchida, H., Draxl, S., Brachmann, A., Sato, S., Tabata, S., Kawaguchi, M., Wang, T.L., and Parniske, M. (2010). NENA, a *Lotus japonicus* Homolog of Sec13, Is Required for Rhizodermal Infection by Arbuscular Mycorrhiza Fungi and Rhizobia but Dispensable for Cortical Endosymbiotic Development. *Plant Cell* **22**, 2509-2526.
- Gu, T.S., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 382-387.
- Hackenberg, D., Wu, Y., Voigt, A., Adams, R., Schramm, P., and Grimm, B. (2012). Studies on Differential Nuclear Translocation Mechanism and Assembly of the Three Subunits of the *Arabidopsis thaliana* Transcription Factor NF-Y. *Molecular Plant* **5**.
- Haney, C.H., and Long, S.R. (2010). Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 478-483.
- Hassan, S., and Mathesius, U. (2012). The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *Journal of Experimental Botany* **63**, 3429-3444.
- Hayashi, T., Banba, M., Shimoda, Y., Kouchi, H., Hayashi, M., and Imaizumi-Anraku, H. (2010). A dominant function of CCaMK in intracellular accommodation of bacterial and fungal endosymbionts. *Plant Journal* **63**, 141-154.
- Heckmann, A.B., Lombardo, F., Miwa, H., Perry, J.A., Bunnell, S., Parniske, M., Wang, T.L., and Downie, J.A. (2006). *Lotus japonicus* nodulation requires two GRAS domain regulators, one of which is functionally conserved in a non-legume. *Plant Physiology* **142**.
- Heckmann, A.B., Sandal, N., Bek, A.S., Madsen, L.H., Jurkiewicz, A., Nielsen, M.W., Tirichine, L., and Stougaard, J. (2011). Cytokinin induction of root nodule primordia in *Lotus japonicus* is regulated by a mechanism operating in the root cortex. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **24**, 1385-1395.
- Heidstra, R., Geurts, R., Franssen, H., Spaink, H.P., Vankammen, A., and Bisseling, T. (1994). Root hair deformation activity of Nodulation factors and their fate on *Vicia-sativa*. *Plant Physiology* **105**.

- Hirsch, S., and Oldroyd, G.E.D.** (2009). GRAS-domain transcription factors that regulate plant development. *Plant signaling & behavior* **4**, 698-700.
- Hirsch, S., Kim, J., Munoz, A., Heckmann, A.B., Downie, J.A., and Oldroyd, G.E.D.** (2009). GRAS Proteins Form a DNA Binding Complex to Induce Gene Expression during Nodulation Signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **21**.
- Hoelz, A., Debler, E.W., and Blobel, G.** (2011). The Structure of the Nuclear Pore Complex. *Annual Review of Biochemistry*, Vol 80 **80**, 613-643.
- Horvath, B., Yeun, L.H., Domonkos, A., Halasz, G., Gobbato, E., Ayaydin, F., Miro, K., Hirsch, S., Sun, J., Tadege, M., Ratet, P., Mysore, K.S., Ane, J.-M., Oldroyd, G.E.D., and Kalo, P.** (2011). *Medicago truncatula* IPD3 Is a Member of the Common Symbiotic Signaling Pathway Required for Rhizobial and Mycorrhizal Symbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**.
- Imaizumi-Anraku, H., Takeda, N., Charpentier, M., Perry, J., Miwa, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murakami, Y., Mulder, L., Vickers, K., Pike, J., Downie, J.A., Wang, T., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Yoshikawa, M., Murooka, Y., Wu, G.J., Kawaguchi, M., Kawasaki, S., Parniske, M., and Hayashi, M.** (2005). Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature* **433**, 527-531.
- Journet, E.P., Pichon, M., Dedieu, A., Debilly, F., Truchet, G., and Barker, D.G.** (1994). RHIZOBIUM-MELILOTI NOD FACTORS ELICIT CELL-SPECIFIC TRANSCRIPTION OF THE ENOD12 GENE IN TRANSGENIC ALFALFA. *Plant Journal* **6**, 241-249.
- 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.** (2001). *Medicago truncatula* ENOD11: A novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**.
- Kahle, J., Baake, M., Doenecke, D., and Albig, W.** (2005). Nuclear transport of transcription factor NF-Y in higher eukaryotes. *European Journal of Cell Biology* **84**, 47-47.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., and Shibuya, N.** (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**.
- Kalo, P., Gleason, C., Edwards, A., Marsh, J., Mitra, R., Hirsch, S., Jakab, J., Sims, S., Long, S., Rogers, J., Kiss, G., Downie, J., and Oldroyd, G.** (2005). Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* **308**, 1786-1789.
- Kanamori, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Frantescu, M., Quistgaard, E.M.H., Miwa, H., Downie, J.A., James, E.K., Felle, H.H., Haaning, L.L., Jensen, T.H., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., and Stougaard, J.** (2006). A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**.
- Kang, H., Zhu, H., Chu, X., Yang, Z., Yuan, S., Yu, D., Wang, C., Hong, Z., and Zhang, Z.** (2011). A Novel Interaction between CCaMK and a Protein Containing the Scythe_N Ubiquitin-Like Domain in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* **155**.
- Karimi, M., Inze, D., and Depicker, A.** (2002). GATEWAY(TM) vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* **7**, 193-195.
- Karimi, M., De Meyer, B., and Hilson, P.** (2005). Modular cloning in plant cells. *Trends in Plant Science* **10**, 103-105.
- Kevei, Z., Lougnon, 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 reductase1 interacts with NORK and is crucial for nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **19**.
- Kim, I., Sinha, S., deCrombrughe, B., and Maity, S.** (1996). Determination of functional domains in the C subunit of the CCAAT-binding factor (CBF) necessary for formation of a CBF-DNA

- complex: CBF-B interacts simultaneously with both the CBF-A and CBF-C subunits to form a heterotrimeric CBF molecule. *Molecular and Cellular Biology* **16**, 4003-4013.
- Kiss, E., Olah, B., Kalo, P., Morales, M., Heckmann, A., Borbola, A., Lozsa, A., Kontar, K., Middleton, P., Downie, J., Oldroyd, G., and Endre, G.** (2009). LIN, a Novel Type of U-Box/WD40 Protein, Controls Early Infection by Rhizobia in Legumes. *Plant Physiology* **151**, 1239-1249.
- Kondorosi, E., Redondo-Nieto, M., and Kondorosi, A.** (2005). Ubiquitin-mediated proteolysis. To be in the right place at the right moment during nodule development. *Plant Physiology* **137**, 1197-1204.
- Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M., Hakoyama, T., Nakagawa, T., Umehara, Y., Suganuma, N., and Kawaguchi, M.** (2010). How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground. *Plant & cell physiology* **51**, 1381-1397.
- Krusell, L., Madsen, L.H., Sato, S., Aubert, G., Genua, A., Szczyglowski, K., Duc, G., Kaneko, T., Tabata, S., de Bruijn, F., Pajuelo, E., Sandal, N., and Stougaard, J.** (2002). Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature* **420**.
- Kumimoto, R.W., Zhang, Y., Siefers, N., and Holt, B.F.** (2010). NF-YC3, NF-YC4 and NF-YC9 are required for CONSTANS-mediated, photoperiod-dependent flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **63**, 379-391.
- Kumimoto, R.W., Adam, L., Hymus, G.J., Repetti, P.P., Reuber, T.L., Marion, C.M., Hempel, F.D., and Ratcliffe, O.J.** (2008). The Nuclear Factor Y subunits NF-YB2 and NF-YB3 play additive roles in the promotion of flowering by inductive long-day photoperiods in *Arabidopsis*. *Planta* **228**, 709-723.
- Kurkdjian, A.C.** (1995). Role of the differentiation of root epidermal-cells in Nod factor (from *Rhizobium meliloti*)-induced root-hair depolarization of *Medicago sativa*. *Plant Physiology* **107**.
- Laloum, T., de Mita, S., Gamas, P., Baudin, M., Niebel, A.** (2012). CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many? *Trends In Plant Sciences*. Epub ahead of print.
- Laus, M.C., Logman, T.J., Lamers, G.E., Van Brussel, A.A.N., Carlson, R.W., and Kijne, J.W.** (2006). A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. *Molecular Microbiology* **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 Biotechnology Journal* **7**, 430-441.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**.
- 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 sulfated 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, C.X., Distelfeld, A., Comis, A., and Dubcovsky, J.** (2011). Wheat flowering repressor VRN2 and promoter CO2 compete for interactions with NUCLEAR FACTOR-Y complexes. *Plant Journal* **67**, 763-773.
- Li, F.Q., Hou, B.H., Chen, L., Yao, Z.J., and Hong, G.F.** (2008). In vitro observation of the molecular interaction between NodD and its inducer naringenin as monitored by fluorescence resonance energy transfer. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* **40**, 783-789.
- Liao, J.Q., Singh, S., Hossain, M.S., Andersen, S.U., Ross, L., Bonetta, D., Zhou, Y.H., Sato, S., Tabata, S., Stougaard, J., Szczyglowski, K., and Parniske, M.** (2012). Negative regulation of CCaMK is essential for symbiotic infection. *Plant Journal* **72**, 572-584.

- Lievens, S., Goormachtig, S., Herman, S., and Holsters, M. (2002). Patterns of pectin methylesterase transcripts in developing stem nodules of *Sesbania rostrata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**, 164-168.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 10375-10380.
- Liu, J.-X., and Howell, S.H. (2010). bZIP28 and NF-Y Transcription Factors Are Activated by ER Stress and Assemble into a Transcriptional Complex to Regulate Stress Response Genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**, 782-796.
- Lohar, D.P., Schaff, J.E., Laskey, J.G., Kieber, J.J., Bilyeu, K.D., and Bird, D.M. (2004). Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and Rhizobial symbioses. *Plant Journal* **38**, 203-214.
- 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, E.B., Antolin-Llovera, M., Grossmann, C., Ye, J.Y., Vieweg, S., Broghammer, A., Krusell, L., Radutoiu, S., Jensen, O.N., Stougaard, J., and Parniske, M. (2011). Autophosphorylation is essential for the in vivo function of the *Lotus japonicus* Nod factor receptor 1 and receptor-mediated signalling in cooperation with Nod factor receptor 5. *Plant Journal* **65**, 404-417.
- 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*. *Nature Communications* **1**.
- Mantovani, R. (1999). The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* **239**, 15-27.
- Mantovani, R., Lio, X., Pessara, U., Vanhuisjdijnen, R., Benoist, C., and Mathis, D. (1994). Dominant-negative analogs of NF-YA. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 20340-20346.
- Marie, C., Broughton, W.J., and Deakin, W.J. (2001). Rhizobium type III secretion systems: legume charmers or alarmers? *Current opinion in plant biology* **4**, 336-342.
- Marsh, J., Rakocevic, A., Mitra, R., Brocard, L., Sun, J., Eschstruth, A., Long, S., Schultze, M., Ratet, P., and Oldroyd, G. (2007). *Medicago truncatula* NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiology* **144**, 324-335.
- Masiero, S., Imbriano, C., Ravasio, F., Favaro, R., Pelucchi, N., Gorla, M.S., Mantovani, R., Colombo, L., and Kater, M.M. (2002). Ternary complex formation between MADS-box transcription factors and the histone fold protein NF-YB. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 26429-26435.
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., and Batut, J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in microbiology* **17**, 458-466.
- Mbengue, M., Camut, S., de Carvalho-Niebel, F., Deslandes, L., Froidure, S., Klaus-Heisen, D., Moreau, S., Rivas, S., Timmers, T., Herve, C., Cullimore, J., and Lefebvre, B. (2010). The *Medicago truncatula* E3 Ubiquitin Ligase PUB1 Interacts with the LYK3 Symbiotic Receptor and Negatively Regulates Infection and Nodulation. *Plant Cell* **22**.
- Meeks, J.C., and Elhai, J. (2002). Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR **66**, 94-121; table of contents.
- Mergaert, P., VanMontagu, M., and Holsters, M. (1997). Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Molecular Microbiology* **25**, 811-817.
- Meschini, E.P., Blanco, F.A., Zanetti, M.E., Beker, M.P., Kuester, H., Pueher, A., and Aguilar, O.M. (2008). Host genes involved in nodulation preference in common bean (*Phaseolus*

- vulgaris)-*Rhizobium etli* symbiosis revealed - by suppressive subtractive hybridization. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**, 459-468.
- 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*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**.
- Middleton, P., Jakab, J., Penmetsa, R., Starker, C., Doll, J., Kalo, P., Prabhu, R., Marsh, J., Mitra, R., Kereszt, A., Dudas, B., VandenBosch, K., Long, S., Cook, D., Kiss, G., and Oldroyd, G.** (2007). An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for nod factor signal transduction. *Plant Cell* **19**, 1221-1234.
- Miller, D.D., de Ruijter, N.C.A., Bisseling, T., and Emons, A.M.C.** (1999). The role of actin in root hair morphogenesis: studies with lipochito-oligosaccharide as a growth stimulator and cytochalasin as an actin perturbing drug. *Plant Journal* **17**.
- Minchin, F.R.** (1997). Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. *Soil Biology & Biochemistry* **29**, 881-888.
- Mitra, R., Gleason, C., Edwards, A., Hadfield, J., Downie, J., Oldroyd, G., and Long, S.** (2004a). A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 4701-4705.
- Mitra, R.M., Shaw, S.L., and Long, S.R.** (2004b). Six nonnodulating plant mutants defective for Nod factor-induced transcriptional changes associated with the legume-rhizobia symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 10217-10222.
- Miwa, H., Sun, J., Oldroyd, G., and Downie, J.** (2006a). Analysis of nod-factor-induced calcium signaling in root hairs of symbiotically defective mutants of *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 914-923.
- Miwa, H., Sun, J., Oldroyd, G., and Downie, J.** (2006b). Analysis of calcium spiking using aameleon calcium sensor reveals that nodulation gene expression is regulated by calcium spike number and the developmental status of the cell. *Plant Journal* **48**, 883-894.
- 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*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**.
- Miyahara, A., Richens, J., Starker, C., Morieri, G., Smith, L., Long, S., Downie, J.A., and Oldroyd, G.E.D.** (2010). Conservation in Function of a SCAR/WAVE Component During Infection Thread and Root Hair Growth in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 1553-1562.
- Moreau, S., Verdenaud, M., Ott, T., Letort, S., de Billy, F., Niebel, A., Gouzy, J., de Carvalho-Niebel, F., and Gamas, P.** (2011). Transcription Reprogramming during Root Nodule Development in *Medicago truncatula*. *Plos One* **6**.
- Mortier, V., De Wever, E., Vuylsteke, M., Holsters, M., and Goormachtig, S.** (2012). Nodule numbers are governed by interaction between CLE peptides and cytokinin signaling. *Plant Journal* **70**, 367-376.
- Mortier, V., Den Herder, G., Whitford, R., Van de Velde, W., Rombauts, S., D'Haeseleer, K., Holsters, M., and Goormachtig, S.** (2010). CLE Peptides Control *Medicago truncatula* Nodulation Locally and Systemically. *Plant Physiology* **153**.
- Moscatiello, R., Squartini, A., Mariani, P., and Navazio, L.** (2010). Flavonoid-induced calcium signalling in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *New Phytologist* **188**, 814-823.
- Munoz, J.A., Coronado, C., Perez-Hormaeche, J., Kondorosi, A., Ratet, P., and Palomares, A.J.** (1998). MsPG3, a *Medicago sativa* polygalacturonase gene expressed during the alfalfa *Rhizobium meliloti* interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 9687-9692.
- Murray, J., Muni, R., Torres-Jerez, I., Tang, Y., Allen, S., Andriankaja, M., Li, G., Laxmi, A., Cheng, X., Wen, J., Vaughan, D., Schultze, M., Sun, J., Charpentier, M., Oldroyd, G.,**

- Tadege, M., Ratet, P., Mysore, K., Chen, R., and Udvardi, M.** (2011). Vapyrin, a gene essential for intracellular progression of arbuscular mycorrhizal symbiosis, is also essential for infection by rhizobia in the nodule symbiosis of *Medicago truncatula*. *Plant Journal* **65**, 244-252.
- Murray, J.D.** (2011). Invasion by Invitation: Rhizobial Infection in Legumes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**, 631-639.
- Murray, J.D., Karas, B.J., Sato, S., Tabata, S., Amyot, L., and Szczyglowski, K.** (2007a). A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science* **315**, 101-104.
- Niwa, S., Kawaguchi, M., Imaizumi-Anraku, H., Chechetka, S.A., Ishizaka, M., Ikuta, A., and Kouchi, H.** (2001). Responses of a model legume *Lotus japonicus* to lipochitin oligosaccharide nodulation factors purified from *Mesorhizobium loti* JRL501. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**.
- Ogawa, M., Shinohara, H., Sakagami, Y., and Matsubayashi, Y.** (2008). *Arabidopsis* CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science* **319**.
- Oka-Kira, E., Tateno, K., Miura, K., Haga, T., Hayashi, M., Harada, K., Sato, S., Tabata, S., Shikazono, N., Tanaka, A., Watanabe, Y., Fukuhara, I., Nagata, T., and Kawaguchi, M.** (2005). *klavier* (*klv*), A novel hypernodulation mutant of *Lotus japonicus* affected in vascular tissue organization and floral induction. *Plant Journal* **44**.
- Oldroyd, G.** (2001). Dissecting symbiosis: Developments in Nod factor signal transduction. *Annals of Botany* **87**, 709-718.
- Oldroyd, G., Murray, J., Poole, P., Downie, J., Bassler, B., Lichten, M., and Schupbach, G.** (2011). The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *Annual Review Genetics*, Vol 45 **45**, 119-144.
- Oldroyd, G.E.D., and Long, S.R.** (2003). Identification and characterization of nodulation-signaling pathway 2, a gene of *Medicago truncatula* involved in Nod actor signaling. *Plant physiology* **131**, 1027-1032.
- Oldroyd, G.E.D., and Downie, J.M.** (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology* **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. *Current biology : CB* **15**, 531-535.
- Patil, S., Takezawa, D., and Poovaiah, B.W.** (1995). Chimeric plant Calcium/Calmodulin-dependent protein-kinase gene with a neural visinin-like calcium-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 4897-4901.
- Patriarca, E.J., Tate, R., Ferraioli, S., and Iaccarino, M.** (2004). Organogenesis of legume root nodules. *International review of cytology* **234**, 201-262.
- Peck, M.C., Fisher, R.F., and Long, S.R.** (2006). Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* **188**, 5417-5427.
- Peiter, E., Sun, J., Heckmann, A.B., Venkateshwaran, M., Riely, B.K., Otegui, M.S., Edwards, A., Freshour, G., Hahn, M.G., Cook, D.R., Sanders, D., Oldroyd, G.E.D., Downie, J.A., and Ane, J.M.** (2007). The *Medicago truncatula* DMII1 protein modulates cytosolic calcium signaling. *Plant Physiology* **145**, 192-203.
- Perret, X., Staehelin, C., and Broughton, W.J.** (2000a). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR **64**, 180-201.
- Perret, X., Staehelin, C., and Broughton, W.J.** (2000b). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**, 180+.
- 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.
- Petroni, K., Kumimoto, R.W., Gnesutta, N., Calvenzani, V., Fornari, M., Tonelli, C., Holt, B.F., Mantovani, R.** (2012) The promiscuous life of plant nuclear factor Y transcription factor. *Plant Cell*. Epub ahead of print.

- Pichon, M., Journet, E.P., Dedieu, A., Debilly, F., Truchet, G., and Barker, D.G.** (1992). Rhizobium-meliloti elicits transient expression of the early nodulin gene-ENOD12 in the differentiating root epidermis of transgenic Alfalfa. *Plant Cell* **4**.
- 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**.
- Plet, J., Wasson, A., Ariel, F., Le Signor, C., Baker, D., Mathesius, U., Crespi, M., and Frugier, F.** (2011). MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant Journal* **65**, 622-633.
- Popp, C., and Ott, T.** (2011). Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 458-467.
- Quandt, H.J., Puhler, A., and Broer, I.** (1993). Transgenic root-nodules of *VICIA-hirsuta* - a fast and efficient system for the study of gene-expression in indeterminate-type nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **6**, 699-706.
- Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Jurkiewicz, A., Fukai, E., Quistgaard, E.M.H., 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 Journal* **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.
- Redmond, J.W., Batley, M., Djordjevic, M.A., Innes, R.W., Kuempel, P.L., and Rolfe, B.G.** (1986). Flavones induce expression of nodulation genes in rhizobium. *Nature* **323**, 632-635.
- 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 Journal* **49**.
- Roche, P., Debelle, F., Maillet, F., Lerouge, P., Faucher, C., Truchet, G., Denarie, J., and Prome, J.C.** (1991). Molecular-basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium-meliloti* - NODH and NODPQ genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell* **67**, 1131-1143.
- Romier, C., Cocchiarella, F., Mantovani, R., and Moras, D.** (2003). The NF-YB/NF-YC structure gives insight into DNA binding and transcription regulation by CCAAT factor NF-Y. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 1336-1345.
- Rose, C.M., Venkateshwaran, M., Grimsrud, P.A., Westphall, M.S., Sussman, M.R., Coon, J.J., and Ane, J.-M.** (2012). *Medicago* PhosphoProtein Database: a repository for *Medicago truncatula* phosphoprotein data. *Frontiers in plant science* **3**, 122.
- Saito, K., Yoshikawa, M., Yano, K., Miwa, H., Uchida, H., Asamizu, E., Sato, S., Tabata, S., Imaizumi-Anraku, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murooka, Y., Szczyglowski, K., Downie, J.A., Parniske, M., Hayashi, M., and Kawaguchi, M.** (2007). NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* **19**.
- Saur, I.M.L., Oakes, M., Djordjevic, M.A., and Imin, N.** (2011). Crosstalk between the nodulation signaling pathway and the autoregulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *New Phytologist* **190**.
- Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J., and Stougaard, J.** (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* **402**.
- Schnabel, E., Karve, A., Kassaw, T., Mukherjee, A., Zhou, X., Hall, T., and Frugoli, J.** (2012). The *M. truncatula* SUNN gene is expressed in vascular tissue, similarly to RDN1, consistent with the role of these nodulation regulation genes in long distance signaling. *Plant signaling & behavior* **7**, 4-6.
- Shaw, S.L., and Long, S.R.** (2003). Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* root hair cells. *Plant Physiology* **131**.
- Shimoda, Y., Han, L., Yamazaki, T., Suzuki, R., Hayashi, M., and Imaizumi-Anraku, H.** (2012). Rhizobial and Fungal Symbioses Show Different Requirements for Calmodulin Binding to Calcium Calmodulin-Dependent Protein Kinase in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* **24**, 304-321.

- Sieberer, B.J., Timmers, A.C.J., and Emons, A.M.C.** (2005). Nod factors alter the microtubule cytoskeleton in *Medicago truncatula* root hairs to allow root hair reorientation. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI **18**.
- Sieberer, B.J., Chabaud, M., Fournier, J., Timmers, A.C.J., and Barker, D.G.** (2012). A switch in Ca²⁺ spiking signature is concomitant with endosymbiotic microbe entry into cortical root cells of *Medicago truncatula*. *Plant Journal* **69**.
- Sieberer, B.J., Chabaud, M., Timmers, A.C., Monin, A., Fournier, J., and Barker, D.G.** (2009). A Nuclear-Targeted Cameleon Demonstrates Intranuclear Ca²⁺ Spiking in *Medicago truncatula* Root Hairs in Response to Rhizobial Nodulation Factors. *Plant Physiology* **151**.
- Sieberer, B., and Emons, A.M.C.** (2000). Cytoarchitecture and pattern of cytoplasmic streaming in root hairs of *Medicago truncatula* during development and deformation by nodulation factors. *Protoplasma* **214**, 118-127.
- Singh, S., and Parniske, M.** (2012). Activation of calcium- and calmodulin-dependent protein kinase (CCaMK), the central regulator of plant root endosymbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* **15**.
- Sinha, S., Kim, I., Sohn, K., DeCrombrugge, B., and Maity, S.** (1996). Three classes of mutations in the A subunit of the CCAAT-binding factor CBF delineate functional domains involved in the three-step assembly of the CBF-DNA complex. *Molecular and Cellular Biology* **16**, 328-337.
- 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 Physiology* **145**, 183-191.
- Socolow, R.H.** (1999). Nitrogen management and the future of food: lessons from the management of energy and carbon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 6001-6008.
- Soupe, E., Foussard, M., Boistard, P., Truchet, G., and Batut, J.** (1995). Oxygen as a key developmental regulator of *Rhizobium-meliloti* n-2-fixation gene-expression within the Alfalfa root-nodule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 3759-3763.
- Starker, C.G., Parra-Colmenares, A.L., Smith, L., Mitra, R.M., and Long, S.R.** (2006). Nitrogen fixation mutants of *Medicago truncatula* fail to support plant and bacterial symbiotic gene expression. *Plant physiology* **140**, 671-680.
- 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 Journal* **272**.
- Steenhoudt, O., and Vanderleyden, J.** (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *Fems Microbiology Reviews* **24**, 487-506.
- Stokkermans, T.J.W., and Peters, N.K.** (1994). *Bradyrhizobium-elkanii* lipo-oligosaccharide signals induce complete nodule structures on *Glycine soja*. *Siebold-et-Zucc (VOL 193, PG 413, 1994)*. *Planta* **194**, 435-435.
- Stokkermans, T.J.W., Ikeshita, S., Cohn, J., Carlson, R.W., Stacey, G., Ogawa, T., and Peters, N.K.** (1995). Structural requirements of synthetic and natural product lipo-chitin oligosaccharides for induction of nodule primordia on *Glycine soja*. *Plant Physiology* **108**, 1587-1595.
- 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**.
- Sun, J., Miwa, H., Downie, J., and Oldroyd, G.** (2007). Mastoparan activates calcium spiking analogous to nod factor-induced responses in *Medicago truncatula* root hair cells. *Plant Physiology* **144**, 695-702.

- Swainsbury, D.J.K., Zhou, L., Oldroyd, G.E.D., and Bornemann, S.** (2012). Calcium Ion Binding Properties of *Medicago truncatula* Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase. *Biochemistry* **51**, 6895-6907.
- 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*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **54**, 335-347.
- Timmers, A.C., Soupene, E., Auriac, M.C., de Billy, F., Vasse, J., Boistard, P., and Truchet, G.** (2000). Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **13**, 1204-1213.
- Timmers, A.C.J.** (2008). The role of the plant cytoskeleton in the interaction between legumes and rhizobia. *Journal of Microscopy* **231**.
- Timmers, A.C.J., 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.
- Timmers, A.C.J., Auriac, M.C., de Billy, F., and Truchet, G.** (1998). Nod factor internalization and microtubular cytoskeleton changes occur concomitantly during nodule differentiation in alfalfa. *Development* **125**, 339-349.
- Tirichine, L., James, E.K., Sandal, N., and Stougaard, J.** (2006a). Spontaneous root-nodule formation in the model legume *Lotus japonicus*: a novel class of mutants nodulates in the absence of rhizobia. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **19**, 373-382.
- 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 (New York, N.Y.)* **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.** (2006b). Deregulation of a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature* **441**, 1153-1156.
- Truchet, G., Roche, P., Lerouge, P., Vasse, J., Camut, S., Debilly, F., Prome, J.C., and Denarie, J.** (1991). Sulfated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium-meliloti* elicit root nodule organogenesis in Alfalfa. *Nature* **351**.
- Udvardi, M.K., Tabata, S., Parniske, M., and Stougaard, J.** (2005). *Lotus japonicus*: Legume research in the fast lane. *Trends in Plant Science* **10**.
- Van de Velde, W., Zehirov, G., Szatmari, A., Debreczeny, M., Ishihara, H., Kevei, Z., Farkas, A., Mikulass, K., Nagy, A., Tiricz, H., Satiat-Jeunemaitre, B., Alunni, B., Bourge, M., Kucho, K.-i., Abe, M., Kereszt, A., Maroti, G., Uchiumi, T., Kondorosi, E., and Mergaert, P.** (2010). Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science (New York, N.Y.)* **327**, 1122-1126.
- Vanbrussel, A.A.N., Bakhuizen, R., Vanspronsen, P.C., Spaink, H.P., Tak, T., Lugtenberg, B.J.J., and Kijne, J.W.** (1992). Induction of preinfection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipooligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* **257**.
- Vance, C.P.** (2001). Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. *Plant nutrition in a world of declining renewable resources. Plant physiology* **127**, 390-397.
- van Rhijn, P., and Vanderleyden, J.** (1995). The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiological reviews* **59**, 124-142.
- Vasse, J., Debilly, F., Camut, S., and Truchet, G.** (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen-fixation in Alfalfa nodules. *Journal of Bacteriology* **172**, 4295-4306.
- Venkateshwaran, M., Cosme, A., Han, L., Banba, M., Satyshur, K.A., Schleiff, E., Parniske, M., Imaizumi-Anraku, H., and Ane, J.-M.** (2012). The Recent Evolution of a Symbiotic Ion Channel in the Legume Family Altered Ion Conductance and Improved Functionality in Calcium Signaling. *Plant Cell* **24**.

- 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 Journal* **33**, 949-956.
- Wais, R., Galera, C., Oldroyd, G., Catoira, R., Penmetza, R., Cook, D., Gough, C., Denarie, J., and Long, S.** (2000). Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 13407-13412.
- Walker, S.A., and Downie, J.A.** (2000). Entry of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* into root hairs requires minimal nod factor specificity, but subsequent infection thread growth requires nodO or nodE. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 754-762.
- Wang, Y.-Y., Hsu, P.-K., and Tsay, Y.-F.** (2012). Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends in plant science* **17**, 458-467.
- Wenkel, S., Turck, F., Singer, K., Gissot, L., Le Gourrierc, J., Samach, A., and Coupland, G.** (2006). CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 2971-2984.
- Xie, F., Murray, J.D., Kim, J., Heckmann, A.B., Edwards, A., Oldroyd, G.E.D., and Downie, A.** (2012). Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 633-638.
- Xing, Y., Fikes, J., and Guarente, L.** (1993). Mutations in yeast HAP2/HAP3 define a hybrid CCAAT box-binding domain. *Embo Journal* **12**, 4647-4655.
- Yamamoto, A., Kagaya, Y., Toyoshima, R., Kagaya, M., Takeda, S., and Hattori, T.** (2009). *Arabidopsis* NF-YB subunits LEC1 and LEC1-LIKE activate transcription by interacting with seed-specific ABRE-binding factors. *Plant Journal* **58**, 843-856.
- Yang, J., Xie, Z., and Glover, B.** (2005). Asymmetric evolution of duplicate genes encoding the CCAAT-binding factor NF-Y in plant genomes. *New Phytologist* **165**, 623-631.
- Yang, W.C., Deblank, C., Meskiene, I., Hirt, H., Bakker, J., Vankammen, A., Franssen, H., and Bisseling, T.** (1994). *Rhizobium* Nod factors reactivate the cell-cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation. *Plant Cell* **6**.
- 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 Journal* **60**, 168-180.
- Yano, K., Yoshida, S., Mueller, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**.
- Yokota, K., Fukai, E., Madsen, L., Jurkiewicz, A., Rueda, P., Radutoiu, S., Held, M., Hossain, M., Szczyglowski, K., Morieri, G., Oldroyd, G., Downie, J., Nielsen, M., Rusek, A., Sato, S., Tabata, S., James, E., Oyaizu, H., Sandal, N., and Stougaard, J.** (2009). Rearrangement of Actin Cytoskeleton Mediates Invasion of *Lotus japonicus* Roots by *Mesorhizobium loti*. *Plant Cell* **21**, 267-284.
- Young, N.D., and Bharti, A.K.** (2012). Genome-Enabled Insights into Legume Biology. *Annual Review of Plant Biology*, Vol 63 **63**, 283-305.
- Young, N.D., Debelle, F., Oldroyd, G.E.D., Geurts, R., Cannon, S.B., Udvardi, M.K., Bedito, V.A., Mayer, K.F.X., Gouzy, J., Schoof, H., Van de Peer, Y., Proost, S., Cook, D.R., Meyers, B.C., Spannagl, M., Cheung, F., De Mita, S., Krishnakumar, V., Gundlach, H., Zhou, S.G., Mudge, J., Bharti, A.K., Murray, J.D., Naoumkina, M.A., Rosen, B., Silverstein, K.A.T., Tang, H.B., Rombauts, S., Zhao, P.X., Zhou, P., Barbe, V., Bardou, P., Bechner, M., Bellec, A., Berger, A., Berges, H., Bidwell, S., Bisseling, T., Choisne, N., Couloux, A., Denny, R., Deshpande, S., Dai, X.B., Doyle, J.J., Dudez, A.M., Farmer, A.D., Fouteau, S., Franken, C., Gibelin, C., Gish, J., Goldstein, S., Gonzalez, A.J., Green,**

- P.J., Hallab, A., Hartog, M., Hua, A., Humphray, S.J., Jeong, D.H., Jing, Y., Jocker, A., Kenton, S.M., Kim, D.J., Klee, K., Lai, H.S., Lang, C.T., Lin, S.P., Macmil, S.L., Magdelenat, G., Matthews, L., McCorrison, J., Monaghan, E.L., Mun, J.H., Najjar, F.Z., Nicholson, C., Noirot, C., O'Bleness, M., Paule, C.R., Poulain, J., Prion, F., Qin, B.F., Qu, C.M., Retzel, E.F., Riddle, C., Sallet, E., Samain, S., Samson, N., Sanders, I., Saurat, O., Scarpelli, C., Schiex, T., Segurens, B., Severin, A.J., Sherrier, D.J., Shi, R.H., Sims, S., Singer, S.R., Sinharoy, S., Sterck, L., Viollet, A., Wang, B.B., Wang, K.Q., Wang, M.Y., Wang, X.H., Warfsmann, J., Weissenbach, J., White, D.D., White, J.D., Wiley, G.B., Wincker, P., Xing, Y.B., Yang, L.M., Yao, Z.Y., Ying, F., Zhai, J.X., Zhou, L.P., Zuber, A., Denarie, J., Dixon, R.A., May, G.D., Schwartz, D.C., Rogers, J., Quetier, F., Town, C.D., and Roe, B.A. (2011). The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* **480**, 520-524.
- Young, N.D., and Udvardi, M.** (2009). Translating Medicago truncatula genomics to crop legumes. *Current opinion in plant biology* **12**, 193-201.
- Yuan, S.L., Zhu, H., Gou, H.L., Fu, W.W., Liu, L.J., Chen, T., Ke, D.X., Kang, H., Xie, Q., Hong, Z.L., and Zhang, Z.M.** (2012). A Ubiquitin Ligase of Symbiosis Receptor Kinase Involved in Nodule Organogenesis. *Plant Physiology* **160**, 106-117.
- Zanetti, M.E., Blanco, F.A., Beker, M.P., Battaglia, M., and Aguilar, O.M.** (2010). A C Subunit of the Plant Nuclear Factor NF-Y Required for Rhizobial Infection and Nodule Development Affects Partner Selection in the Common Bean-Rhizobium etli Symbiosis. *Plant Cell* **22**, 4142-4157.
- Zhang, Y., Liu, C.M., Emons, A.M.C., and Ketelaar, T.** (2010). The Plant Exocyst. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**, 138-146.
- Zhang, Y.L., and Li, X.** (2005). A putative nucleoporin 96 is required for both basal defense and constitutive resistance responses mediated by suppressor of npr1-1, constitutive 1. *Plant Cell* **17**, 1306-1316.
- Zhu, H., Chen, T., Zhu, M.S., Fang, Q., Kang, H., Hong, Z.L., and Zhang, Z.M.** (2008). A novel ARID DNA-Binding protein interacts with SymRK and is expressed during early nodule development in Lotus japonicus. *Plant Physiology* **148**, 337-347.