



Université
de Toulouse

THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III – Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité: *Biosciences Végétales*

Présentée et soutenue par *Maël Baudin*
Le 26 septembre 2014

Titre: *Structure et fonction des complexes protéiques impliquant les facteurs de transcription NF- κ B au cours de l'interaction symbiotique entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti**

JURY

Christophe Roux, Professeur de l'Université Paul Sabatier, Toulouse, Président
Roberto Mantovani, Professeur de l'Université de Milan, Italie, Rapporteur
Christian Dubos, Chargé de recherche INRA, Montpellier, Rapporteur
Sofie Goormachtig, Professeur de l'Université de Gent, Belgique, Examineur
Benoit Lefèbvre, Chargé de Recherche CNRS, Toulouse, Examineur
Susanna Rivas, Directeur de Recherche CRNS, Toulouse, Examineur

Ecole Doctoral: Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques, Bioingénieries
Unité de recherche: LIPM, UMR 2594/441 CNRS/INRA
Directeur de Thèse: Andreas Niebel
Rapporteurs: Roberto Mantovani, Christian Dubos

Auteur: Maël Baudin

Titre: Structure et fonction des complexes protéiques impliquant les facteurs de transcription NF-Y au cours de l'interaction symbiotique *entre Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*

Directeur de thèse: Andreas Niebel

Résumé:

Les plantes de la famille des légumineuses présentent la capacité d'interagir avec des bactéries du sol appelées rhizobia. Cette association conduit à la formation d'un nouvel organe racinaire: le nodule au sein duquel, les rhizobia différenciées fixent l'azote atmosphérique en ammonium assimilable par la plante. Ainsi, grâce à cette symbiose, les légumineuses sont indépendantes des engrais azotés ce qui présente un avantage économique et agronomique. Le facteur de transcription MtNF-YA1 a été identifié chez la légumineuse modèle *Medicago truncatula* comme un régulateur essentiel de la formation des nodules et de la pénétration des rhizobia dans la racine. MtNF-YA1 appartient à la famille des CCAAT-box binding factor qui est conservée chez l'ensemble des eucaryotes. Cette famille de facteurs de transcription présente la particularité d'agir en hétérotrimères en associant les sous-unités NF-YA, NF-YB et NF-YC. Cette forme trimérique est essentielle au fonctionnement du facteur de transcription et lui permet de lier l'ADN mais aussi d'interagir avec d'autres régulateurs protéiques. Au cours de ce travail, nous avons tout d'abord identifié une protéine très proche de MtNF-YA1 appelée MtNF-YA2 et nous avons démontré que ces deux protéines jouent des rôles partiellement redondant au cours des étapes précoces de la symbiose rhizobienne. La deuxième partie de ce travail a consisté à la caractérisation des protéines interagissant avec ces deux sous-unités NF-YA au cours de la symbiose rhizobienne. Nous avons ainsi décrit des complexes NF-Y trimériques symbiotiques révélant une certaine conservation chez les légumineuses et identifié deux protéines JAZ interagissant avec les sous-unités NF-Y symbiotiques. Ces études ont permis une meilleure compréhension du rôle des sous-unités NF-Y dans la symbiose rhizobienne ont permis d'identifier de nouveaux acteurs essentiels à la régulation de ce processus et ouvrent de nouvelles perspectives concernant les mécanismes de régulation et le mode d'action de NF-YA1.

Mots clés: *Medicago truncatula*, Facteurs de transcription, symbiose, *Sinorhizobium meliloti*, NF-Y, CCAAT-box Binding Factor, nodulation, Légumineuses

Discipline administrative: Biosciences Végétales

Intitulé et adresse du laboratoire: Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes (LIPM) 24 chemin de Borde Rouge – Auzeville CS 52627 31326 CASTANET TOLOSAN CEDEX

Author: Maël Baudin

Title: Structure and function of protein complexes involving NF-Y transcription factors during the symbiotic interaction between *Medicago truncatula* and *Sinorhizobium meliloti*

Thesis supervisor: Andreas Niebel

Abstract:

Legumes plants are able to establish a symbiotic interaction with soil-borne bacteria collectively called rhizobia. This symbiosis leads to the formation of a new root organ named nodule in which differentiated rhizobia fix the atmospheric nitrogen into ammonia for the benefit of the host plant. Thanks to this symbiosis, legume plants are independent of nitrogen fertilizers, which confers them an economical and agronomical advantage. The transcription factor MtNF-YA1 has been previously identified in the model legume *Medicago truncatula* as an essential regulator of nodule formation and rhizobial infection. MtNF-YA1 belongs to the family of CCAAT-box Binding Factor which is conserved in all eukaryotic systems. The NF-Y family is composed by the unrelated NF-YA, NF-YB and NF-YC proteins which assembled into a heterotrimeric complex. This trimeric complex is required for DNA binding and recruitment of further interacting proteins. During this work, we first identified and characterized MtNF-YA2 a protein closely related to MtNF-YA1 and showed that these two proteins share partially redundant functions during the early steps of the rhizobial symbiosis. We then focused on the search of MtNF-YA1 and MtNF-YA2 interacting proteins using non targeted approaches. These studies led to the characterization of several symbiotic heterotrimeric NF-Y complexes that appeared conserved among leguminous plants. We also identified two JAZ proteins interacting with NF-Y subunits casting new light on potential regulation mechanisms of these complexes. This work thus provided new insights concerning the composition and function of NF-YA1-containing protein complexes and opens up new perspectives for the study of their regulation and mode of action.

Key words: *Medicago truncatula*, Transcription factor, symbiosis, *Sinorhizobium meliloti*, NF-Y, CCAAT-box Binding Factor, nodulation, Legumes

Laboratory: Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes (LIPM) 24 chemin de Borde Rouge – Auzeville CS 52627 31326 CASTANET TOLOSAN CEDEX

Remerciements:

Cette thèse vient clôturer un parcours scolaire de près de 25ans. Ce parcours est loin d'être linéaire mais de nombreuses personnes m'ont aidé et conseillé afin que je trouve mon chemin et je voudrais les en remercier. Je pense bien entendu à mes proches: ma famille, mes amis et Aude qui m'ont toujours soutenu et encouragé. Je pense aussi à mes professeurs et à nombreux maîtres de stage qui m'ont prodigué de bons conseils et qui m'ont aidé à apprivoiser et comprendre le monde de la recherche scientifique. Enfin, je souhaiterais remercier particulièrement les personnes qui se sont impliquées directement dans ce travail de doctorat :

Andreas:

En tant que directeur de thèse, tu as su instaurer une bonne ambiance dans le groupe NF-Y et particulièrement dans nos échanges de thésard/directeur ce qui m'a permis de rapidement m'intégrer et me sentir à l'aise. Je te remercie aussi pour la confiance dont tu as fait preuve à mon égard. Tu m'as laissé suivre mes choix et notamment ceux qui ont pu être des erreurs. J'ai ainsi énormément appris. Tu as su me pousser à regarder plus loin et à me confronter à mes difficultés.

Tom:

Etant donné la proximité de nos travaux ça semble presque futile de te remercier pour le côté professionnel de notre relation. Je vais donc insister sur le côté personnel et amical. En tant qu'aîné de ma propre fratrie, j'ai apprécié d'avoir une sorte de grand frère pendant 3 ans, d'avoir quelqu'un qui ouvre la voie. D'autre part, on s'est vraiment bien marrer ensemble entre les débats musicaux, les répliques d'OSS117 et les quelques pintes de bières partagées... j'ai vraiment passé un bon moment au LIPM et c'est en partie grâce à toi.

Agnès:

En restant sur l'image de la famille, Agnès tu as tenu le rôle non pas de mère mais plutôt de grande sœur. Celle qui t'aide pour tes devoirs, qui pique une crise parce que son espace personnel a été envahi mais celle avec qui on aime bien se taquiner et rigoler. Merci pour toute l'aide que tu as pu m'apporter. Je te souhaite une bonne continuation.

Justine P et Sophie:

Vous avez été les deux premières étudiantes que j'ai co-encadrées. Je vous remercie pour votre investissement dans mon travail de thèse et la façon dont vous avez fait avancer la thématique.

Françoise:

Même si tu n'es pas directement impliquée dans le projet NF-Y, nos nombreuses discussions et tes cours personnalisés en statistiques m'ont vraiment aidé. De plus, les nombreux cafés et repas partagés étaient vraiment sympas, j'espère retrouver cette ambiance à Berkeley !!

Pascal:

Tu as toujours été là pour me soutenir, d'un soutien discret mais pas des moindres! Au cours des repas et des diverses discussions, tu as toujours porté attention à mes recherches et à l'avancée de mes projets. Je salue ton professionnalisme et ta capacité à partager tes propres expériences.

Florence, Christine et Jean-Philippe

Vous qui avez composé mon comité de thèse: j'ai beaucoup apprécié ces deux réunions qui m'ont permis de faire le point sur ma thèse, de prendre du recul et de faire des choix. Merci pour la disponibilité et le dynamisme que vous avez mobilisés pour ces comités.

L'ensemble de l'équipe DB-PG

Je crois que l'une des forces de cette équipe est de rassembler des personnes avec des compétences variées et complémentaires. Au cours de cette thèse, j'ai beaucoup appris de chacun des membres de l'équipe, que ce soit au niveau technique ou théorique. Face aux nombreux obstacles rencontrés au cours de ma thèse, j'ai toujours trouvé un soutien, une aide ou une idée pour avancer. Je pense particulièrement à Fernanda, Lisa, Joëlle et Sandra avec qui j'ai particulièrement interagi au cours de ces trois années.

Brice, Sandra, Xavier, Céline, Lisa, Justine F, Pascal, Sandra, Françoise...

En trois ans, je ne sais pas combien de repas et de pauses nous avons partagés mais cela représente un temps relativement conséquent. J'ai beaucoup apprécié ces moments au travail qui permettent de faire un break et qui rendent la journée tellement plus agréable. Grâce à vous, je n'ai jamais eu de réticences à aller au travail. Merci

Mes amis, ma famille et Aude

Enfin, je tiens à remercier tous mes proches qui m'ont accompagné au cours de ces trois ans de thèse. De façon indirecte, vous avez tous permis que ce travail et cette thèse reste un plaisir. Principalement, Aude qui était en première ligne pour supporter les côtés les moins marrants de la thèse à savoir des journées à rallonge, des weekends raccourcis et le manque de disponibilité. Tu as tenu bon et en plus tu as fait part d'un soutien à toutes épreuves.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS:	1
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	2
CHAPITRE I : INTRODUCTION	6
1. LES ENDOSYMBIOSES RACINAIRES	7
1.1. <i>La diversité des associations</i>	7
1.1.1. La symbiose mycorhizienne à arbuscule.....	7
1.1.2. Les symbioses fixatrices d'azote.....	9
1.2. <i>La symbiose rhizobium / légumineuse</i>	10
1.2.1. Intérêt des légumineuses	10
1.2.2. Les principaux couples symbiotiques étudiés.....	11
1.2.3. Les grandes étapes de ce processus symbiotique	12
1.2.3.1. L'étape pré-symbiotique.....	12
1.2.3.2. L'infection l'initiation des divisions corticales	13
1.2.3.3. Le développement du nodule	14
2. MECANISMES MOLECULAIRES DE L'INTERACTION ENTRE <i>MEDICAGO TRUNCATULA ET</i> <i>SINORHIZOBIUM MELILOTI</i>	17
2.1. <i>Production, perception et transduction des signaux bactériens</i>	17
2.1.1. Flavonoïdes et Facteurs Nod	17
2.1.2. La transduction des signaux	19
2.1.2.1. Perception des facteurs Nod.....	19
2.1.2.2. Activation des oscillations calciques nucléaire.....	21
2.2. <i>Décryptage des oscillations calciques et activation de la transcription</i>	23
2.2.1. DMI3, une kinase capable de décoder les oscillations calciques.....	23
2.2.2. Les principaux facteurs de transcription en aval de DMI3	24
2.2.2.1. IPD3 et NIN.....	25
2.2.2.2. Les facteurs de transcription NSP1 et NSP2	26
2.2.2.3. Les facteurs de transcription ERN	27
2.2.2.4. Synthèse des régulations transcriptionnelles en réponse aux NF	28
2.3. <i>Régulation de l'infection et de l'organogénèse nodulaire</i>	29
2.3.1. Les principaux gènes impliqués dans l'infection rhizobienne.....	29
2.3.2. Développement et différenciation nodulaire	31
2.3.3. Autorégulation de la nodulation	34
3. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION NF-Y.....	36
3.1. <i>Mode d'action des facteurs de transcription chez les eucaryotes</i>	36
3.1.1. Séquences régulatrices et initiation de la transcription.....	36
3.1.2. Les principaux domaines protéiques des facteurs de transcription.....	37
3.2. <i>La biologie des facteurs de transcription NF-Y</i>	39
3.2.1. Les protéines liant la boîte CCAAT	39
3.2.2. Structure et formation des complexes NF-Y	41
3.2.2.1. La sous-unité NF-YA.....	41

3.2.2.2.	Le dimère NF-YB / NF-YC	42
3.2.2.3.	Spécificité d'interaction entre les sous-unités de plantes.....	44
3.2.2.4.	Régulations transcriptionnelles post-traductionnelles des NF-Y.....	46
3.3.	<i>Rôles des NF-Y chez les plantes, article 1: CCAAT-box binding factor, Y so many?</i>	47
3.4.	<i>Les NF-Y impliqués dans la nodulation</i>	53
3.4.1.	MtNF-YA1 chez <i>M. truncatula</i>	53
3.4.2.	PvNF-YC1 chez <i>P. vulgaris</i>	55
3.4.3.	LjNF-YB1 et LjNF-YA1 chez <i>L. japonicus</i>	56
3.4.4.	Synthèse	56
4.	PROJET DE THESE	58
CHAPITRE II: RESULTATS		61
1.	REDONDANCE FONCTIONNELLE ENTRE MTNF-YA1 ET MTNF-YA2 POUR LE CONTROLE DES ETAPES PRECOCES DE LA SYMBIOSE RHIZOBIENNE	62
1.1.	<i>Introduction et résumé de l'article</i>	62
1.2.	<i>Bilan.....</i>	76
1.2.1.	Conclusions et perspectives	76
1.2.2.	Implication personnelle.....	76
2.	IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES DIMERES YB/YC AGISSANT AVEC MTNF-YA1 ET MTNF-YA2 AU COURS DE LA SYMBIOSE FIXATRICE D'AZOTE	78
2.1.	<i>Introduction et résumé de l'article</i>	78
2.2.	<i>Bilan.....</i>	99
2.2.1.	Conclusions et perspectives	99
2.2.2.	Mon implication dans ce travail	100
3.	IDENTIFICATION DES PROTEINES INTERAGISSANT AVEC LES COMPLEXES NF-Y AU COURS DE LA SYMBIOSE FIXATRICE D'AZOTE.	101
3.1.	<i>Le crible double hybride: Recherche de candidats sans a priori.....</i>	101
3.1.1.	Introduction.....	101
3.1.2.	Mise au point du criblage	101
3.1.3.	Les protéines identifiées.....	103
3.2.	<i>Rôle des protéines TIFY dans la symbiose rhizobienne</i>	104
3.2.1.	TIN1 et TIN2 sont deux protéines JAZ.....	104
3.2.2.	TIN1 et TIN2 sont issus d'une duplication récente et sont exprimés en conditions symbiotiques 105	
3.2.3.	TIN1 et TIN2 interagissent avec les complexes NF-Y symbiotiques.....	106
3.2.4.	TIN1 et TIN2 sont localisées dans le noyau et le cytoplasme	108
3.2.5.	Vers une caractérisation fonctionnelle de TIN1 et TIN2.....	109
3.2.5.1.	Analyse de mutants	109
3.2.5.2.	RNAi et expression ectopique.....	110
3.2.6.	Conclusions.....	111
3.3.	<i>Recherche de partenaires protéiques avec a priori</i>	111
3.3.1.	NF-Y versus protéines symbiotiques.....	111
3.3.2.	MtNF-YCs versus MtSIN1	112

CHAPITRE III : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	115
1. LES COMPLEXES NF-Y, ACTEURS DE TOUTES LES ETAPES SYMBIOTIQUES CHEZ <i>M. TRUNCATULA</i> ?	
116	
2. CONSERVATION DES COMPLEXES NF-Y SYMBIOTIQUES ENTRE LES LEGUMINEUSES	120
3. QUEL EST LE ROLE DES TINS DANS LA SYMBIOSE RHIZOBIENNE?	123
4. FORMATION DES COMPLEXES HETEROTRIMERIQUES.	127
CHAPITRE V : BIBLIOGRAPHIE.....	131
ANNEXES	150
ANNEXE 1: ARTICLE SCIENTIFIQUE	151
ANNEXE 2: ARTICLE SCIENTIFIQUE	155
ANNEXE 3 EXTRACTION D'ARN ET SYNTHESE DE CDNA.....	159
ANNEXE 4: BIMOLECULAR FLUORESCENCE COMPLEMENTATION	163
ANNEXE 5: WESTERN BLOT	166
ANNEXE 6: CO-IMMUNOPURIFICATION	169
ANNEXE 7: TRANSFORMATION DE LEVURE AU LIAC	172
ANNEXE 8: TRANSFORMATION TRANSITOIRE DE <i>M. TRUNCATULA</i>	173

LISTE DES ABREVIATIONS:

AD	Domaine Activateur
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AM	Mycorhize a Arbuscule
ARF	Auxin Response Factor
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messagers
BiFC	Bi-moléculaire Fluorescence Complementation
CBF	CCAAT Box-Binding Factor
CCaMK	Calcium and Calmoduline Dependant Kinase
cDNA	ADN complémentaire
ChIP	Chromatine Imuno-Purification
CoIP	Co-Immuno-Précipitation
DBD	Dna Binding Domain
DMI	Doesn't Make Infection
EPS	ExoPolySaccharides
ERF	Ethylene Response Factor
GEA	Gene Expression Atlas
HA	Hémagglutinine
HAP	Heme Activator Protein
IZ	Interzone 2-3
JAZ	Jasmonate Zim domain
LPS	LipoPolySaccharides
LRR	Leucine Rich Repeat
NCR	Nodule-specific Cysteine Rich
NF	Facteur Nod
NF-Y	Nuclear Factor-Y
NLS	Nuclear Localisation Signal
ORF	Open Reading Fram
pb	Paire de Base
PIC	Pre-Initiation Complex
PIT	Pré Cordon d'Infection
PPA	Appareil De Pré-Pénétration
PTGS	Post Transcriptionnal Gene Silencing
RLK	Recepteur a Domaine Kinase
RNAi	ARN interférence
TIN	TIFY protein Involved in Nodulation
TSS	Site d'initiation de la Transcription
UTR	Untranslated Region

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

	titre	page
Figure 1	Schéma des grandes étapes de la symbiose à arbuscules.	8
Figure 2	Structures mycorhiziennes dans une racine de <i>Medicago truncatula</i> .	8
Figure 3	Illustrations des symbioses fixatrices d'azote induites par les cyanobactéries (A) ou les bactéries du genre <i>Frankia</i> (B).	10
Tableau 1	Surface et production des principales légumineuses cultivées en 2012	11
Figure 4	Illustrations de la variabilité des interactions rhizobium / légumineuses.	11
Figure 5	principales étapes de la symbiose rhizobium / légumineuse.	12
Figure 6	Déformation des poils absorbants racinaires et formation de microcolonie.	13
Figure 7	Représentation schématique de la progression du cordon d'infection dans les poils et le cortex racinaire.	13
Figure 8	Formation de méristèmes.	14
Figure 9	« Fate map » d'un nodule de <i>M. truncatula</i>	14
Figure 10	Différenciation du nodule et des bactéroïdes.	14
Figure 11	Dialogue moléculaire entre <i>S. meliloti</i> et <i>M. truncatula</i>	17
Figure 12	Exemple de molécules symbiotiques émises lors de l'interaction entre <i>M. truncatula</i> et <i>S. meliloti</i> .	17
Figure 13	Dissection génétique de la transduction du signal NF	19
Figure 14	Réponse du mutant <i>symrk (dmi2)</i> de <i>L. japonicus</i> à l'infection rhizobienne	21
Figure 15	DMI1 est localisée dans l'enveloppe nucléaire et participe à la formation des oscillations calciques.	22
Figure 16	Schéma de synthèse de la transduction du signal NF chez <i>M. truncatula</i>	23

Figure 17	DMI3 est une protéine nucléaire capable de décoder les oscillations calciques.	23
Figure 18	Localisation histochimique de l'activité GUS dans une lignée de <i>M. truncatula</i> exprimant le gène rapporteur <i>GUS</i> sous le contrôle du promoteur d' <i>ENOD11</i>	25
Figure 19	IPD3 est activé par DMI3 et est requis pour la signalisation NF, l'infection rhizobienne et l'organogénèse nodulaire.	25
Figure 20	NIN induit la formation de divisions corticales et régule négativement l'expression de <i>ENOD11</i>	26
Figure 21	NSP1 et NSP2 dimérisent dans le noyau des cellules de <i>N. benthamiana</i>	27
Figure 22	ERN1 est localisée dans le noyau des cellules épidermiques de <i>M. truncatula</i> et active <i>ENOD11</i> en réponse aux NF.	28
Figure 23	Rôle et connexions des régulateurs transcriptionnels dans la voie de signalisation NF.	29
Figure 24	Exemples de phénotypes de mutants altérés dans l'infection rhizobienne.	29
Figure 25	SYMREM1 est associé à la membrane plasmique et requis pour la symbiose fixatrice d'azote.	30
Figure 26	Voies de régulation associées à l'organogénèse nodulaire chez <i>M. truncatula</i> .	31
Figure 27	Modèle du processus d'autorégulation (AON)	35
Figure 28	Schéma de l'organisation classique d'un promoteur eucaryote	36
Figure 29	Représentation 3D de quatre motifs de liaison à l'ADN	38
Figure 30	Localisation et structure de NF-YA	41
Figure 31	Structure des sous-unités B et C du complexe NF-Y	42
Figure 32	Localisation et relocalisation de NF-YB et NF-YC	44
Figure 33	<i>MtNF-YA1</i> est exprimée à l'apex du nodule et est nécessaire à son développement chez <i>M. truncatula</i> .	53
Figure 34	<i>NF-YA1</i> est exprimée et requis lors du processus d'infection rhizobienne chez <i>M. truncatula</i> .	54

Figure 35	PvNF-YC1 est localisé dans le noyau et requis pour la symbiose entre <i>P. vulgaris</i> et <i>R. elti</i> .	55
Figure 36	LjNF-YA1 et LjNF-YB1 dimérisent et sont impliqués dans la formation de division corticales racinaires.	56
Tableau 2	Inventaire des sous-unités du complexe NF-Y impliqués dans la symbiose rhizobienne	56
Figure 37	Une concentration de 5mM de 3-AT est suffisante pour supprimer l'auto-activation induite par BD-NF-YC2 dans la levure	102
Figure 38	Efficacité de transformation de la levure AH109, BD-NF-YC2	102
Figure 39	Schéma du processus utilisé pour le criblage de la banque de cDNA de nodule en utilisant NF-YC2 comme appât.	103
Tableau 3	Synthèse des résultats du crible double hybride avec BD-NF-YC2.	103
Figure 40	Alignement protéique de AtJAZ1 et des TINs	104
Figure 41	Structure et fonctions des protéines JAZ	105
Figure 42	<i>TIN1</i> et <i>TIN2</i> sont proches génétiquement et phylogénétiquement	105
Figure 43	Profils d'expression de <i>TIN1</i> et <i>TIN2</i>	106
Figure 44	TIN1 interagit avec NF-YC2, NF-YC1 et NF-YA1 dans la levure	107
Figure 45	TIN1 est localisé dans le noyau et le cytoplasme des cellules végétales	108
Figure 46	Représentations schématiques des mutants insertionnels dans <i>TIN1</i> et <i>TIN2</i> .	109
Figure 47	Alignement des ARNm des JAZ de <i>M. truncatula</i>	110
Figure 48	MtNF-YC2 n'interagit pas avec les protéines symbiotiques testées.	111
Tableau 4	Synthèse des expérimentations de BiFC entre les NF-Y et les NSP.	112
Figure 49	<i>MtSIN1</i> est principalement exprimé à l'apex des nodules	112
Figure 50	MtSIN1 est localisé dans le noyau et le cytoplasme des cellules végétales	113
Figure 51	MtSIN1 n'interagit pas avec MtNF-YC1 et MtNF-YC2	113

Figure 52	Sous-groupes phylogénétiques incluant les sous-unités NF-Y étudiées	121
Figure 53	Représentation schématique de l'influence du JA et SA sur les endosymbioses racinaires.	123
Figure 54	Alignement protéique des sous-unités NF-Y étudiées au cours de la thèse avec les sous-unités humaines.	129

CHAPITRE I : INTRODUCTION

1. Les endosymbioses racinaires

1.1. La diversité des associations

Le terme symbiose qui étymologiquement signifie "vivre avec" est utilisé dès le 19^{ième} siècle pour définir une notion d'interaction entre au moins deux espèces différentes. Aujourd'hui, le mot symbiose est généralement utilisé pour décrire une association à bénéfice mutuel (Geiman, 1964) où les organismes impliqués s'entre-aident. Il existe deux grands types de symbiose, les ectosymbioses où le symbiote se développe à l'extérieur de l'hôte et les endosymbioses qui représentent une interaction plus intime où le symbiote pénètre dans les cellules de l'hôte. De nombreux types d'interaction symbiotique sont répertoriées, nous pouvons citer l'exemple connu de l'association entre l'*Acacia cornigera* et l'espèce de fourmis *Pseudomyrma ferruginea*. Dans cette ectosymbiose, les fourmis pallient l'absence d'alcaloïde de la plante et l'aident à se défendre contre certains insectes en échange d'un habitat et de nutriments sécrétés par l'acacia (Clement et al., 2008). Dans le cadre de cette étude, nous nous focaliserons sur les endosymbioses racinaires entre une plante et un microorganisme. Dans un premier temps, nous nous intéresserons à la symbiose mycorhizienne à arbuscule puis à deux exemples de symbioses fixatrices d'azote avant de détailler le contexte biologique de cette étude qui est la symbiose rhizobienne.

1.1.1. La symbiose mycorhizienne à arbuscule

La symbiose mycorhizienne à arbuscule (AM) concerne des champignons filamenteux du genre *Glomeromycota* qui sont capables d'interagir avec la plupart des plantes terrestres. Cette symbiose fait partie des plus anciennes endosymbioses racinaires. Il a en effet été trouvé des fossiles de plantes datant de plus de 400 millions d'années possédant des structures typiques de la symbiose AM (Remy et al., 1994). Cette ancienneté coïncide avec le passage à la vie terrestre des organismes végétaux marins. Ainsi, il a été formulé l'hypothèse que le champignon symbiotique aurait accompagné et aidé les végétaux à coloniser les milieux aériens. Cette hypothèse est cohérente avec le principe de cette association où le champignon se comporte comme une extension des racines de l'hôte aidant à l'acquisition de l'eau et des minéraux présents dans le sol (Smith and Smith, 2012). Du fait de son ancienneté, la symbiose AM serait à l'origine d'autres endosymbioses racinaires, ce qui pourrait expliquer la présence de nombreux mécanismes conservés.

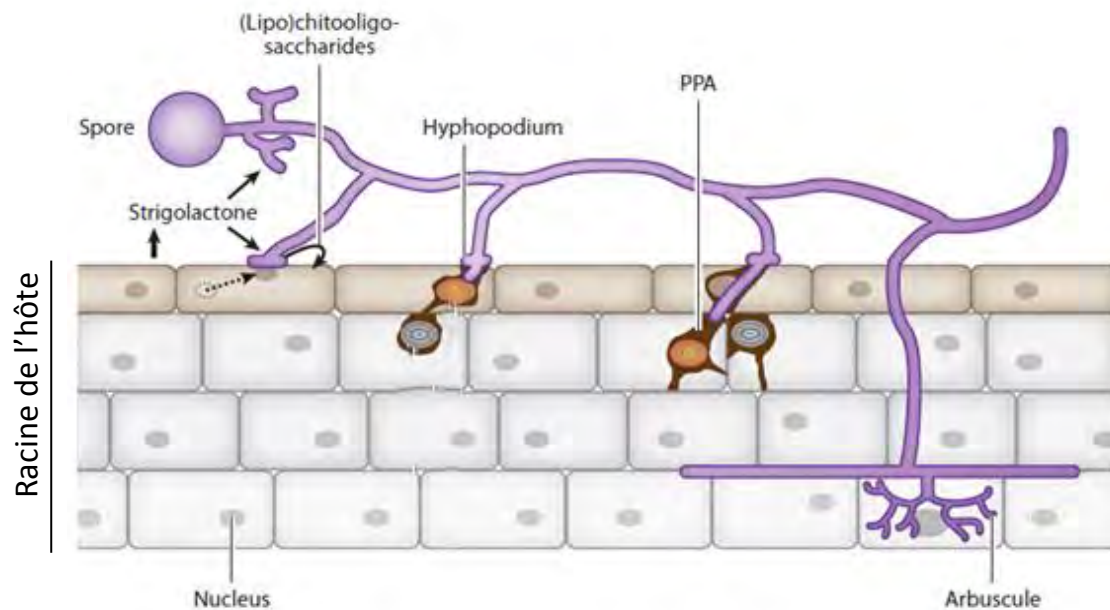


Figure 1 : Schéma des grandes étapes de la symbiose à arbuscules.
 Progression des structures fongiques (violet) dans les racines de l'hôte.

Source: D'après Gutjahr and Parniske, 2013

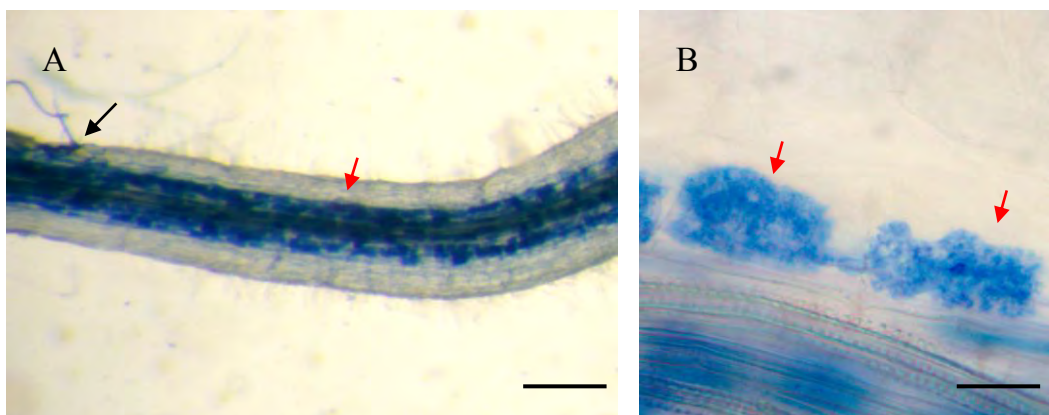


Figure 2 : Structures mycorhiziennes dans une racine de *Medicago truncatula*.

Coloration des structures fongiques en bleu (encre) 30 jours après inoculation avec le champignon *Rhizophagus irregularis*. (A) Vue d'ensemble avec pénétration des hyphes dans la racine (flèche noire) et formation des arbuscules dans le cortex interne (flèche rouge). Barre = 500µm. (B) Agrandissement sur deux arbuscules. Barre = 50µm.

Source = Données personnelles

La mise en place de cette symbiose requière plusieurs étapes distinctes (**Figure 1**), la première étant la reconnaissance mutuelle des organismes. Cette reconnaissance se fait par l'intermédiaire de molécules diffusibles échangées entre les deux microorganismes. Tout d'abord, les spores de champignon AM présentes dans la rhizosphère vont percevoir les strigolactones exsudées par les racines de l'hôte. Les strigolactones sont des hormones végétales impliquées dans le développement des plantes et capables d'induire la croissance et la ramification des hyphes du champignon symbiotique (Besserer et al., 2006; Gutjahr and Parniske, 2013). Suite à cette stimulation, le champignon diffuse des signaux moléculaires incluant un mélange de chitooligosaccharides (Genre et al., 2013) et de lipochitooligosaccharides (Maillet et al., 2011). La perception de ces signaux induit chez la plante des oscillations calciques nucléaires, l'expression de gènes et la stimulation des racines latérales (Chabaud et al., 2011; Maillet et al., 2011; Genre et al., 2013). Après ce dialogue moléculaire, le champignon AM adhère aux cellules de l'épiderme racinaire via une structure nommée hyphopodium (**Figure 1**). Ce contact induit un remodelage cytoplasmique dans les cellules de la plante appelé appareil de pré-pénétration (PPA). Guidé par ce PPA, le champignon pénètre une cellule de l'épiderme racinaire et colonise la racine de manière intra et intercellulaire jusqu'au cortex interne (Gutjahr and Parniske, 2013) (**Figure 1**). Dans le cortex interne, les hyphes du champignon progressent le long de l'axe longitudinal et forment des arbuscules dans les cellules (Demchenko et al., 2004). Les arbuscules sont des structures d'échange en forme d'arbre et hautement ramifiées (**Figure 2**) qui envahissent la quasi-totalité de l'espace cellulaire mais en restant toujours entourées et délimitées par la membrane plasmique (Bonfante and Genre, 2008). L'objectif de cette ramification est d'augmenter au maximum la surface d'échange entre le champignon AM et la plante. L'endomycorhize fournit à la plante de l'eau et des minéraux (principalement du phosphate) et reçoit en échange des composés carbonés issus de la photosynthèse.

Ce schéma d'interaction est retrouvé aussi bien au niveau mécanistique que moléculaire chez les deux principales symbioses fixatrices d'azote (actinorhizienne et rhizobienne). De nombreux gènes sont en effet impliqués dans les différentes associations et l'étude de la symbiose rhizobienne a révélé que de nombreux mutants affectés dans la réponse au champignon symbiotique l'étaient aussi dans la réponse aux rhizobia (Oldroyd, 2013). Cependant, alors que la symbiose AM concerne la majorité des plantes terrestres, la symbiose rhizobienne se limite à la famille des légumineuses exception faite de *parasponia*

(Svistoonoff et al., 2014). Ainsi, les légumineuses auraient recruté des mécanismes déjà présents pour la symbiose AM en les spécialisant pour l'association avec les rhizobia fixatrices d'azote (Delaux et al., 2013b).

1.1.2. Les symbioses fixatrices d'azote

Contrairement à son étymologie qui signifie "privé de vie", l'azote (N) est un élément chimique essentiel au développement des organismes vivants. Il est en effet un des constituants de nombreuses molécules biologiques telles que les protéines ou les acides nucléiques. Bien que l'azote soit le constituant principal de l'atmosphère, il est cependant l'un des facteurs limitants au développement des plantes (Wang et al., 2012). La plupart de l'azote présent dans les sols est en effet sous une forme minérale gazeuse (N_2) non assimilable par les plantes. Ainsi, une pratique agricole courante est l'utilisation de fertilisants azotés pour augmenter artificiellement les concentrations en ammonium (NH_4^+) ou en nitrate (NO_3^-) qui sont directement utilisables par les plantes. Cependant, ces engrais azotés sont peu retenus par les sols et la majeure partie est lessivée polluant alors les cours d'eau et les nappes phréatiques. En plus de cet effet environnemental direct, la production de fertilisants azotés est très coûteuse en énergie et notamment en matières fossiles (Socolow, 1999). Ainsi, dans le contexte politique de protection de l'environnement et de raréfaction des matières fossiles, l'utilisation de ces engrais ne constitue pas une solution pérenne au problème de disponibilité de l'azote pour les cultures.

Des alternatives existent avec notamment la capacité de certains microorganismes procaryotes à fixer l'azote atmosphérique. En effet, certaines bactéries (appelées diazotrophes) ont la capacité de réduire le diazote atmosphérique en ammoniac. Ceci est possible grâce à la nitrogénase, un complexe enzymatique composé de vingt-cinq sous-unités et très conservé parmi les diazotrophes. Ces bactéries vivent librement mais aussi en interaction symbiotique avec d'autres organismes avec lesquels elles partagent leur capacité à fixer l'azote. Ces symbioses fixatrices d'azote présentent un fort intérêt agronomique et économique en apportant aux plantes hôte une prototrophie vis-à-vis de l'azote. En plus de la symbiose rhizobienne, sur laquelle porte cette thèse, il existe deux autres symbioses fixatrices d'azote majeures impliquant des cyanobactéries d'une part et des bactéries du genre *Frankia* d'autre part.

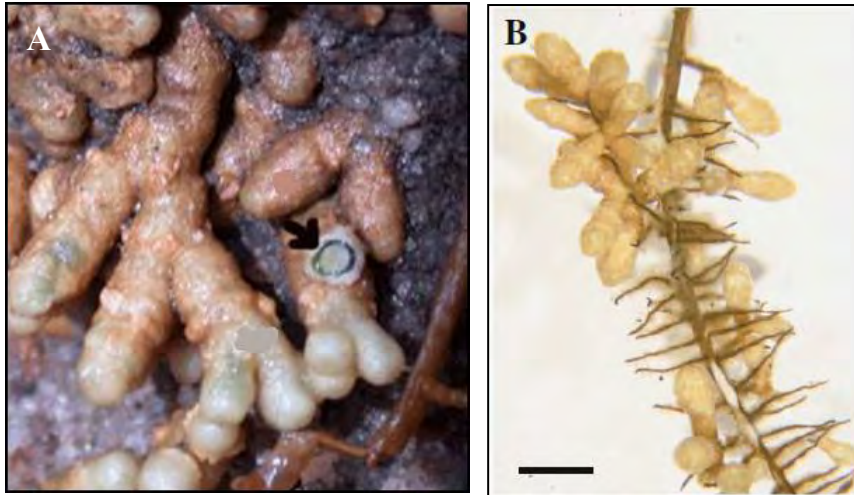


Figure 3 : Illustrations des symbioses fixatrices d'azote induites par les cyanobactéries (A) ou les bactéries du genre *Frankia* (B).

Sources: (A) <http://plantnet.rbg Syd.nsw.gov.au/PlantNet/cycad/nitrogen/nfixintro.html>
(B) Franche et al., 2009

Les cyanobactéries sont des bactéries photosynthétiques qui ont la capacité de s'associer avec des plantes (vascularisées ou non), des algues, des champignons ou encore des eucaryotes marins (Franche et al., 2009). Ainsi, les cycas appartenant à l'embranchement des pré-spermaphytes développent des racines spécialisées, appelées racines coralloïdes dédiées à l'accueil des cyanobactéries (**Figure 3A**) (Costa et al., 1999). L'association entre des ptéridophytes du genre *Azolla* et certaines cyanobactéries est même exploitée comme fertilisant biologique pour la culture du riz (Prasanna et al., 2012).

La symbiose actinorhizienne concerne les bactéries filamenteuses du genre *Frankia* et les plantes actinorhiziennes, qui rassemblent environ 200 espèces distribuées sur 24 genres (Franche et al., 2009; Svistoonoff et al., 2014). Cette interaction symbiotique est comme pour la symbiose AM, déterminée par un dialogue moléculaire entre les deux organismes mais les molécules impliquées sont encore peu connues (Pawlowski and Demchenko, 2012). Après cette reconnaissance, nous assistons à l'internalisation de la bactérie dans les tissus de l'hôte via une infection inter ou intracellulaire (Pawlowski and Demchenko, 2012). L'étape finale de la symbiose actinorhizienne est la formation d'un nouvel organe racinaire appelé nodule (**Figure 3B**) (Kucho et al., 2010). Dans cette structure, les bactéries fixent l'azote atmosphérique au bénéfice de l'hôte. Grâce à cette prototrophie vis-à-vis de l'azote, les plantes actinorhiziennes sont considérées comme pionnières et ont la capacité de coloniser les milieux pauvres tels que les moraines glaciaires ou les terrains volcaniques (Kucho et al., 2010).

Cette brève présentation de ces symbioses nous fournit un aperçu de la diversité des associations symbiotiques. Cependant, cela met aussi en évidence une certaine conservation dans les processus et mécanismes d'interaction. La symbiose rhizobienne que nous allons maintenant détailler présente de nombreuses similarités avec la symbiose actinorhizienne mais aussi avec la symbiose AM.

1.2. La symbiose rhizobium / légumineuse

1.2.1. Intérêt des légumineuses

Les légumineuses ou *Fabaceae* sont une famille de plantes dicotylédones comprenant 18 000 espèces avec une forte diversité géographique et morphologique (Gough, 2009). Une grande partie des plantes appartenant à cette famille présente un

Tableau 1: Surface et production des principales légumineuses cultivées en 2012 Source: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>

plantes	Surface (Ha)	production (tonnes)
Haricot	29 290 861	23 598 102
Pois chiche	12 344 291	11 625 545
Lentille	4 206 024	4 557 972
Lupin	887 014	1 290 116
Pois	6 593 926	9 830 015
Soja	104 997 252	241 841 416
Légumineuses fourragères	256 964	1 527 329



Figure 4 : Illustrations de la variabilité des interactions rhizobium / légumineuses.

(A) Nodules sur tige de *Aeschynomene aspera*. (B) Nodules sur tige de *Sesbania rostrata*. (C) Nodules racinaires déterminés sur *Lotus japonicus*. (D) Nodules racinaires indéterminés sur *Medicago truncatula*.

Sources: (A) http://www.oswaldasia.org/species/a/aesas/aesas_07_en.html
 (B) http://tolweb.org/notes/?note_id=3920
 (C) <http://news.jic.ac.uk/2011/12/legumes-give-bacteria-access/>
 (D) Données personnelles

intérêt agronomique que ce soit pour la qualité des graines (riches en protéines) ou en tant que plantes fourragères. Les légumineuses représentent 15% des surfaces agricoles dans le monde (Graham and Vance, 2003) et en 2012 la production mondiale des principales légumineuses s'évaluait à 1,8 milliard de tonnes (**Tableau 1**).

L'un des grands avantages des légumineuses réside dans leur capacité à fixer l'azote atmosphérique via l'interaction avec les bactéries de type rhizobia. Nous estimons que la fixation de l'azote, grâce à cette symbiose, est au moins équivalente à la production d'azote par l'industrie chimique (Gough, 2009). Ainsi, les légumineuses en interaction avec leur symbionte n'ont pas besoin de fertilisants azotés. De plus, après la récolte ou le broyage de la culture, une partie de l'azote est redistribuée dans le sol et sera directement utilisable par les cultures suivantes. Les légumineuses sont donc régulièrement utilisées comme engrais vert dans des systèmes de rotation culturale avec les céréales par exemple.

1.2.2. Les principaux couples symbiotiques étudiés

La famille des légumineuses rassemble aussi bien des arbres que des herbacées annuelles. Ces plantes sont pour la plupart capables d'interagir avec les rhizobia qui sont quant à elles divisées en 13 genres bactériens (Gyaneshwar et al., 2011). De cette diversité résulte une grande variabilité dans l'interaction entre ces deux organismes. Au niveau morphologique, les structures d'accueil des bactéries présentent une grande disparité (**Figure 4**) (Masson-Boivin et al., 2009). Il existe en effet des nodules sur tige (**Figure 4A-B**) et d'autres sur racine (**Figure 4C-D**). Au niveau des nodules racinaires, nous en distinguons deux grands types en fonction de la morphologie et du processus de formation du nodule (Ferguson et al., 2010):

- Les nodules déterminés: Généralement présents chez les légumineuses tropicales ou subtropicales, de forme ronde avec une croissance définie (exemple: *Lotus japonicus* **Figure 4C**)
- Les Nodules indéterminés: Habituellement présents chez les légumineuses tempérées, de forme allongée avec une croissance indéfinie (exemple: *Medicago truncatula* **Figure 4D**)

Afin de faciliter l'étude de cette symbiose dans les années 1980, les organismes de recherche ont sélectionné deux plantes modèles et leur symbionte respectif représentant les

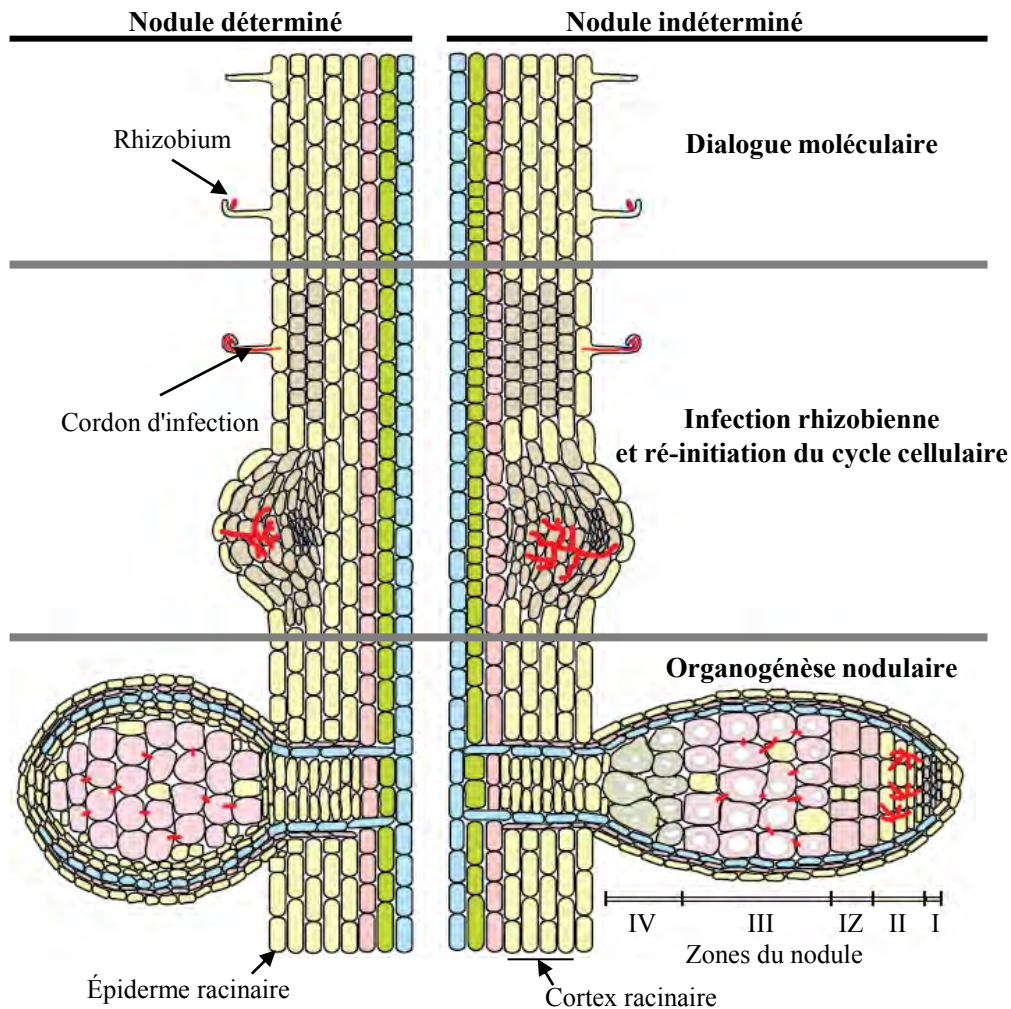


Figure 5: principales étapes de la symbiose rhizobium / légumineuse.

Représentations schématiques des processus symbiotiques de type déterminé (à gauche) et indéterminé (à droite) dans des racines de légumineuses.

Source: d'après Popp and Ott, 2011

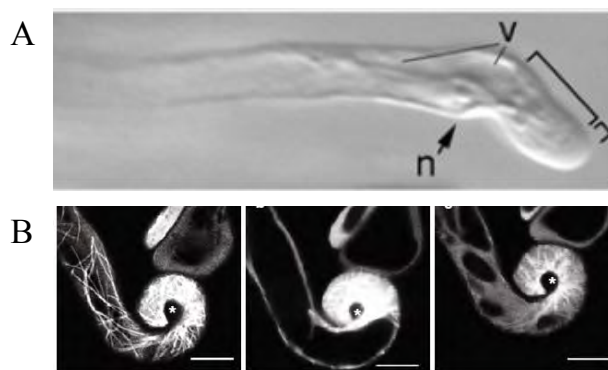


Figure 6: Déformation des poils absorbants racinaires et formation de microcolonie.

(A) 120 minutes après un traitement NF à 10^{-9} M le poil absorbant présente une déformation typique caractérisée par un gonflement et une réorientation de la croissance apicale. (B) Visualisation des microtubules endoplasmiques et corticales dans un poil absorbant replié en forme de crosse de berger autour d'une microcolonie bactérienne (*). Barre = $10\mu\text{m}$

Sources: (A) Sieberer et al., 2005
(B) Perrine-Walker et al., 2014

deux types de nodule: *Medicago truncatula* / *Sinorhizobium meliloti* et *Lotus japonicus* / *Rhizobium loti* (Gough, 2009). Ces deux plantes présentent des caractéristiques intéressantes pour la recherche: elles possèdent un génome de petite taille et diploïde, elles sont autogames avec un temps de génération relativement court et un protocole de transformation génétique a été développé pour chacune d'entre elles. La majorité des autres légumineuses possèdent des génomes de grande taille et/ou de structure complexe (tétraploïde). Ces caractéristiques ne facilitent pas la mise en place d'outils génétiques et génomiques tels que le séquençage du génome, les collections de mutants ou les puces à ARN. Cependant les énormes progrès effectués ces dernières années, avec notamment le séquençage haut débit d'ARN ou d'ADN, atténuent certaines de ces barrières. Par conséquent, de plus en plus d'études portent sur des légumineuses non modèles telles que le pois, le haricot ou encore le soja qui présentent l'avantage d'avoir un réel intérêt agronomique. Toutefois, la majeure partie du travail fondamental reste réalisé sur *M. truncatula* et *L. japonicus* et les mécanismes détaillés dans les sections suivantes concernent principalement ces deux plantes.

1.2.3. Les grandes étapes de ce processus symbiotique

La mise en place de la symbiose rhizobienne peut se diviser en trois grandes étapes: (i) L'étape pré-symbiotique durant laquelle les deux organismes se reconnaissent via un échange de molécules diffusibles. (ii) La pénétration des bactéries dans les tissus de l'hôte associée à une initiation des divisions cellulaires corticales. (iii) L'organogenèse nodulaire, le développement d'un nouvel organe dédié à la fixation de l'azote (**figure 5**) (Popp and Ott, 2011). Nous allons dans un premier temps présenter ces trois étapes et détailler les modifications morphologiques avant de nous intéresser aux mécanismes moléculaires sous-jacents.

1.2.3.1. L'étape pré-symbiotique

Comme pour les symbioses AM et actinorhizienne, le succès de l'interaction entre les rhizobia et les légumineuses est conditionné par un dialogue moléculaire entre les deux organismes. Ce dialogue est initié par la plante qui en condition de carence azotée, diffuse dans la rhizosphère des composés phénoliques (flavonoïdes) reconnus par les bactéries présentes dans l'environnement racinaire proche (Weston and Mathesius, 2013). Ces composés activent chez la bactérie la synthèse de molécules clefs, appelées facteurs Nod

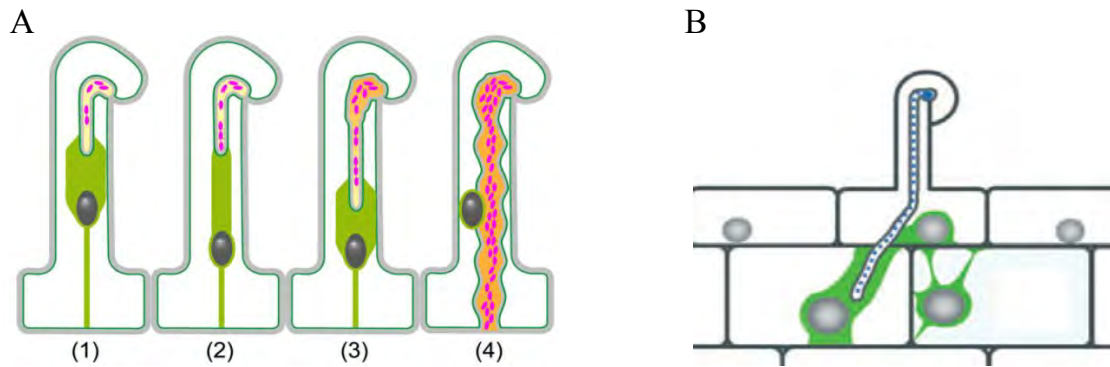


Figure 7: Représentation schématique de la progression du cordon d'infection dans les poils et le cortex racinaire.

Schéma de la progression des bactéries en rose (A) ou bleu (B) dans les cordons d'infection chez *M. truncatula*. Le cordon d'infection est guidé par un pont cytoplasmique (en vert) entre le noyau (dégradé de gris) et l'extrémité du cordon.

Sources: (A) Fournier et al, 2008
(B) Sieberer et al 2012

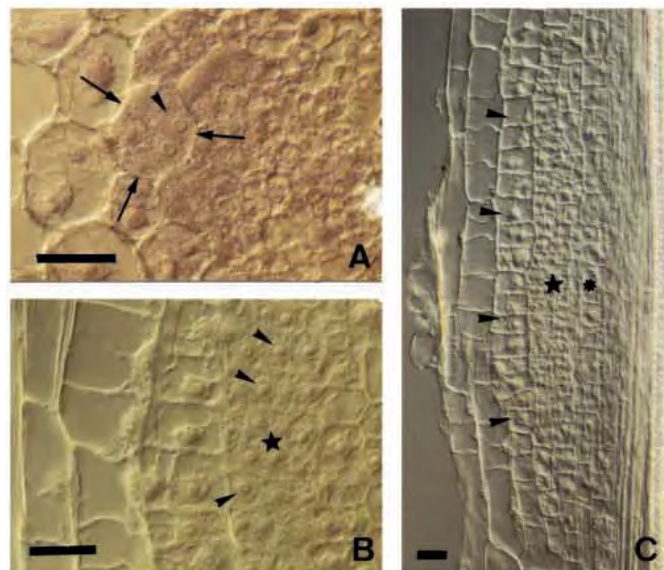


Figure 8: Formation de méristèmes.

Changements cellulaires dans le mutant *skl* de *M. truncatula* (A, coupe transversale) et dans *M. sativa* (B-C, coupes longitudinales). (A) plan de division à l'intérieur d'une cellule du primordium (tête de flèche). (B) Fusion entre des cellules (tête de flèche) pour former le méristème nodulaire (étoiles). (C) Coupe longitudinal d'un méristème nodulaire en formation (étoile) avec le primordium initial (astérisque) à sa base. Barres = 25 μ m

Source : Timmers et al, 1999.

(NF) (Cooper, 2007). Les NF sont perçus par la plante hôte et induisent les premières réponses cytologiques et moléculaires au niveau de la racine (Lerouge et al., 1990). Parmi les réponses cytologiques les plus précoces, nous notons une déformation des poils racinaires principalement dans une région de la racine appelée zone de sensibilité (**Figure 5 et 6A**). Cette déformation est la conséquence d'une réorientation de la croissance apicale du poil absorbant après un contact avec les NF (Sieberer et al., 2005). Dans certains cas, les NF purifiés sont aussi capables d'induire des divisions cellulaires aboutissant à la formation de structures comparables aux nodules (Truchet et al., 1991).

1.2.3.2. L'infection l'initiation des divisions corticales

L'infection rhizobienne qui se traduit par la pénétration de bactéries dans les cellules de la plante, commence par l'attachement des rhizobia à la surface de l'épiderme racinaire. Suite à cette fixation, certaines bactéries se retrouvent piégées par les déformations des poils absorbants dans une structure appelée "crosse de berger" (Oldroyd et al., 2011). Les bactéries continuent alors de se diviser pour former une micro-colonie (**Figure 6B**) au niveau de laquelle une dégradation locale de la paroi du poil absorbant est observée (Perrine-Walker et al., 2014). Cette dégradation dans laquelle des enzymes pariétales des deux partenaires telles la pectate lyase (Xie et al., 2012) ou des cellulases de bactérie (Robledo et al., 2008) sont impliquées, permet une invagination de la membrane plasmique où les bactéries vont progresser. Cette structure est appelée cordon d'infection (Van Spronsen et al., 1994). Comme le PPA pour la symbiose AM, ce processus est guidé par la plante via un remodelage cytoplasmique nommé pré-cordon d'infection (PIT, Pre Infection Thread) (Fournier et al., 2008) (**Figure 7**). Ainsi, le cordon d'infection progresse dans les cellules végétales, tout en restant délimité par la membrane plasmique et une paroi (Oldroyd et al., 2011). La progression du cordon d'infection requière l'action de vésicules de sécrétion pour l'apposition de nouveaux matériaux pariétaux et sa direction semble être gouvernée par le noyau (**Figure 7**). Arrivé à la base d'une couche cellulaire, le noyau de la cellule suivante prend le relais et induit la formation d'un nouveau PIT (Sieberer et al., 2012). Ce mode d'infection au travers des poils absorbants est le mieux décrit et le plus commun mais il existe aussi d'autres types d'infection rhizobienne via des blessures de l'épiderme racinaire ou de manière interstitielle (Oldroyd and Downie, 2008). De façon concomitante à ce processus d'infection, des divisions corticales sont initiées dans le cortex racinaire de l'hôte pour former le primordium nodulaire. Comme nous l'avons évoqué plus

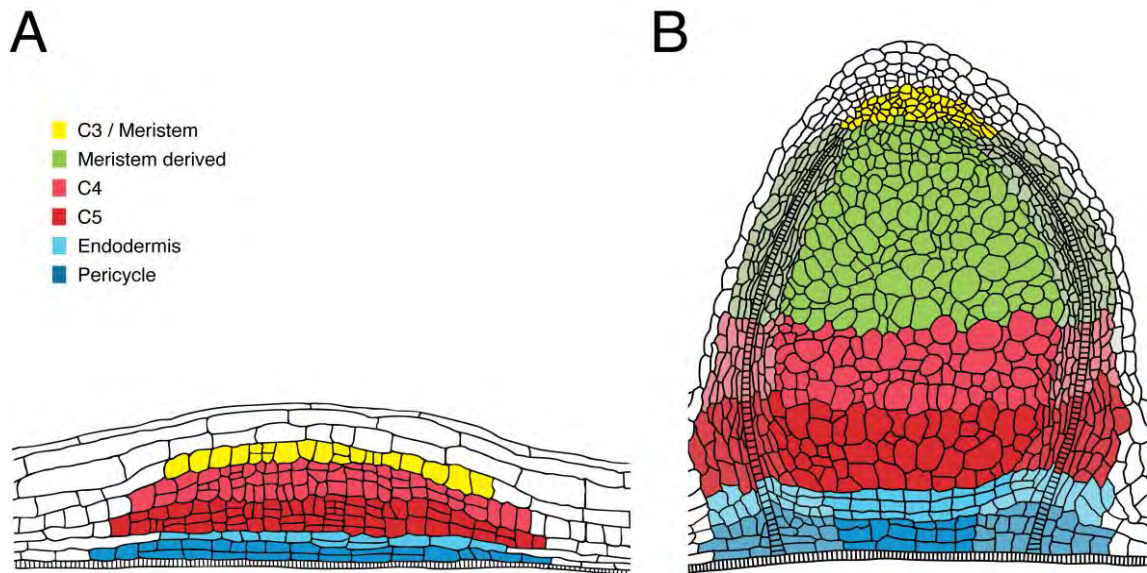


Figure 9: « Fate map » d'un nodule de *M. truncatula*

Les origines et le devenir des couches cellulaires du primordium (A) et du nodule (B) sont indiqués par des couleurs similaires dans les deux panneaux

Source: Xiao et al., 2014

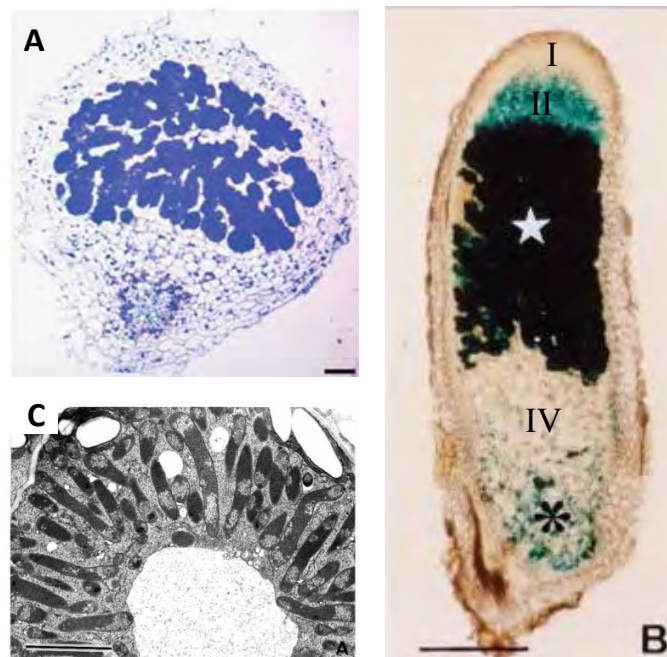


Figure 10: Différenciation du nodule et des bactéroïdes.

(A) Coupe longitudinale de nodule de *Lotus japonicus* en fond clair, barre = 100µm. (B) Coupe longitudinale de nodule de *M. sativa* en fond clair, I= zone méristématique, II= zone d'infection, étoile= zone de fixation, IV= zone de sénescence, astérisque= zone saprophytique, barre= 200µm. (C) Partie d'une cellule fixatrice d'azote en zone 3 en microscopie électronique à transmission, barre= 5µm.

Sources :
 (A) Madsen et al, 2010
 (B) Timmers et al, 2000
 (C) Timmers et al, 1998

haut, il existe deux principaux types de nodule (déterminé ou indéterminé). La mise en place de ce primordium et l'organogénèse qui en découle, sont différentes en fonction du type de nodule formé (Oldroyd et al., 2011). Ainsi, les nodules indéterminés sont initiés dans le cortex interne et le péri-cycle attenants à l'endoderme (**Figure 8**) (Timmers et al., 1999) alors que les nodules déterminés sont originaires du cortex moyen ou externe (Oldroyd et al., 2011). Ces cellules activées vont alors subir une succession de divisions anticlines puis périclines et nous observons dans un deuxième temps une activation des cellules adjacentes (Kondorosi et al., 2005). Récemment, une étude fine de "fate map" chez *M. truncatula* a permis de déterminer précisément la formation et le devenir de chaque couche cellulaire du primordium nodulaire (**Figure 9**) (Xiao et al., 2014). Ainsi, la troisième couche de cellules corticales (C3) forme le méristème nodulaire qui produira la majeure partie des cellules du nodule mature (**Figure 9**) (Xiao et al., 2014). Les couches corticales C4 et C5 sont quant à elles les premières cellules infectées et elles continueront de se développer pour former une partie du cœur du nodule (**Figure 9**). La rencontre des processus d'infection et d'organogénèse est une étape cruciale : les cordons d'infections traversent la couche C3 avant la formation du méristème pour ensuite libérer les bactéries dans les cellules C4/C5 divisées (Timmers et al., 1999; Xiao et al., 2014).

1.2.3.3. Le développement du nodule

L'organogénèse nodulaire est l'aboutissement de la symbiose rhizobienne et consiste au développement du nodule, un organe racinaire unique et dédié à la fixation d'azote. Dans le cadre de nodules à croissance déterminée, le méristème nodulaire possède une durée de vie limitée, ce qui entraîne la formation d'un organe sphérique sans zonation distincte (**Figure 10A**). Dans ce type d'organe, la différenciation des bactéries et des cellules de l'hôte est partielle (Den Herder and Parniske, 2009). Cette différenciation se fait dans le temps et la population d'un nodule déterminé est globalement homogène. Au contraire, dans le cadre de nodules indéterminés, un méristème apical dirige la croissance du nodule pendant toute sa vie, ce qui lui confère une forme allongée. Dans ce type de nodule, la différenciation se fait à la fois dans l'espace et dans le temps et elle conduit à la formation de cellules végétales et bactériennes complètement dédiées à la fixation de l'azote. Ainsi, dans un même nodule nous retrouvons une population hétérogène de tissus représentant plusieurs stades de différenciation, ce qui a conduit à la définition de zone

nodulaire. En fonction de l'âge du nodule, nous retrouvons quatre à six zones déterminées par un type de cellule et par un stade de différenciation (**Figure 10B**) :

- La zone méristématique (Z1) est la zone la plus distale du nodule. Elle est constituée de petites cellules en division active. Cette zone est exempte de bactéries (Vasse et al., 1990).
- La zone d'infection (Z2) est celle dans laquelle la différenciation débute. Dans ces cellules, les bactéries sont libérées des cordons d'infections dans une structure appelée symbiosome. Sur une quinzaine de couches cellulaires, les cellules végétales entament un processus d'endoréduplication et de modifications morphologiques pour devenir pratiquement sphériques (Foucher and Kondorosi, 2000).
- L'interzone 2-3 (IZ) est constituée de une à trois assises cellulaires riches en amyloplaste. Associée au cortex nodulaire, cette zone constitue une barrière qui limite l'entrée de l'oxygène en zone 3 (Soupène et al., 1995).
- La zone 3 (Z3) est le cœur du nodule. Dans cette zone, les bactéries et les cellules végétales ont atteint un stade terminal de différenciation. Les cellules végétales sont hypertrophiées, polyploïdes et possèdent une grande vacuole centrale. Les bactéries sont différenciées en bactéroïde : elles sont de forme allongée et elles ont subi une endoréduplication. Les bactéroïdes enfermés dans les symbiosomes sont disposés de manière perpendiculaire à la membrane plasmique (**Figure 10C**) (Timmers et al., 1998). C'est principalement dans cette zone que la fixation de l'azote atmosphérique en ammonium est réalisée. Associée à cette zone, nous observons une coloration rosée des nodules due à la leghémoglobine, une protéine qui permet de contrôler la teneur en oxygène libre dans les nodules (Downie, 2005).
- La zone de sénescence (Z4) qui apparaît plus tardivement, est caractérisée par une coloration verdâtre due à l'oxydation de la leghémoglobine. Dans cette zone, les cellules végétales et les bactéries qu'elles contiennent dégèrent (Timmers et al., 1998).
- La zone saprophytique (Z5) est une zone encore mal décrite où les bactéries non différenciées sont libérées des cordons d'infections restants. Dans cette zone,

les bactéries vivent de façon saprophytique et constituent une réserve de rhizobia relâchées lors de la rupture du nodule (Timmers et al., 2000).

Du dialogue moléculaire initial à la sénescence du nodule, la symbiose rhizobienne est un processus complexe. Pour réguler la mise en place de cette symbiose, les légumineuses et les rhizobia possèdent une série de gènes plus ou moins spécifiques de ce processus et requise pour son bon déroulement.

Medicago truncatula

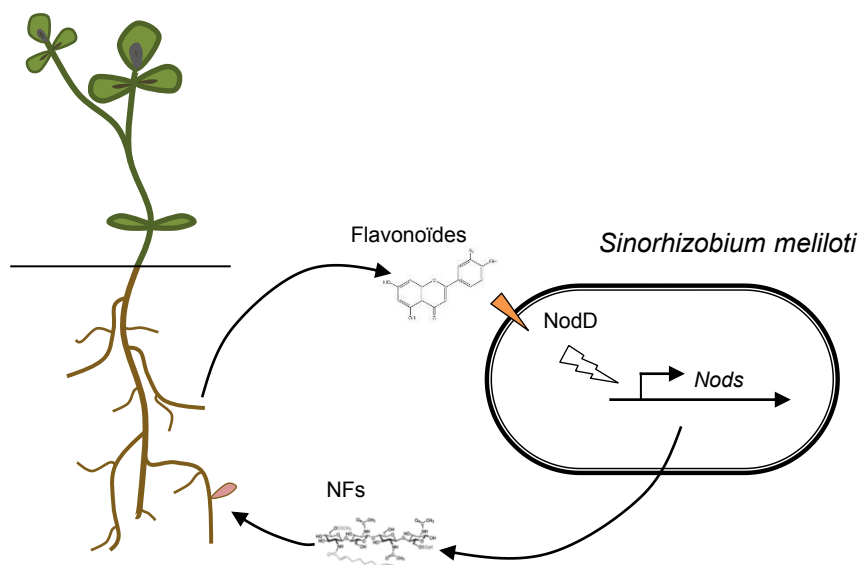


Figure 11: Dialogue moléculaire entre *S. meliloti* et *M. truncatula*

La plante sécrète des flavonoïdes dans la rhizosphère qui sont perçus par la bactérie via le récepteur NodD. Cette perception entraîne l'activation des gènes *Nod* nécessaires à la synthèse des NF qui seront ensuite sécrétés par la bactérie. La plante reconnaît de façon spécifique ces NF ce qui initie le processus symbiotique aboutissant à la formation de nodule.

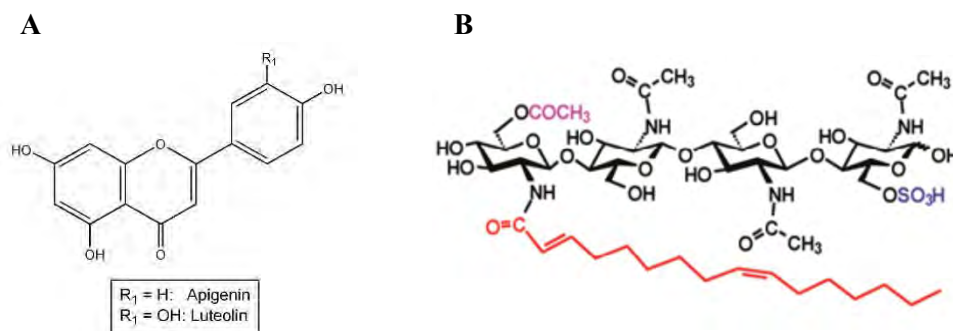


Figure 12: Exemple de molécules symbiotiques émises lors de l'interaction entre *M. truncatula* et *S. meliloti*.

(A) Structure chimique de flavonoïdes (luteolin et apigénine) sécrétés par *M. truncatula*. (B) Structure chimique d'un facteur Nod produit par *S. meliloti*. En noir est représenté le squelette de chitine, la chaîne lipidique est en rouge, le rose et violet représente les décorations du squelette de chitine, respectivement le groupement acétyle et sulfate.

Sources: (A) <http://lpi.oregonstate.edu/>
(B) Gough and Cullimore, 2011

2. Mécanismes moléculaires de l'interaction entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*

Dans cette partie, nous allons reprendre les principales étapes de la symbiose rhizobienne en détaillant les mécanismes moléculaires et génétiques sous-jacents. Afin de synthétiser ces informations, nous resterons dans le cadre particulier de l'interaction entre *M. truncatula* et *S. meliloti*.

2.1. Production, perception et transduction des signaux bactériens

2.1.1. Flavonoïdes et Facteurs Nod

Comme nous l'avons déjà évoqué, la plupart des interactions symbiotiques sont conditionnées par un dialogue moléculaire entre les deux organismes, ce qui garantit la spécificité de l'interaction. Cette association plante / bactérie est contrôlée à deux niveaux : premièrement par la capacité de la bactérie à percevoir les flavonoïdes diffusés par la plante hôte et deuxièmement par la disposition de la plante à reconnaître les signaux bactériens (**Figure 11**).

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires synthétisés à partir de la voie des phénylpropanoïdes. Il existe une grande diversité de composés avec des rôles dans les interactions biotiques mais aussi dans le développement des plantes et dans leur réponse aux stress abiotiques (Gholami et al., 2014). Dans la symbiose, les flavonoïdes sont connus pour induire les gènes *nod* chez la bactérie (Cooper, 2004) et pour réguler les flux d'auxines lors de l'initiation du primordium nodulaire (Mathesius, 2001). Chez *M. truncatula*, les isoflavanoïdes, principalement le formononetin, constituent la majeure partie des flavonoïdes racinaires (74%) (Zhang et al., 2009). Cependant, les flavones ont été démontrées comme étant les plus efficaces dans l'induction des gènes *nod* chez *Sinorhizobium meliloti* (Wasson et al., 2006; Gholami et al., 2014) (**Figure 12A**). Les flavonoïdes (principalement la luteoline et l'apigénine) ont aussi été démontrés comme étant des molécules chimiotactiques attirant les rhizobia vers les racines de l'hôte (Cooper, 2007; Gholami et al., 2014). L'induction des gènes *nod* par les flavonoïdes requiert la protéine bactérienne NodD, qui agit à la fois comme récepteur et régulateur

transcriptionnel (Li et al., 2008a; Hassan and Mathesius, 2012). En réponse à des flavonoïdes, NodD peut se lier à des séquences d'ADN appelées "*nod box*", ce qui active la transcription des gènes *nod*, nécessaires à la synthèse des facteurs Nod (**Figure 11**).

Les facteurs Nod (NF) produits par les rhizobia sont de nature lipo-chitooligosaccharidique: ils sont constitués de l'assemblage d'un squelette de chitine avec diverses décorations et d'une chaîne d'acides gras (Lerouge et al., 1990). Il existe de nombreuses variations possibles pour ces molécules toutefois une même souche de rhizobium ne produit pas un type de NF mais d'avantage un mélange de molécules différentes. Les variations dans la structure des NF se situent au niveau du squelette de chitine, qui peut fluctuer de deux à six résidus de N-acétyl-D-gucosamine. De plus, cet oligomère de chitine peut supporter plusieurs modifications chimiques de types : acétylation, sulfatation, mannosylation etc... Enfin, la chaîne lipidique fixée à l'extrémité non réductrice est de taille variable et plus ou moins saturée (Dénarié et al., 1996). Le NF principalement synthétisé par *Sinorhizobium meliloti* est constitué d'un tétramère de chitine avec groupement (16:2) *N-acyl* et 6-*O*-acétyl à l'extrémité non réductrice et d'une modification 6-*O*-sulfate à l'extrémité réductrice (Cronan and Keating, 2004) (**Figure 12B**). Cette structure est déterminée par le cluster de gènes *nod* présents et activés chez la bactérie. Les gènes bactériens *nodA*, *nodB* et *nodC* sont responsables de la synthèse du squelette de chitine et sont retrouvés chez tous les rhizobia (Dénarié et al., 1996). La présence du groupement sulfate est essentielle pour la spécificité de l'interaction *S. meliloti* avec *M. truncatula* et elle est dépendante de trois gènes, *nodH*, *nodP* et *nodQ* (Schultze et al., 1995).

Il n'a pas été mis en évidence de corrélation directe entre la structure des NF et le spectre d'hôte des rhizobia. Certaines espèces de bactérie sont très restrictives dans leur spectre d'hôte alors que d'autres peuvent infecter un grand nombre de légumineuses (van Rhijn and Vanderleyden, 1995). De plus, cette spécificité d'hôte est également conditionnée par la quantité globale de NF et les proportions relatives de chaque type de molécule diffusé par la bactérie (Perret et al., 2000). Il est intéressant de constater que les NF sont très semblables aux signaux produits par les champignons symbiotiques AM, qui diffusent des mélanges complexes de lipo-chitooligosaccharides et chitooligosaccharides. Ainsi, les rhizobia ont probablement acquis la capacité à produire ce type de molécules symbiotiques clés par un transfert latéral via les champignons AM (Maillet et al., 2011).

2.1.2. La transduction des signaux

Les bactéries symbiotiques émettent un ensemble de signaux que la plante détecte et analyse. Il y a bien sûr des NF diffusés en réponse aux flavonoïdes mais les rhizobia possèdent aussi des exopolysaccharides (EPS) et des lipopolysaccharides (LPS) de surface essentiels au bon déroulement de l'interaction (Gibson et al., 2008). La perception de ces signaux par la plante entraîne des cascades de signalisation aboutissant à l'induction des gènes nécessaires à la pénétration de la bactérie et à l'organogénèse nodulaire. La voie de signalisation en réponse aux rhizobia la mieux caractérisée à ce jour est la transduction du signal NF qui est requise pour la mise en place de cette symbiose (Singh and Parniske, 2012; Oldroyd, 2013). De nombreuses études génétiques ont permis d'identifier des composants de cette voie de signalisation (**Figure 13**). De façon intéressante, certains de ces gènes sont aussi requis pour la symbiose AM ; une hypothèse formulée étant que la symbiose rhizobienne bien plus jeune (60 millions d'années) aurait recruté une voie de signalisation déjà établie pour l'interaction avec les champignons symbiotiques (Delaux et al., 2013b). Dans cette partie, nous allons nous intéresser aux gènes impliqués en amont dans la voie de signalisation NF, de la perception des NF à l'activation des oscillations calciques (**Figure 13**).

2.1.2.1. Perception des facteurs Nod

La perception des NF est une thématique étudiée depuis de nombreuses années et la combinaison d'approches génétiques et biochimiques a permis d'apporter quelques éléments de réponses chez *M. truncatula*. Des études de génétique directe ont mis en évidence l'importance des protéines à motifs de lysine (LysM) dans la perception des chitooligosaccharides et des NF (Arrighi et al., 2006; Smit et al., 2007; Gough and Cullimore, 2011). Ainsi les récepteurs avec des domaines kinase (RLK) intracellulaires et des domaines LysM extracellulaires sont de bons candidats pour lier et reconnaître le squelette de chitine des NF.

Chez *M. truncatula*, il n'existe pas moins de 17 gènes codant pour des LysM-RLK, notamment le gène *NFP* (Nod Factor Perception), qui a été très bien étudié (**Figure 13**). La mutation du gène *NFP* bloque l'ensemble du processus symbiotique y compris les réponses les plus précoces telles que la déformation des poils absorbants (Ben Amor et al., 2003; Arrighi et al., 2006). Cependant le domaine kinase de *NFP* n'est pas fonctionnel, ce qui

suggère une incapacité de la protéine à transmettre le signal au niveau cytoplasmique. Nous pouvons donc faire l'hypothèse qu'au moins un autre récepteur est impliqué comme cela a été démontré chez *L. japonicus* pour NFR5 (Nod Factor Receptor), qui est l'orthologue de NFP, qui s'associe avec un autre RLK : NFR1 (Madsen et al., 2003; Radutoiu et al., 2003). D'autre part, les domaines LysM de *NFP* ont été démontrés comme n'étant pas impliqués dans la reconnaissance du groupement sulfates des NF de *S. meliloti* alors que ce résidu est essentiel pour la spécificité de l'hôte (Bensmihen et al., 2011). Bien que *NFP* soit requis pour la signalisation NF, il n'est par conséquent, pas suffisant pour expliquer la perception des NF chez *M. truncatula*.

Un autre récepteur de type LysM-RLK, appelé *LYK3* et orthologue *NFR1*, a été caractérisé chez *M. truncatula* (Smit et al., 2007). Chez *M. truncatula*, *LYK3* est considéré comme le récepteur d'entrée des bactéries symbiotiques mais il intervient également lors du processus d'infection. En effet, alors que les allèles du mutant *hcl* (root hair curling, qui codent pour *LYK3*) les plus forts bloquent la courbure du poil, essentielle à l'infection (Catoira et al., 2001). Certains allèles plus faibles tels *lyk4* présentent des cordons d'infections anormaux qui progressent mal et forment des structures globulaires (Smit et al., 2007). Enfin, jusqu'à maintenant, aucune activité de liaison directe de NF n'a pu être mise en évidence ni pour *NFP* ni pour *LYK3* (Gough and Cullimore, 2011). Une étude biochimique récente a mis en évidence *LYR3*, une nouvelle LysM-RLK qui est capable de lier spécifiquement les lipo-chitoooligosaccharides chez *M. truncatula* et qui est probablement impliquée dans la perception des signaux bactériens mais aussi fongiques (Fliegmann et al., 2013). Cependant, des études génétiques supplémentaires sont requises pour comprendre le rôle joué par *LYR3* lors de la symbiose rhizobienne.

Le parallèle avec la symbiose AM peut aussi se faire au niveau de la perception des signaux symbiotiques. Nous avons précédemment défini que les deux types de microorganismes possèdent des molécules signales de même nature. Ainsi, les récepteurs chez l'hôte présentent probablement des similarités. Bien que le mutant *nfp* ne présente pas de phénotypes de mycorhization, il a été démontré que la perception des Myc-LCO est dépendante de ce gène (Maillet et al., 2011). De plus, le récepteur *LYR3* a montré une affinité accrue pour les Myc-LCO produits par le champignon AM *Rhizophagus irregularis*. En conclusion, il reste encore de nombreux aspects à identifier et comprendre dans la perception des NF chez *M. truncatula*. Cependant, nous pouvons supposer que

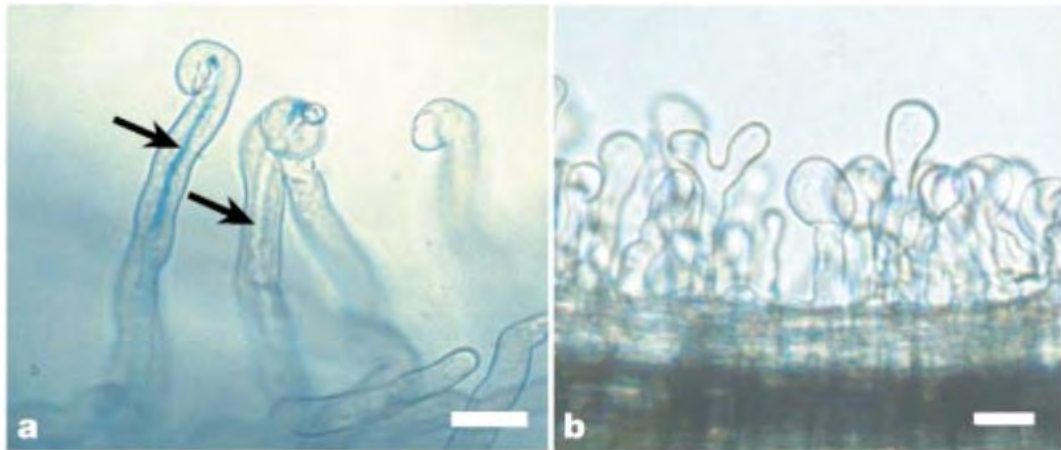


Figure 14: Réponse du mutant *smrk* (*dmi2*) de *L. japonicus* à l'infection rhizobienne

Photographies en fond clair de cordons d'infection (flèches) dans la plante sauvage (a) et de déformation des poils absorbants mais sans infection du mutant *smrk* (b),

Source: Stracke et al., 2002

cette reconnaissance implique un complexe de récepteurs avec de possibles redondances fonctionnelles ce qui rend l'étude de ce système difficile (**Figure 16**).

2.1.2.2. Activation des oscillations calciques nucléaire

La perception des NF entraîne une cascade de signalisations relativement complexes et qui aboutit à l'activation d'oscillations calciques nucléaires. En plus de *NFP*, des études génétiques chez *M. truncatula* ont révélés *DMI1* et *DMI2* qui sont requis pour la mise en place des oscillations calciques nucléaire (**Figure 13**) (Stracke et al., 2002; Ane et al., 2004). De plus, des analyses biochimiques ont mis en évidence d'autres acteurs de cette transduction du signal NF, de la membrane au noyau de la cellule (**Figure 16**).

En plus de *NFP*, *LYK3* et *LYR3* décrits précédemment, un autre récepteur kinase impliqué dans la transduction des signaux symbiotiques a été découvert, il s'agit de *DMI2* (Doesn't Make Infection 2) (Catoira et al., 2000; Endre et al., 2002; Stracke et al., 2002). *DMI2* code pour un récepteur à domaine extracellulaire de type LRR (Leucine Rich Repeat) localisé au niveau de la membrane plasmique (Limpens et al., 2005). Identifié en génétique directe, *DMI2* est essentiel pour l'activation des oscillations calciques nucléaires et il est requis pour la mise en place des symbioses AM et rhizobienne. A la fois chez *M. truncatula* et chez *L. japonicus*, les mutants dans le gène *DMI2* présentent une absence totale d'infection et de développement nodulaire alors que les poils absorbant réagissent toujours au NF par des déformations (**Figure 14**). Ce gène est le premier composant de la voie de signalisation commune qui regroupe des gènes absolument requis pour la mise en place des symbioses AM et rhizobienne (Oldroyd, 2013). Cette voie de signalisation commune rassemble les gènes *DMI1*, *DMI2* et *DMI3* (**Figure 13**) qui constituent le cœur de la voie de transduction des signaux symbiotiques. Cependant, le mode d'action de *DMI2* et son rôle joué dans la cascade de signalisations ne sont pas encore caractérisés. Récemment, chez *L. japonicus* une étude a mis en évidence une régulation post-traductionnelle de SYMRK (*DMI2*) et son interaction avec le récepteur NFR5 (*NFP*) permettant une régulation fine de cette protéine (Antolín-Llovera et al., 2014). Afin d'identifier le mécanisme par lequel *DMI2* transmet l'information aux composants de la voie NF en aval, des expériences de crible double hybride ont été réalisées. Ces approches d'interaction protéine / protéine ont permis d'identifier la protéine HMGR1, qui interagit avec le domaine kinase de ce récepteur (Kevei et al., 2007). *HMGR1* code pour une 3-hydroxy-3-méthylglutaryl CoA reductase, une enzyme qui intervient dans la biosynthèse

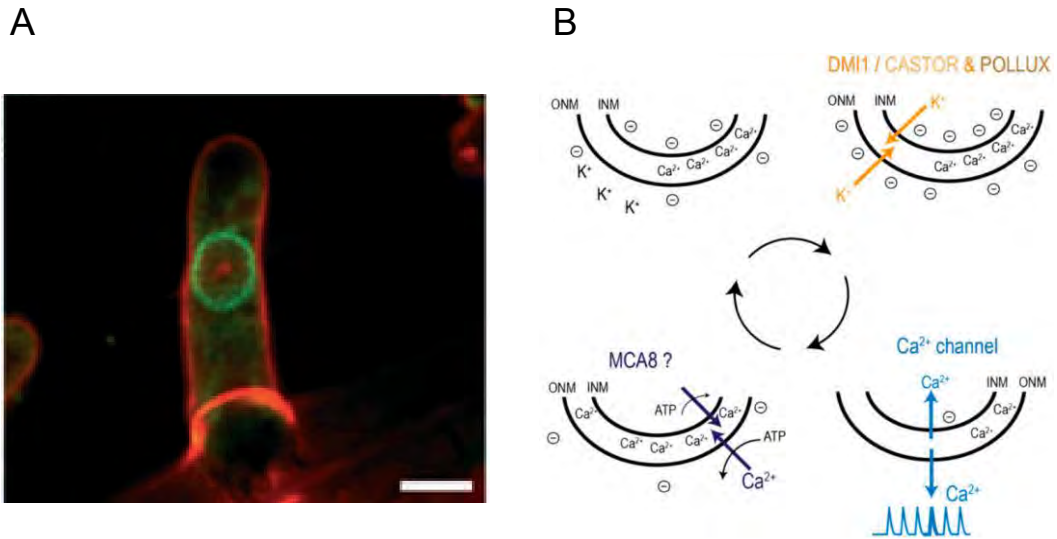


Figure 15: DMI1 est localisée dans l'enveloppe nucléaire et participe à la formation des oscillations calciques.

(A) Localisation de la construction DMI1-GFP exprimée sous le contrôle du promoteur 35S dans un poil absorbant de *M. truncatula*. Barre = 10 μ m (B) Modèle expliquant le rôle de DMI1 dans la mise en place des oscillations calciques.

Sources : (A) Riely et al., 2007
(B) Venkateshwaran et al., 2012)

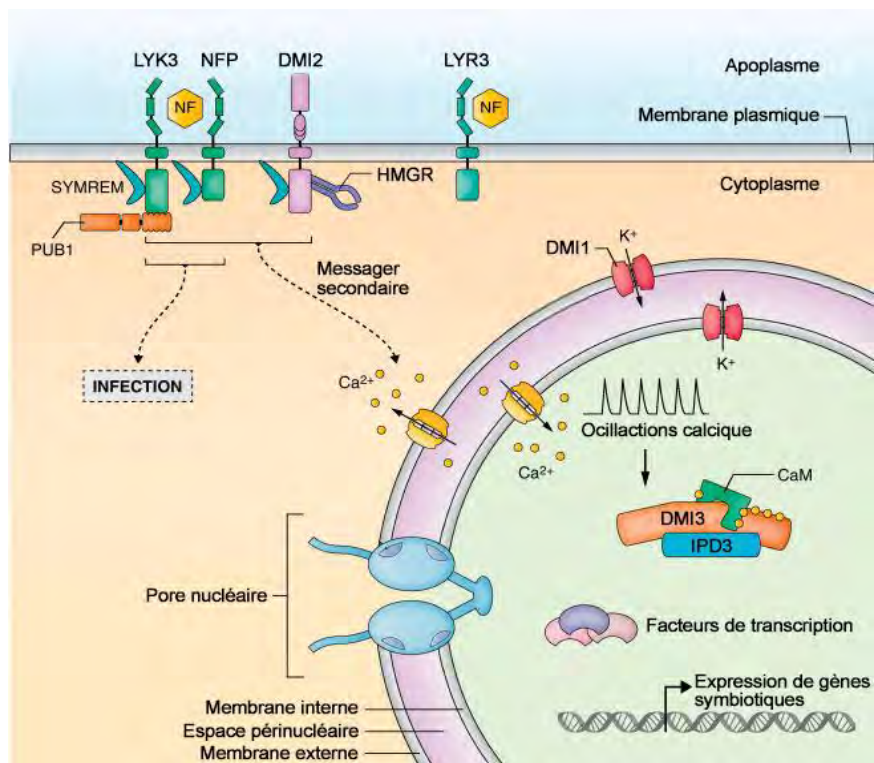


Figure 16: Schéma de synthèse de la transduction du signal NF chez *M. truncatula*

Source: D'après Singh and Parniske, 2012

du mévalonate. La diminution de l'activité de HMGR1 par des approches pharmaceutiques ou de RNAi, bloque la formation de nodules chez *M. truncatula* (Kevei et al., 2007). Ainsi, il a été formulé l'hypothèse que cette enzyme participerait à la formation d'un messenger secondaire pour la transduction du signal NF jusqu'au composant nucléaire (Kevei et al., 2007).

DMI1 est de la même façon que *DMI2* requis pour la mise en place des oscillations calciques et l'ensemble des processus symbiotiques en aval pour les deux symbioses AM et rhizobienne (Ane et al., 2004; Peiter et al., 2007) (**Figure 13**). *DMI1* code pour une protéine participant à la formation d'un canal potassique localisé dans l'enveloppe nucléaire et nécessaire à l'activation des oscillations calciques (**Figure 15A**) (Riely et al., 2007). Ainsi, *DMI1* serait activé par *DMI2* via un messenger secondaire encore mal défini. Selon le modèle proposé par Venkateshwaran et ses collaborateurs, cette activation entraînerait l'entrée de potassium dans l'espace périnucléaire, ce qui induirait une hyperpolarisation des membranes nucléaires et une activation des canaux calciques sortants (Venkateshwaran et al., 2012) (**Figure 15B**). Le calcium serait par conséquent relâché dans le cytoplasme et le nucléoplasme, ce qui produirait un pic de concentration calcique. Ensuite, le calcium serait réimporté dans l'espace périplasmique via un transporteur actif (**Figure 15B**) (Venkateshwaran et al., 2012). L'enchaînement de ces cycles provoquerait la formation d'oscillations calciques, un messenger secondaire indispensable à l'activation des gènes symbiotiques. Les oscillations calciques sont présentes à la fois dans la symbiose AM mais aussi dans la symbiose rhizobienne. Ainsi, il a été émis l'hypothèse que des signatures calciques différentes permettraient de discriminer les deux symbioses. Toutefois, une étude récente n'a relevé aucune différence dans les oscillations calciques engendrées par les rhizobia ou les champignons AM (Sieberer et al., 2012). En plus de *DMI1*, d'autres protéines localisées dans l'enveloppe nucléaire participent à la mise en place des oscillations calciques. Chez *M. truncatula*, *MCA8* code pour une ATPase essentielle à la formation des oscillations calciques et qui interviendrait dans le repompage des cations Ca^{2+} dans l'enveloppe nucléaire (Capoen et al., 2011) (**Figure 15B**). Chez *L. japonicus*, il existe une série nucléoporine qui est aussi requise pour la signalisation calcique. Les gènes *NUP133*, *NUP85* et *NENA* (Kanamori et al., 2006; Saito et al., 2007; Groth et al., 2010) sont tous des sous-unités de pore nucléaire impliquées dans le transport de molécules au

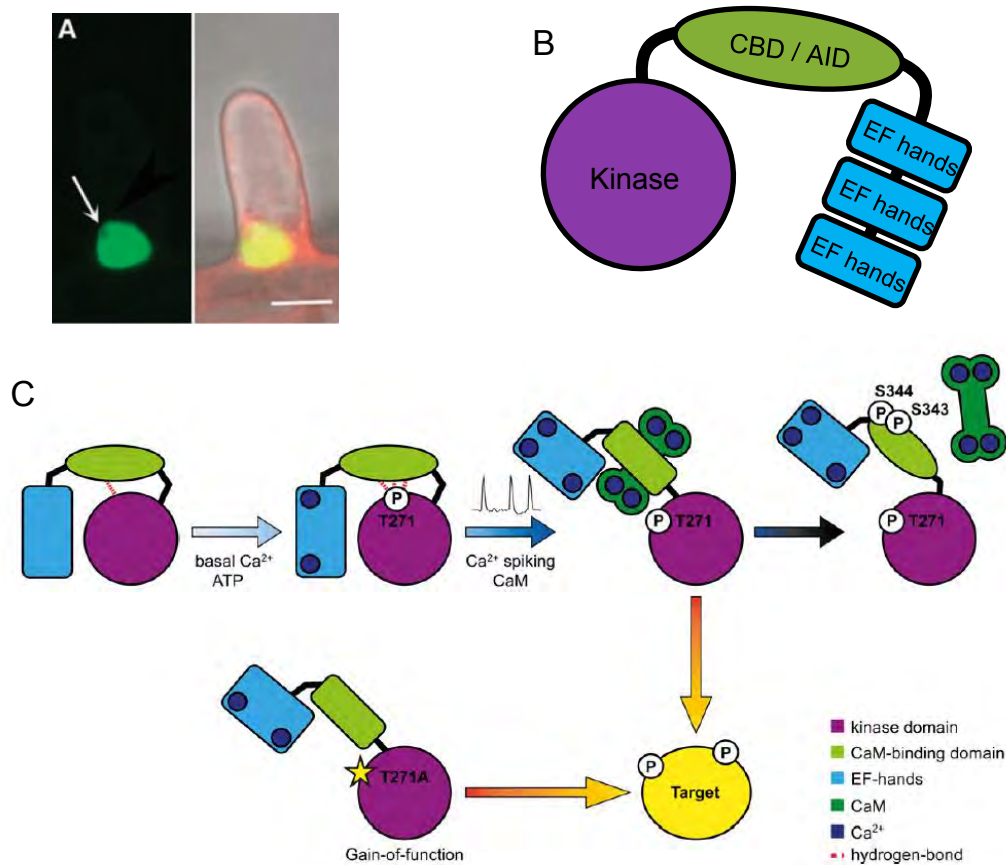


Figure 17: DMI3 est une protéine nucléaire capable de décoder les oscillations calciques.

(A) Localisation de la protéine DMI3 fusionnée à la GFP et exprimée sous le contrôle de son propre promoteur dans des poils racinaires d'un mutant *dmi3* de *M. truncatula*. Barre = 10µm (B) Représentation schématique des différents domaines de la protéine DMI3 (CDB = Calmoduline Binding Domain ; AID = Auto Inhibition Domain). (C) Modèle explicatif des changements de conformation de DMI3 en fonction de la concentration en calcium nucléaire et donc du décodage des oscillations calciques.

Sources: (A) Smit et al., 2005
(C) Miller et al., 2013

travers de l'enveloppe nucléaire. Même si le mécanisme par lequel ces protéines régulent les oscillations calciques n'est pas connu, il semblerait qu'elles jouent des rôles similaires.

Le mécanisme d'activation des oscillations calciques nucléaires comporte encore de nombreuses inconnues. Notamment, le messager secondaire permettant le lien entre les récepteurs kinases membranaires et les protéines nucléaires reste à identifier. Un schéma de synthèse qui replace l'ensemble des protéines et leur localisation subcellulaire est disponible en **figure 16**.

2.2. Décryptage des oscillations calciques et activation de la transcription

2.2.1. DMI3, une kinase capable de décoder les oscillations calciques

Les oscillations calciques sont l'une des premières réponses de la plante à la bactérie symbiotique et l'inhibition de ces oscillations affecte l'ensemble des étapes en aval. Cependant, pour que le calcium tienne ce rôle de messager secondaire, la plante a besoin d'une protéine capable de décoder les influx calciques. Chez *M. truncatula*, le gène *DMI3* code pour une protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline (CCaMK, Calcium and CalModuline dependant Kinase) requise pour les symbioses AM et rhizobienne (Levy et al., 2004). Il est intéressant de noter que contrairement à *dmi1* et *dmi2*, une mutation dans *DMI3* n'affecte pas les oscillations calciques nucléaires en réponse aux NF, ce qui suggère un rôle de cette protéine en aval de cette composante (Wais et al., 2000) (**Figure 13**). La protéine DMI3 est constituée à l'extrémité N-terminale d'un domaine sérine/thréonine kinase qui contiendrait un peptide signal d'adressage Au niveau du noyau (**Figure 17A**). Ce domaine est flanqué d'un domaine de liaison à la calmoduline se superposant à un domaine d'auto-inhibition. Enfin à l'extrémité C-terminale, se trouvent trois domaines EF-hands capables de lier le calcium (**Figure 17B**) (Singh and Parniske, 2012). *DMI3* est exprimé de façon constitutive dans les racines et les nodules de *M. truncatula*. La protéine produite est strictement nucléaire (Smit et al., 2005) (**Figure 17A**). Le rôle central détenu par DMI3 a été démontré par l'analyse de formes auto-actives de cette protéine (Gleason et al., 2006; Miller et al., 2013). En effet, la suppression de domaines de DMI3 tels que le domaine auto-inhibiteur (**Figure 17B**) ou la mutation ponctuelle d'acides aminés dans le domaine kinase entraîne la formation

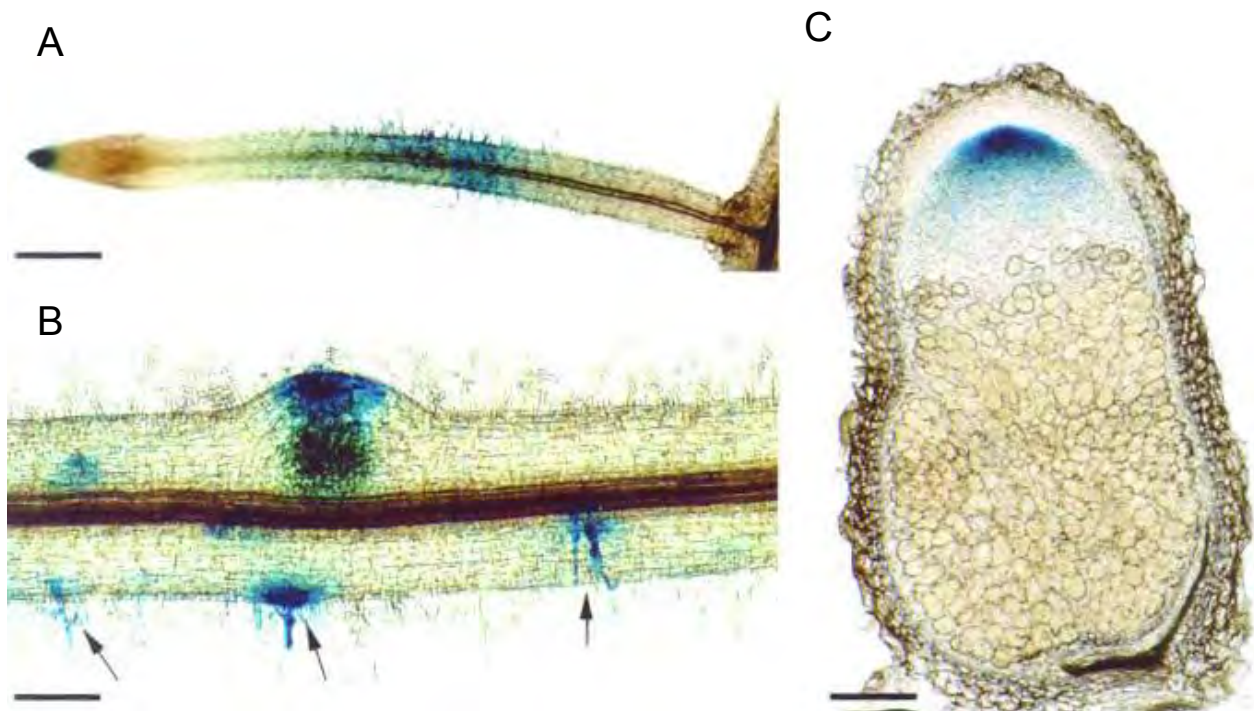


Figure 18: Localisation histochimique de l'activité GUS dans une lignée de *M. truncatula* exprimant le gène rapporteur *GUS* sous le contrôle du promoteur d'*ENOD11*.

(A) Racine secondaire, 18 heures après inoculation avec *S. meliloti*. En plus de l'expression épidermique en réponse aux NF, il existe une expression constitutive d'*ENOD11* au niveau de l'apex racinaire. Barre = 900 μ m. (B) Racine latérale 3 jours après inoculation, nous retrouvons l'expression d'*ENOD11* dans la couche externe du primordium nodulaire et au niveau des sites d'infections arrêtés (flèche). Barre = 250 μ m. (C) Coupe longitudinale d'un nodule fixateur de 3 semaines, l'activité GUS n'est détectée que dans la partie distale du nodule. Barre = 200 μ m.

Source: Journet et al., 2001.

spontanée de nodules en l'absence de rhizobium. De nombreuses études sur les CCaMK présentes chez les deux légumineuses modèles ont permis de mieux comprendre les mécanismes par lesquels DMI3 décode les oscillations calciques (Shimoda et al., 2012; Singh and Parniske, 2012; Miller et al., 2013). Le dernier modèle proposé par Miller et ses collaborateurs, est présenté **figure 17C** et s'appuie sur des études réalisées chez *M. truncatula*. Tout d'abord, en l'absence de calcium, DMI3 est sous forme repliée et inactive. Cette structure est notamment maintenue par des liaisons hydrogènes entre la thréonine 271 dans le domaine kinase et l'arginine 323 dans le domaine CBD / AID. La présence d'un niveau basal de calcium cellulaire (150 nM) est suffisante pour occuper au moins l'un des domaines EF hands, ce qui renforce la structure inactive en formant deux nouvelles liaisons hydrogènes, à partir de cette même thréonine. Lors des oscillations calciques, dans la phase où la concentration en calcium augmente, la calmoduline se lie au domaine CBD / AID entraînant une rupture des liaisons hydrogènes, qui maintenaient DMI3 dans un état inactif. Le domaine kinase va alors phosphoryler ses cibles et induire le processus symbiotique (**Figure 17C**) (Miller et al., 2013).

2.2.2. Les principaux facteurs de transcription en aval de DMI3

L'activation de DMI3 dans le noyau des cellules répondant aux signaux symbiotiques entraîne la transcription des gènes nécessaires à la mise en place de la symbiose. Pour activer la transcription de ces gènes, une série de régulateurs transcriptionnels est requise. Parmi ces facteurs de transcription, nous trouvons notamment IPD3 et NIN (Marsh et al., 2007; Horvath et al., 2011), deux membres de la famille des GRAS avec NSP1 et NSP2 (Wais et al., 2000; Hirsch et al., 2009) et enfin les ERF, (Ethylene Response Factor) ERN1 et ERN2 (Andriankaja et al., 2007; Middleton et al., 2007; Cerri et al., 2012). Dans la voie de signalisation NF, le rôle de chacun de ces facteurs de transcription et leur positionnement vis-à-vis des autres régulateurs transcriptionnels, ont été étudiés grâce à l'utilisation de gènes marqueurs. Il existe en effet une série de gènes exprimés en réponse aux signaux symbiotiques et ce, de façon plus ou moins spécifique. Ces gènes sont communément appelés nodulines. Chez *M. truncatula*, le gène *ENOD11* (Early NODuline 11), prédit pour coder une protéine pariétale riche en proline, est utilisé comme marqueur précoce de l'activation de la voie NF (Journet et al., 2001). Des lignées de *M. truncatula* (A17) transformées génétiquement expriment une fusion

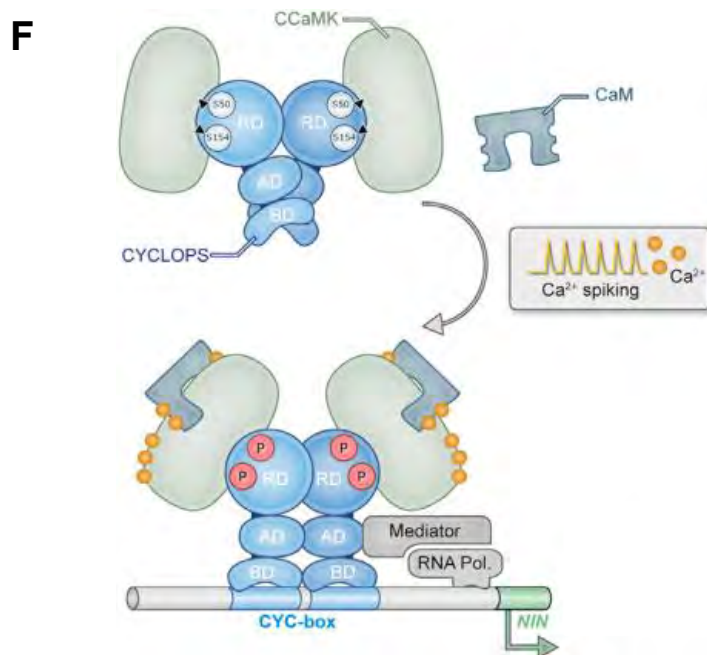
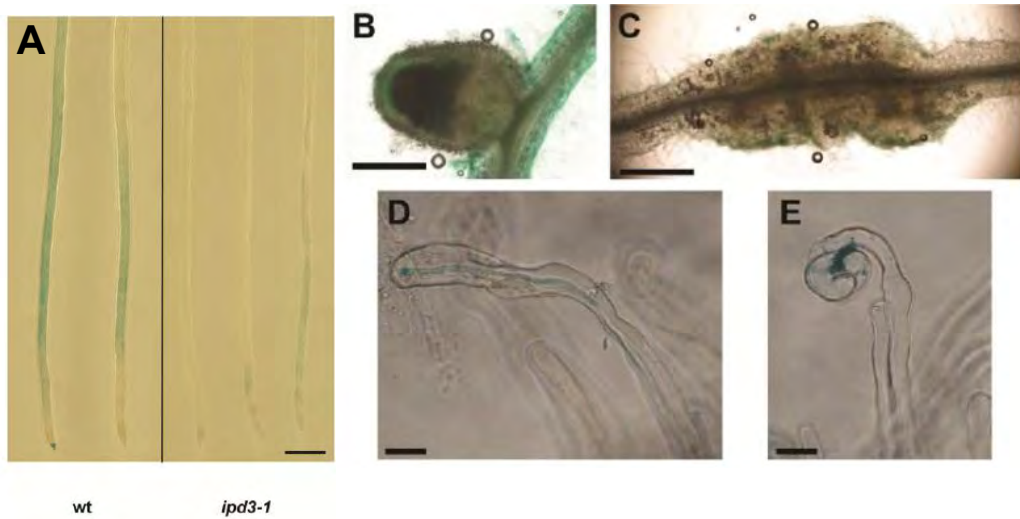


Figure 19 : IPD3 est activé par DMI3 et est requis pour la signalisation NF, l'infection rhizobienne et l'organogénèse nodulaire.

(A) L'induction de *ENOD11* est altérée dans *ipd3-1*, visualisation histochemique de l'activité GUS de la construction *pENDO11:GUS*. Développement nodulaire aberrant chez le mutant *ipd3-1* (C) en comparaison avec le sauvage (B). Cordon d'infection abortif chez le mutant *ipd3-1* (E) en comparaison avec le sauvage (D). A-E = *M. truncatula*. (F) Schéma du processus d'activation de CYCLOPS (IPD3) par CCaMK (DMI3) suite aux oscillations calciques et activation de la transcription du gène *NIN* chez *L. japonicus*.

Sources: (A-E) Horvath et al., 2011
(F) Singh et al., 2014

transcriptionnelle du promoteur d'*ENOD11* au gène rapporteur *GUS* (**Figure 18**) (Journet et al., 2001; Boisson-Dernier et al., 2005). Cet outil a été utilisé pour caractériser les facteurs de transcription précoces chez *M. truncatula*.

2.2.2.1. IPD3 et NIN

IPD3 a été identifié par un crible double hybride dans la levure comme une protéine interagissant avec DMI3 (Messinese et al., 2007). Cette interaction est dépendante du domaine "coiled-coil" d'IPD3 et a lieu dans le noyau de la cellule où sont localisées les deux protéines (Messinese et al., 2007). Chez le lotier, il a été montré que l'orthologue de IPD3 (appelé CYCLOPS) est phosphorylé par CCaMK (DMI3) *in vitro*, ce qui est essentiel dans l'établissement de la symbiose rhizobienne (Yano et al., 2008; Liao et al., 2012; Singh et al., 2014). Le mutant *ipd3-1* est fortement affecté dans l'induction d'*ENOD11* suite à un traitement NF (**Figure 19A**) (Horvath et al., 2011). De plus, sans être abolies, l'infection, la libération des bactéries ainsi que l'organogénèse nodulaire sont fortement altérées dans ce mutant (**Figure 19B-E**) (Horvath et al., 2011). IPD3 a récemment été caractérisé comme un facteur de transcription précoce capable de se fixer et d'activer le promoteur de *NIN* au cours de la symbiose rhizobienne (Singh et al., 2014). Les auteurs ont ainsi mis en évidence que la phosphorylation d'un homo-dimère de CYCLOPS (IPD3) par CCaMK (DMI3) entraîne un changement de conformation, qui autorise la liaison de la protéine aux éléments régulateurs trouvés dans le promoteur de *NIN* (**Figure 19F**) (Singh et al., 2014). De plus, la création de versions auto-actives de CYCLOPS (phosphomimics) engendre la formation de nodules spontanés et cela de manière indépendante de CCaMK, suggérant un rôle clef d'IPD3/CYCLOPS (Singh et al., 2014). Chez *M. truncatula*, aucune étude structure / fonction aussi poussée n'a été effectuée. Cependant, il a été montré que *NIN* n'était plus induit par des NF dans un mutant *ipd3* (Horvath et al., 2011). Cela suggère un rôle conservé d'IPD3 entre les légumineuses. Cependant, le phénotype du mutant *ipd3* de *M. truncatula* est moins marqué que le mutant *cyclops* du lotier, ce qui suggère une possible redondance fonctionnelle. L'ensemble de ces études tend à démontrer qu'IPD3 serait l'un des premiers régulateurs transcriptionnels activé par DMI3 suite à la perception des oscillations calciques.

NIN est un facteur transcription à domaine RWP-RK qui est fortement induit au cours de la symbiose rhizobienne. *NIN* est une cible directe de CYCLOPS (IPD3) chez *L. japonicus* mais aussi du dimère NSP1/NSP2 chez *M. truncatula* (Hirsch et al., 2009). Une

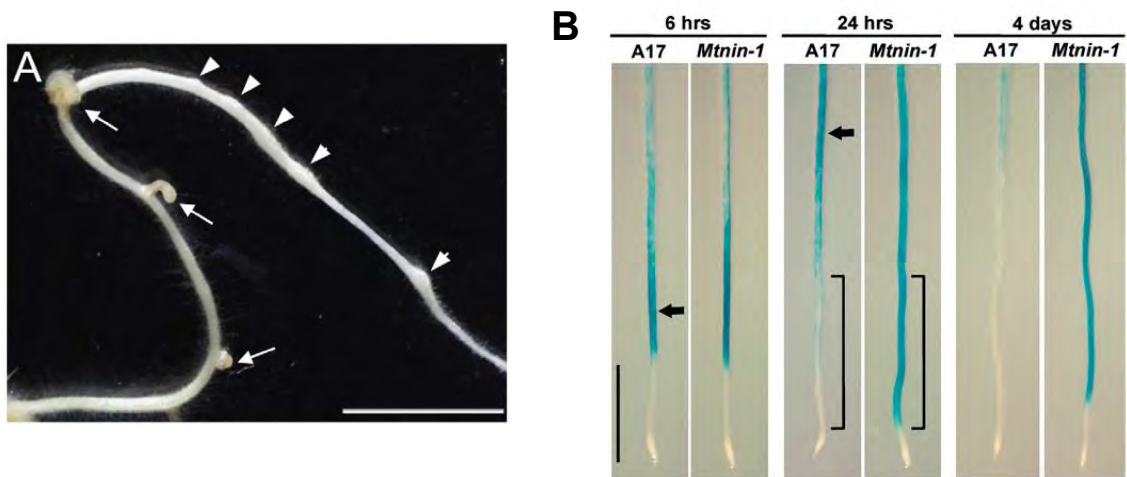


Figure 20 : NIN induit la formation de divisions corticales et régule négativement l'expression de *ENOD11*

(A) Une expression ectopique de *NIN* induit la division de cellules corticales (flèches) en l'absence de rhizobium chez *L. japonicus*. (B) Dans un mutant *nin-1* la localisation spatio-temporelle de l'expression de *ENOD11* (visualisation histochimique de *pENOD11:GUS*) est modifiée dans les temps tardifs (1 jours et 4 jours après traitement NF).

Sources: (A) Soyano et al., 2013
 (B) Marsh et al., 2007

mutation dans le gène *NIN* affecte à la fois l'infection rhizobienne et l'organogénèse nodulaire (Schauser et al., 1999; Marsh et al., 2007). De plus, une récente étude chez le lotier a montré qu'une expression ectopique de *NIN* induit la formation de racines secondaires anormales, apparentées aux nodules et ce, en l'absence de rhizobium (**Figure 20A**) (Soyano et al., 2013). Cependant, le rôle de *NIN* dans le processus symbiotique est encore mal connu et il semblerait qu'en fonction du temps et du tissu observé, *NIN* agisse soit en tant que répresseur, soit en activateur du processus symbiotique (Yoro et al., 2014). Au niveau transcriptionnel, *NIN* a été démontré comme une protéine régulatrice de plusieurs gènes symbiotiques. Chez *M. truncatula*, il a été mis en évidence que la localisation spatiale de *ENOD11* est altérée chez *nin-1*, avec une augmentation de la zone d'expression de ce gène, suggérant que *NIN* serait un régulateur négatif de l'expression d'*ENOD11* mais seulement à des temps tardifs (**Figure 20B**) (Marsh et al., 2007). Chez le lotier, des expérimentations de ChIP (Chromatine Imuno-Purification) et de gels retards ont identifié *NPL*, une pectate lyase requise pour l'infection rhizobienne, comme cible directe de *NIN* (Xie et al., 2012). Ainsi l'activation de ce gène par *NIN* est nécessaire à l'infection rhizobienne chez le lotier. Cependant Yoro et ses collaborateurs ont aussi récemment décrit *NIN* comme un répresseur de l'infection rhizobienne. Cet effet antagoniste aurait lieu à des temps plus tardifs, lorsque *NIN* est exprimé dans le cortex et promeut le développement nodulaire (Yoro et al., 2014).

Au cours de l'organogénèse nodulaire, le rôle de *NIN* est mieux défini, il est un composant essentiel de la mise en place de ce processus. Chez *M. truncatula*, il a été démontré que la formation de nodules spontanés par des formes auto-actives de DMI3, est dépendante de la présence de *NIN* (Marsh et al., 2007). Ceci est en accord avec la formation de divisions corticales anormales, suite à une surexpression de *NIN* chez le lotier (Soyano et al., 2013). Toujours chez le lotier, il a été montré que cette organogénèse se fait via l'activation des facteurs de transcription NF-Y (*LjNF-YA1* et *LjNF-YB1*) qui sont des cibles directes de *NIN* (Soyano et al., 2013).

2.2.2.2. Les facteurs de transcription NSP1 et NSP2

Les facteurs de transcription NSP1 et NSP2 (Nodulation Signaling Pathway) appartiennent à la famille des GRAS, nommée d'après les premiers membres identifiés: GIBBERELLIC-ACID INSENSITIVE (GAI) REPRESSOR of GAI (RGA) et SCARECROW (SCR) (Hirsch and Oldroyd, 2009). Ces deux protéines ont été découvertes

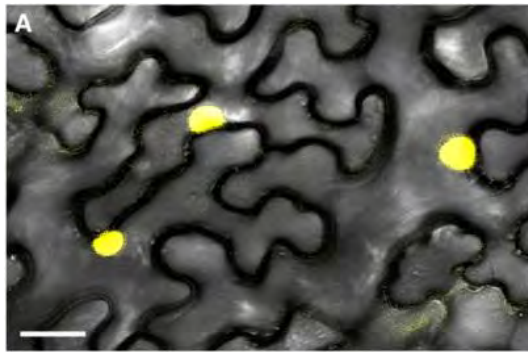


Figure 21: NSP1 et NSP2 dimérisent dans le noyau des cellules de *N. benthamiana*

Des feuilles de *N. benthamiana* ont été transformées avec les constructions BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) nYFP-NSP1 et cYFP-NSP2. La fluorescence observée dans le noyau des cellules correspond à une interaction entre NSP1 et NSP2. Barre = 40µm

Source: Hirsch et al., 2009

par génétique directe comme des régulateurs précoces de la signalisation NF (Kalo et al., 2005; Smit et al., 2005). Chez *M. truncatula*, les mutants *nsp1-1* et *nsp2-2* sont altérés dans l'expression génique en réponse aux NF, dans l'infection rhizobienne et dans l'organogénèse nodulaire (Catoira et al., 2000; Wais et al., 2000). En réponse aux NF, ces mutants ne sont pas affectés dans la production des oscillations calciques, ce qui est en accord avec un rôle en aval de cette transduction de signal. Cependant, ces mutants inhibent l'induction par les NF de nombreux gènes. Ainsi, ces protéines GRAS jouent un rôle primordial, probablement en aval de DMI3, dans l'induction des nodulines précoces (Kalo et al., 2005; Smit et al., 2005). Il a été démontré que ces deux protéines sont capables de former des homodimères et hétérodimères nucléaires dans la levure et *in planta* (**Figure 21**). Aussi, NSP1 est capable de se lier aux promoteurs de nodulines précoces telles que *NIN*, *ERN1* et *ENOD11* et cela probablement en dimère avec NSP2 (Hirsch et al., 2009). Plus récemment, un lien entre les NSP et la symbiose AM a été démontré, puisque les deux protéines sont requises pour la synthèse de strigolactones chez le riz et *M. truncatula* (Liu et al., 2011). De plus, alors que l'expression de *NSP2* est diminuée en réponse aux signaux mycorhiziens, via une régulation post transcriptionnelle avec miR171 (Lauressergues et al., 2012), l'expression de *NSP1* est induite et sa présence est nécessaire à l'induction des gènes de réponses au champignon (Delaux et al., 2013a). Cependant, bien que *NSP2* soit réprimé, il participerait aussi à la symbiose AM, via une interaction avec un autre facteur de transcription de type GRAS: RAM1 (Gobbato et al., 2012). Ainsi, même en aval de la voie de signalisation commune constituée des gènes *DMI1*, *DMI2* et *DMI3*, nous observons encore une conservation entre les symbioses AM et rhizobienne. Cette conservation partielle fait intervenir les facteurs de transcription dans d'autres complexes protéiques avec probablement des cibles différentes.

2.2.2.3. Les facteurs de transcription ERN

Les protéines ERN (ERF Required for Nodulation) appartiennent à la grande famille des AP2/ERF (APelata 2 / Ethylene Response Factor), impliqués dans de nombreux processus chez les végétaux (Dietz et al., 2010). Le gène *ERN1* a été identifié par deux approches différentes publiées la même année. Premièrement, le criblage de mutants affectés dans la nodulation a mené à la découverte de l'allèle *bit*, présentant une délétion dans la région génomique de *ERN1* (Middleton et al., 2007). Deuxièmement, un crible simple hybride dans la levure, avec le promoteur de *ENOD11* comme appât sur une

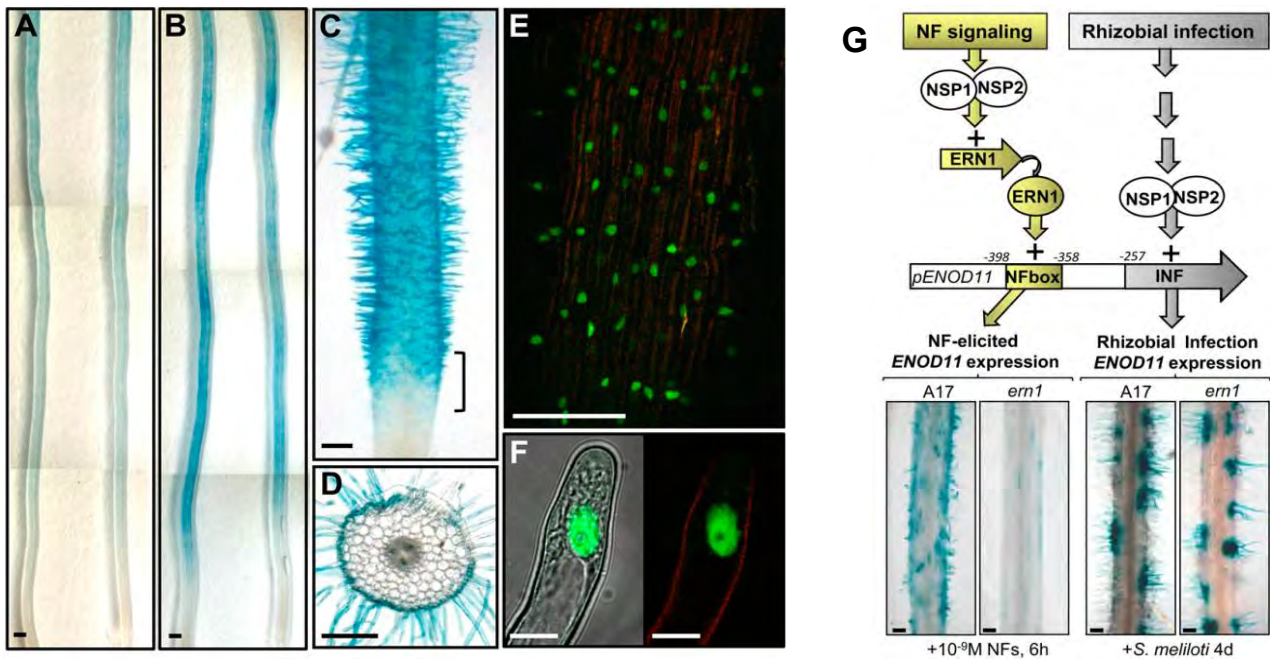


Figure 22: ERN1 est localisé dans le noyau des cellules épidermiques de *M. truncatula* et active *ENOD11* en réponse aux NF.

(A-D) Localisation histochimique de l'activité GUS d'une construction pERN1:GUS. Visualisation dans les racine de *M. truncatula* après 6 h de traitement à l'eau (A) ou à 10⁻⁹ M de NFs (B-D). L'expression est localisée dans les poils absorbants racinaires et l'épiderme (C-D). (E-F) Localisation nucléaire de YFP-ERN1 après inoculation avec *S. meliloti*. Barres = 500µm (A-B) 200µm (C-D) 100µm (E) 10µm (F). (G) Modèle du contrôle transcriptionnel de *ENOD11* lors de la signalisation NF ou de l'infection rhizobienne.

Source: Cerri et al., 2012

banque de cDNA issus de poils absorbants traités aux NF, a permis l'identification de trois ERF: ERN1, ERN2 et ERN3 (Andriankaja et al., 2007). *ERN1* est induit en réponse aux NF dans l'épiderme racinaire (**Figure 22A-D**) et la protéine produite est localisée dans le noyau des cellules végétales (**Figure 22E-F**). Les protéines ERN possèdent toutes une activité transcriptionnelle sur *ENOD11*: ERN1 et ERN2 en tant qu'activateurs de la transcription, ERN3 en tant que répresseur de cette activité (Andriankaja et al., 2007). *ERN1* et *ERN2* présentent des profils d'expression partiellement similaires, ce qui suggère une redondance potentielle entre ces deux gènes (Cerri et al., 2012). Cette redondance est appuyée par le fait qu'un mutant *ern1* peut être complété par *ERN2*, exprimé sous le contrôle du promoteur du gène *ERN1*. Ainsi les deux protéines ont une activité transcriptionnelle identique et leur rôle spécifique s'explique probablement par une expression spatio-temporelle différente (Cerri et al., 2012). Enfin, il a été montré que les facteurs de transcription NSP1 et NSP2 sont aussi capables de lier et d'activer le promoteur d'*ENOD11* dans une région très proche de celle des ERN (Hirsch et al., 2009). Le rôle relatif de chacun de ces facteurs de transcription a été étudié et il apparaît que lors de la signalisation NF, les NSPs activent la transcription de *ERN1*, qui aurait lui-même une activité transcriptionnelle sur *ENOD11*. Lors du processus d'infection, la transcription de *ENOD11* ne serait alors plus dépendante de ERN1 mais du dimère NSP qui se lie et active directement *ENOD11* (**Figure 22G**) (Cerri et al., 2012).

2.2.2.4. Synthèse des régulations transcriptionnelles en réponse aux NF

Les facteurs de transcription cités ci-dessus sont tous activés quelques heures après un traitement NF et ils sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle de nodulines précoces. Or, même si la signalisation NF est associée aux événements pré-symbiotiques et qu'elle est un prérequis à toutes les réponses symbiotiques de la plante, elle est aussi activée et nécessaire tout au long du processus symbiotique, pendant l'infection et le développement nodulaire. Ceci est appuyé par le fait que les oscillations calciques sont maintenues, notamment au cours du processus d'infection (Sieberer et al., 2009; Sieberer et al., 2012). De plus, les membres de la voie de signalisation NF sont toujours significativement exprimés dans les étapes les plus tardives de la nodulation (Roux et al., 2014).

En fonction de l'étape symbiotique et de l'organe où sont exprimés ces régulateurs transcriptionnels précoces, ils peuvent avoir des fonctions et des cibles différentes. Par

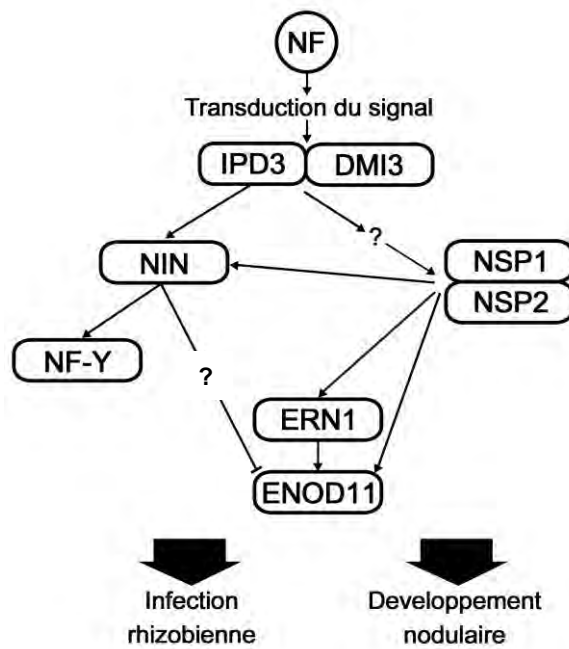


Figure 23: Rôle et connexions des régulateurs transcriptionnels dans la voie de signalisation NF.

IPD3, qui est décrit comme le facteur de transcription le plus en amont, est activé par le domaine kinase de DMI3 par phosphorylation (Singh et al., 2014). IPD3 induit la transcription de NIN qui est lui-même capable de se lier au promoteur de NF-YA1 et NF-YB1 chez le lotier (Soyano et al., 2013). De plus NIN a un effet répresseur sur la transcription d'*ENOD11* à des temps tardifs (Marsh et al., 2007). La transcription du dimère *NSP* est dépendante de DMI3 (Smit et al., 2005). Les *NSP* sont capables d'activer directement *NIN*, *ERN1* et *ENOD11* (Hirsh et al., 2009). Enfin les *ERN* ciblent directement *ENOD11* (Cerri et al., 2012).

exemple, le dimère NSP régule l'expression d'*ENOD11* via ERN1, au cours des étapes pré-symbiotiques mais de façon indépendante lors de l'infection (**Figure 23**) (Cerri et al., 2012). De la même manière, NIN est requis pour l'infection lorsqu'il est exprimé dans l'épiderme au début de ce processus mais il a un effet négatif sur cette dernière lorsqu'il est exprimé dans le cortex racinaire lors du développement nodulaire (Yoro et al., 2014). La **Figure 23** synthétise les connexions décrites entre les régulateurs transcriptionnels au cours des étapes précoces de la symbiose rhizobienne. Ce schéma résume des mécanismes distincts dans l'espace et dans le temps, avec encore de nombreux acteurs non identifiés. De plus, la découverte de voies parallèles et de redondances fonctionnelles entre les régulateurs complique encore ces analyses (Murray, 2011).

2.3. Régulation de l'infection et de l'organogénèse nodulaire

En plus des régulateurs précédemment cités, il existe de nombreux gènes impliqués dans la mise en place de l'infection rhizobienne et du développement nodulaire. Des approches génétiques et biochimiques ont permis d'identifier des composants essentiels de ces processus. La génétique directe associée à l'utilisation de formes auto-actives de DMI3 a permis de découpler les processus d'infection et d'organogénèse puis de mieux comprendre comment ils s'articulent (Madsen et al., 2010).

2.3.1. Les principaux gènes impliqués dans l'infection rhizobienne

Lors de l'infection rhizobienne, la signalisation NF est constamment activée avec une spécificité accrue vis-à-vis de la structure des NF. En effet, chez *M. truncatula*, alors que des NF modifiés au niveau du sucre réducteur sont capables d'induire les réponses les plus précoces comme la déformation des poils absorbants, il sont insuffisants pour la mise en place de l'infection rhizobienne (Ardourel et al., 1994). Ainsi le récepteur LYK3 dont la mutation n'affecte pas les événements de signalisation précoce conduisant à l'expression des premières nodulines, est proposé comme le récepteur qui serait associé à NFP lors de l'infection rhizobienne et il serait impliqué dans la reconnaissance précise des NF (Smit et al., 2007) (**Figure 24A**).

Deux protéines ont été décrites comme interagissant avec les RLK symbiotiques avec des effets antagonistes sur l'infection rhizobienne. Premièrement, un crible double hybride, en utilisant le domaine kinase de LYK3, a permis l'identification de PUB1 qui est

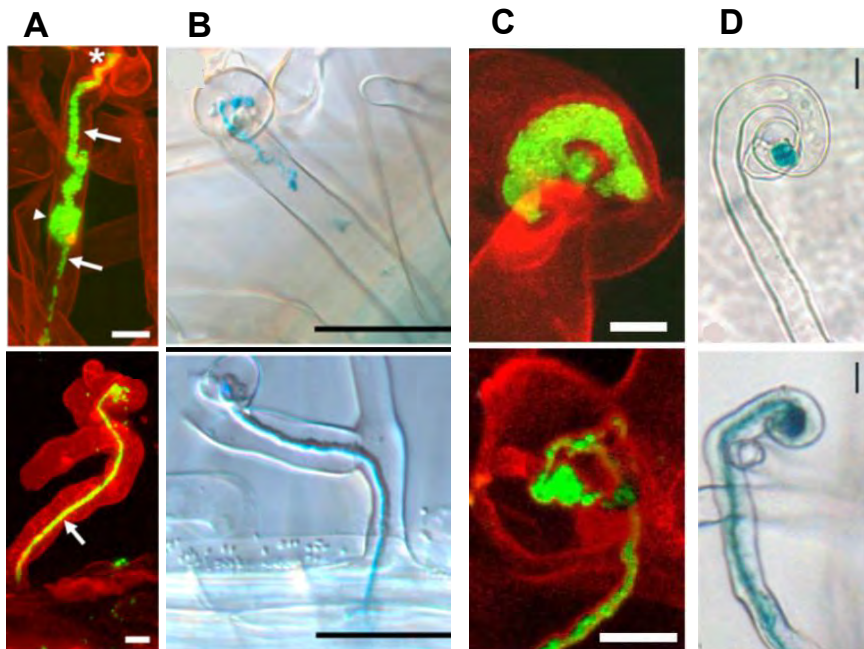


Figure 24 : Exemples de phénotypes de mutants altérés dans l'infection rhizobienne.

(A) Images confocales de bactéries exprimant la GFP (vert) dans le mutant *hcl-4* (*lyk3*) (photographie du haut) ou dans le sauvage (photographie du bas). Barres = 10µm. (B) Images en fond clair de bactéries avec la construction *pHema:LacZ* (colorées en bleue). Plante exprimant une construction *FLOT4* amiRNA (photographie du haut) ou plante contrôle (photographie du bas). Barres = 15µm. (C) Images confocales de bactéries exprimant la GFP (vert) dans le mutant *rpg* (photographie du haut) ou dans le sauvage (photographie du bas). Barres = 10µm. (D) Images en fond clair de bactéries avec la construction *pHema:LacZ* (colorées en bleue) dans le mutant *vpy* (photographie du haut) ou la plante contrôle A17 (photographie du bas). Barres = 10 µm

Sources: (A) Smit et al., 2007
 (B) Haney and Long, 2010
 (C) Arrighi et al., 2008
 (D) Murray et al., 2011

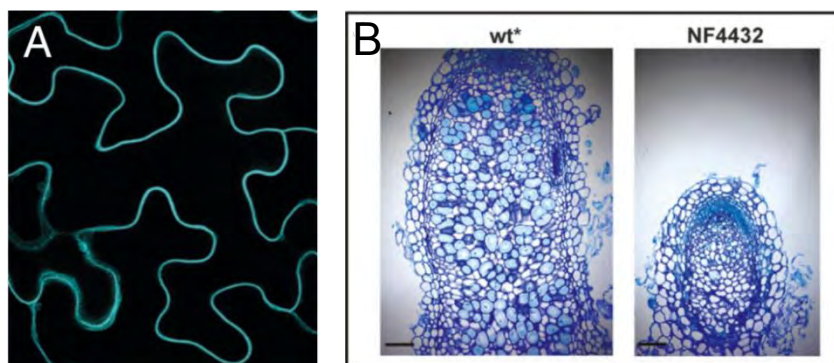


Figure 25: SYMREM1 est associé à la membrane plasmique et requis pour la symbiose fixatrice d'azote.

(A) Sur-expression de SYMREM1 fusionné à la CFP dans des cellules de *N. benthamiana*. Barre = 20µm. (B) Coupe longitudinale de nodules de 3 semaines du sauvage en comparaison au mutant *symrem1* (NF4432). Barre = 100µm.

Source : Lefèbvre et al., 2010

une E3 ubiquitine ligase qui régule négativement la symbiose rhizobienne (Mbengue et al., 2010). PUB1 est phosphorylée par le domaine kinase de LYK3 avec lequel elle interagit et son activité d'ubiquitine ligase lui permettrait d'intervenir dans le turn-over protéique des régulateurs positifs de la symbiose (Mbengue et al., 2010). Deuxièmement, SYMREM1 est une remorine, une protéine associée à la membrane plasmique et capable d'interagir avec l'ensemble des RLK associés à la symbiose (**Figure 16 et 25A**). *SYMREM1* a été identifié par une analyse transcriptomique comme un gène spécifiquement et fortement induit lors de la nodulation (Lefebvre et al., 2010) Une construction ARN interférence (RNAi) ou une insertion *tnt1* dans *SYMREM1* affecte fortement la progression de l'infection rhizobienne mais aussi l'étape d'organogénèse nodulaire (Lefebvre et al., 2010) (**Figure 25B**). Etant donné sa localisation et sa structure, SYMREM1 est probablement une protéine scaffold qui régule la localisation et la formation des complexes de récepteurs kinases symbiotiques. De manière similaire, deux protéines de la famille des flotillines, associées aux micro-domaines membranaires sont aussi requises pour l'infection rhizobienne (**Figure 24B**) (Haney and Long, 2010). *FLOT2* et *FLOT4* sont tous les deux induits précocement en réponse aux signaux bactériens et ceci de façon dépendante de NIN et NSP2 (Haney and Long, 2010).

Le gène *RPG* a été identifié par une recherche de mutants de *M. truncatula* affectés dans la nodulation (Arrighi et al., 2008). Le mutant *rpg* présente des cordons d'infection anormaux avec des gonflements et une progression difficile (**Figure 24C**). La protéine RPG ne possède pas de fonction prédite. Or ses quatre domaines coiled-coil et sa localisation nucléaire permettent de supposer que RPG s'associe à d'autres protéines nucléaires et qu'il intervient dans la régulation génique potentiellement en tant que co-activateur (Arrighi et al., 2008). Aussi identifié en génétique directe, le mutant *vpy* présente une insertion dans le gène *VAPYRIN*, qui est essentiel pour la formation des cordons d'infection chez *M. truncatula* (Murray et al., 2011) (**Figure 24D**). *VAPYRIN* code pour une protéine à domaines "ankyrin-repeat" et "major sperm", prédite comme associée aux vésicules de sécrétion et au trafic membranaire. Ce gène est induit par un traitement NF de façon dépendante des gènes *DMI* mais pas des facteurs de transcription en aval, bien nous observons une réduction dans *nsp1*, *nsp2* (Murray et al., 2011). Chez *L. japonicus*, il existe aussi de nombreux gènes présentant des phénotypes similaires à ceux décrits chez *M. truncatula*, c'est-à-dire des cordons d'infection déformés et abortifs. Par exemple, les

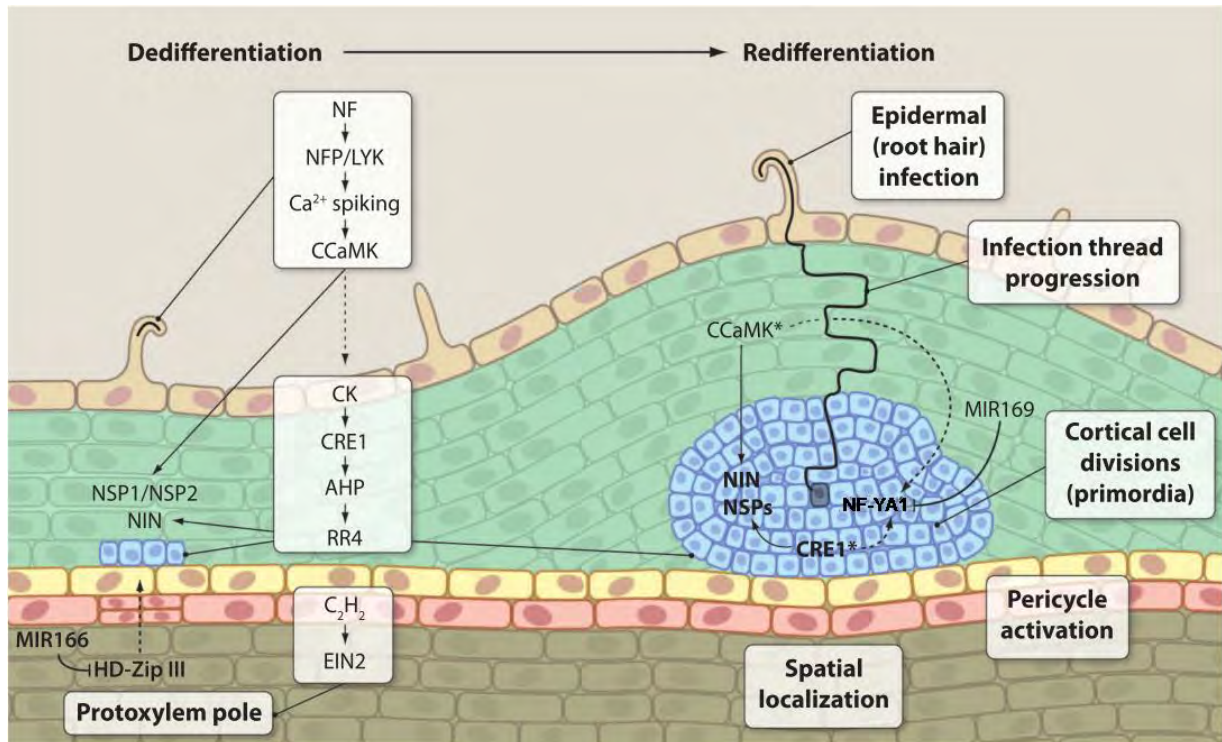


Figure 26: Voies de régulation associées à l'organogénèse nodulaire chez *M. truncatula*.

Les couches cellulaires de la racine sont représentées avec l'épiderme (marron), le cortex (vert), l'endoderme (jaune) le péricycle (rouge) et les faisceaux vasculaire (marron foncé). Les cellules qui forment le primordium nodulaire sont en bleus. La perception du NF via les complexes de récepteurs dans l'épiderme entraîne la formation du nodule. Les perception des cytokinines (CK) par le récepteur CRE1 induit une voie de signalisation impliquant des AHPs (aspartate-histidine phospho- transfer proteins) ce qui permet l'activation de régulateur de réponse de type A (comme RR4) et de NIN. Ces deux voies déterminent la dédifférenciation de cellules corticales spécifiques qui donnerons naissance au nodule. Les voies de signalisation en aval des cytokinines et des NF entraîne la formation de nodules spontanés qui ont été montrés par les allèles dominants de DMI3 et CRE1 (astérix). L'activation du réseau transcriptionnel participe à la redifférenciation des cellules corticales en cellules des différents tissus nodulaires via NIN, les NSP et NF-YA1. Les flèches indiquent les liens fonctionnels basés sur des données génétiques.

Source: Crespi and Frugier, 2008

gènes *NUP* et *NENA* codent pour des pores nucléaires potentiellement impliqués dans la transduction du signal NF et leur mutation affecte l'infection rhizobienne mais pas l'organogénèse nodulaire (Kanamori et al., 2006; Groth et al., 2010). D'autre part, le gène *NPL*, activé par NIN lors de l'infection, code pour une pectate lyase probablement impliquée dans le relâchement pariétal localisé lors de l'infection (Xie et al., 2012). Les gènes que nous venons de citer sont impliqués dans le processus d'infection et leur mutation affecte plus ou moins fortement la pénétration des bactéries. Alors que la mutation de gènes en amont (dans la voie de signalisation NF) induit des phénotypes drastiques sans aucune infection bactérienne, les phénotypes de ces gènes sont plus modérés et nous observons d'avantage une mauvaise progression des rhizobiums dans les tissus de l'hôte (**Figure 24A-C**). Ceci est le reflet d'un processus complexe contrôlé par plusieurs gènes avec de possibles redondances fonctionnelles.

2.3.2. Développement et différenciation nodulaire

L'infection et l'organogénèse nodulaire sont deux événements coordonnés dans l'espace et dans le temps. En effet, l'infection est initiée dans l'épiderme et l'organogénèse dans les tissus internes mais ils doivent être synchronisés pour que les cordons d'infection libèrent les bactéries au bon moment dans le futur nodule. Comme nous l'avons déjà évoqué, ces deux processus sont induits par un traitement NF et la plupart des mutants affectés dans l'un des processus le sont aussi dans l'autre (**Figure 26**).

De façon intéressante, il a été montré qu'un traitement exogène de cytokinines provoque la formation de nodosités en l'absence de rhizobium chez *L. japonicus* (Heckmann et al., 2011). De plus, des mutants de rhizobium incapables de produire des NF peuvent être partiellement complétés par l'introduction d'un gène de biosynthèse des cytokinines (Cooper and Long, 1994). Enfin chez *L. japonicus*, une mutation "gain de fonction" dans le récepteur des cytokinines (*LHK1*) induit aussi la formation de nodules spontanés (Tirichine et al., 2007). Ainsi, les cytokinines jouent un rôle prépondérant dans l'organogénèse nodulaire qui semble aussi être indépendant de l'infection rhizobienne. En effet, les mutants *hit* (*hyperinfected*), qui sont KO pour le gène *LHK1* de *L. japonicus*, sont très altérés dans la formation de nodules alors que l'infection ne semble pas être touchée dans l'épiderme (Murray et al., 2007). Chez *M. truncatula*, nous retrouvons le même type de phénotype par diminution de l'expression de *CRE1* (l'orthologue de *LHK1*) ou par

l'utilisation de mutants ponctuels dans ce gène (Gonzalez-Rizzo et al., 2006; Plet et al., 2011). L'organogénèse induite par les cytokinines est dépendante de l'activation des facteurs de transcription *NSP1*, *NSP2*, *NIN* et *ERN1* (**Figure 26**) (Heckmann et al., 2011; Plet et al., 2011). Plus récemment, il a été identifié deux cytokinines ribosides 5'-monophosphate phosphoribohydrolase appelées *LOG1* et *LOG2* chez *M. truncatula*. Leur transcription est dépendante de CRE1 et elles participent au développement du primordium nodulaire mais aussi à la formation des racines latérales (Mortier et al., 2014). Le récepteur des cytokinines présente donc la particularité d'être impliqué dans l'initiation du nodule sans en affecter l'infection, ce qui permet de découpler ces deux processus. Ainsi, il a été formulé l'hypothèse que les cytokinines seraient le messenger secondaire pour activer les cellules du cortex, suite à la perception des NF dans l'épiderme (**Figure 26**) (Crespi and Frugier, 2008).

Bien que l'initiation du développement nodulaire soit critique dans la symbiose rhizobienne, une étape de différenciation est nécessaire pour obtenir un nodule fonctionnel. Cette différenciation est initiée relativement tôt et elle entraîne la formation de cellules végétales et bactériennes spécialisées et dédiées à la fixation de l'azote (Crespi and Frugier, 2008). Dans les cinq zones majeures d'un nodule indéterminé mature (voir la partie 1.2.3.), nous observons une différenciation des cellules végétales dès la zone d'infection, d'où les bactéries sont libérées (Cebolla et al., 1999; Roux et al., 2014). Ce processus de différenciation est notamment caractérisé par une endoreduplication (ou endoploïdie) des cellules, ce qui correspond à une augmentation du contenu en ADN (Zielke et al., 2013). Chez *M. truncatula*, le gène *CCS52A* (Cell Cycle Switch 52) est principalement exprimé dans la zone d'infection et il est un régulateur important de l'endoreduplication nodulaire (Cebolla et al., 1999; Foucher and Kondorosi, 2000; Vinardell et al., 2003; Roux et al., 2014). Ce gène code pour un inhibiteur de la mitose et la diminution de son expression affecte la structure nodulaire induisant une sénescence précoce, une diminution du niveau d'endoreduplication et enfin une mauvaise différenciation rhizobienne (Cebolla et al., 1999; Vinardell et al., 2003).

A ce jour, seuls deux régulateurs transcriptionnels majeurs, impliqués dans le processus de différenciation nodulaire, ont été identifiés: EFD (ERF required for nodule Differentiation) et RSD (Regulator of Symbiosome Differentiation) (Vernié et al., 2008; Sinharoy et al., 2013). *EFD* est exprimé dans la zone d'infection et il code pour un facteur

de transcription de type ERF (Etylene Response Factor), qui régule négativement l'initiation de la nodulation mais positivement le processus de différenciation (Vernié et al., 2008; Roux et al., 2014). Dans un mutant *efd*, les nodules produits sont petits et non fixateurs, leur structure est aberrante et nous observons une zone d'infection élargie au détriment de la zone de fixation (Vernié et al., 2008). Par des approches de microscopie électronique, il a été montré que chez *efd*, le relargage et la différenciation des bactéries sont altérés. De plus, *efd* présente un défaut dans l'endoréduplication cellulaire végétale et bactérienne dans le passage du 16 au 32C (Fromentin, personnel communication). Enfin, il a été émis l'hypothèse que l'action d'EFD serait liée aux cytokinines car il a été décrit comme capable de réguler l'expression de *RR4*, un gène intervenant dans la régulation de la voie des cytokinines (Vernié et al., 2008). *RSD* a été identifié plus récemment par génétique reverse comme un facteur de transcription de type Cysteine-2/Histidine-2 (C2H2), exprimé spécifiquement dans la zone d'infection des nodules matures de *M. truncatula* (Sinharoy et al., 2013). Les mutants *rsd-1* et *rsd-2* forment des nodules incapables de fixer l'azote atmosphérique avec une structure fortement altérée (Sinharoy et al., 2013). RSD régule la formation des symbiosomes et la différenciation bactérienne, en agissant en tant que répresseur transcriptionnel notamment sur le gène *VAMP721a* (Ivanov et al., 2012; Sinharoy et al., 2013).

En plus de la différenciation des cellules végétales, les rhizobia internalisés subissent aussi des modifications majeures (Kondorosi et al., 2013). Cette différenciation rhizobienne est contrôlée par la plante hôte et notamment par une série de peptides sécrétés, appelés NCR (Mergaert et al., 2003; Alunni et al., 2007). Les NCR sont spécifiques des légumineuses à nodules indéterminés. *M. truncatula* possède environ 600 gènes codant pour des NCR, qui sont spécifiquement exprimés dans le nodule de la zone d'infection à la zone de fixation (Kondorosi et al., 2013; Roux et al., 2014). Les peptides NCR sont sécrétés dans les symbiosomes et ils agissent directement sur les rhizobia pour induire leur différenciation (Van de Velde et al., 2010). Le mutant de *M. truncatula dnf1* (Defective in Nitrogen Fixation) présente un défaut dans la différenciation des bactéroïdes alors que les NCR sont correctement exprimés (Van de Velde et al., 2010; Wang et al., 2010). Le gène *DNF1* code pour une sous-unité du SPC (Signal Peptidase Complex), qui serait impliquée dans la maturation des NCR, nécessaire à leur sécrétion (Van de Velde et al., 2010). Ainsi dans le mutant *dnf1*, les NCR ne sont plus sécrétés et ils s'accumulent

dans le réticulum endoplasmique de la cellule, conduisant à une absence de différenciation bactérienne (Wang et al., 2010). La maturation bactérienne induite par les NCR nécessite la protéine bactérienne BacA (Glazebrook et al., 1993; Ichige and Walker, 1997; Haag et al., 2011; Kondorosi et al., 2013). Des mutants bactériens *BacA* sont capables de se développer correctement dans les cordons d'infection mais ils meurent rapidement après le relargage dans les symbiosomes (Haag et al., 2011). De façon intéressante, dans un mutant *dnfl* qui ne sécrète plus de NCR, un rhizobium $\Delta bacA$ est capable de survivre mais pas de se différencier (Haag et al., 2011). Ainsi, BacA permet à la bactérie de se protéger contre l'activité antimicrobienne des NCR et de se différencier correctement en bactéroïdes (Haag et al., 2011; Kondorosi et al., 2013)

2.3.3. Autorégulation de la nodulation

La formation d'un organe capable de fixer l'azote est intéressant pour la plante mais c'est aussi un processus très coûteux en énergie que la plante doit réguler. Ainsi, les légumineuses contrôlent le nombre et la taille des nodosités afin d'avoir un apport optimal d'azote avec un coût énergétique minimal. Par exemple, il a été démontré que la présence de sols riches en azote inhibait la formation de nodules chez les légumineuses (Singleton and van Kessel, 1987; Jeudy et al., 2010). D'autre part, l'ajout d'azote sur des racines nodulées entraîne la sénescence des nodosités et il diminue l'efficacité de la symbiose, au profit de l'acquisition directe des nutriments dans le sol (Kereszt et al., 2011). Chez *M. truncatula*, la recherche de mutants affectés dans cette voie de régulation a permis d'identifier au moins deux processus indépendants de régulation (Penmetsa et al., 2003). Le premier processus implique l'éthylène, une hormone végétale qui régule négativement l'initiation des nodules comme le montre l'application d'une exogène sur le pois (Lee and Larue, 1992). De surcroît, des approches pharmacologiques inhibant la biosynthèse d'éthylène (AVG) ou l'utilisation de mutants incapables de percevoir l'éthylène (*sickle*), conduisent à un phénotype d'hyperinfection et d'hypernodulation (Penmetsa and Cook, 1997; Oldroyd et al., 2001). Ainsi l'éthylène est l'une des voies qui permet de réguler le nombre d'infections et donc de nodules. Néanmoins, son mode d'action reste encore peu compris (Oka-Kira and Kawaguchi, 2006). Cette voie de régulation agit en parallèle et de façon synergique avec le deuxième processus identifié, appelé AON (Autoregulation Of Nodulation (Penmetsa et al., 2003). L'AON est une régulation systémique de la nodulation,

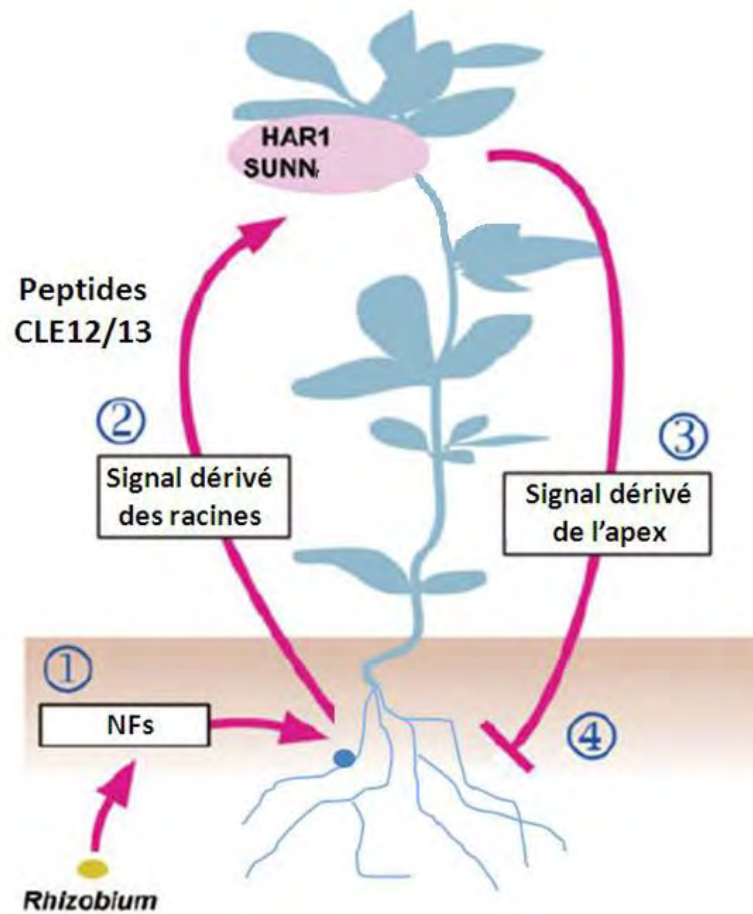


Figure 27 : Modèle du processus d'autorégulation (AON)

(1) Les NFs induisent le processus de nodulation mais aussi l'expression des peptides CLE. (2) Ces peptides sont sécrétés et probablement glycosylés avant d'être transportés vers les parties aériennes via le xylème où ils sont perçus par SUNN / HAR1. (3) Cette perception induit la production d'un signal dans les feuilles qui a une action longue distance et négative sur la formation de nodules dans les racines (4).

Source: D'après Oka-Kira and Kawaguchi, 2006

qui implique un signal foliaire et un signal racinaire (**Figure 27**) (Oka-Kira and Kawaguchi, 2006; Kouchi et al., 2010). Le gène *SUNN* code pour un récepteur de type LRR-RLK (Leucine Rich Repeat – Receptor Like Kinase) de la même famille que *CLAVATA1* chez *A. thaliana* (Schnabel et al., 2005). Chez le lotier, il a été récemment démontré que HAR1 (l'orthologue de *SUNN*) est capable de lier le peptide glycosylé CLE-RS2 (CLavata3/Embryo surrounding region), produit dans les racines et qui agirait en tant que signal longue distance, transporté via le xylème (Okamoto et al., 2013). Les peptides CLE sont une famille de protéines de 12 à 13 acides aminés sécrétées et impliquées dans plusieurs processus chez les plantes (Gao and Guo, 2012). Chez *M. truncatula*, les peptides CLE12 et CLE13 inhibent la nodulation de façon dépendante de *SUNN* (Mortier et al., 2010; Mortier et al., 2012). Aussi, *CLE13* est exprimé dans les racines en réponse au NF et de façon dépendante de la voie de l'auxine, ce qui en fait un bon candidat pour être le signal systémique produit dans les racines et envoyé aux parties aériennes où se trouve *SUNN* (**Figure 27**) (Mortier et al., 2010; Mortier et al., 2012)

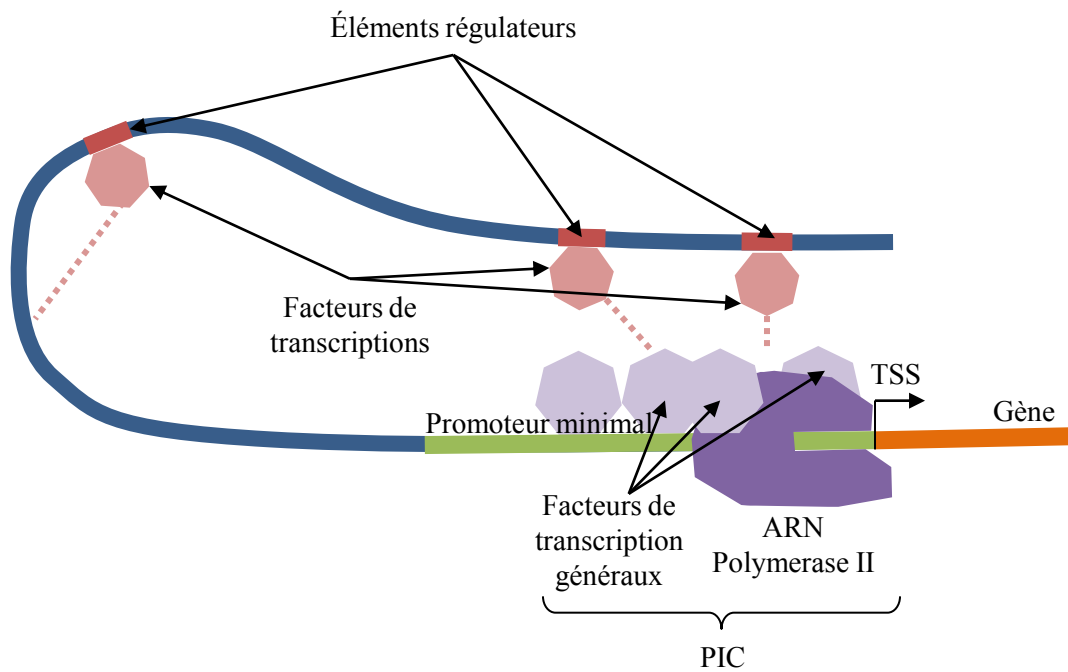


Figure 28: Schéma de l'organisation classique d'un promoteur eucaryote

La formation du PIC (Complexe de Pré-Initiation) au niveau du promoteur minimal est régulée par les facteurs de transcription qui se lient au niveau des séquences régulatrices du promoteur. Une fois le PIC assemblé, l'ARN polymérase II est activée et initie la transcription du gène.

3. Les facteurs de transcription NF-Y

Après avoir présenté le contexte biologique de cette étude, nous allons maintenant nous intéresser aux principaux acteurs de ce travail de thèse, qui sont les facteurs de transcription NF-Y.

3.1. Mode d'action des facteurs de transcription chez les eucaryotes

Afin d'aborder la biologie des facteurs de transcription NF-Y dans toute sa complexité, nous allons dans un premier temps présenter les mécanismes généraux de régulation de la transcription chez les eucaryotes. Au regard de la quantité et de la complexité des processus qui régulent la synthèse et la maturation des ARNm, nous nous intéresserons uniquement au mode d'action des protéines régulatrices appelées facteur de transcription.

3.1.1. Séquences régulatrices et initiation de la transcription

Alors que l'ensemble des cellules d'un même organisme contient à priori la même information génétique, elles diffèrent entre elles en termes de morphologie, de biologie et de fonction. Ces différences s'expliquent notamment par des changements dans l'expression des gènes entre les types cellulaires. La régulation de cette expression génique est primordiale et participe en grande partie à définir l'identité de la cellule. Dans les années 1950, il a été mis en évidence de grandes régions intergéniques non codantes dans les génomes étudiés. Certaines de ces régions sont appelées promoteur et contiennent des éléments nécessaires à la régulation des gènes adjacents (**Figure 28**) (Alberts et al., 1994). Dans les promoteurs, nous distinguons le promoteur minimal qui est constitué d'une centaine de paires de bases (pb) avant le site d'initiation de la transcription (TSS) et le promoteur distal avec des séquences régulatrices plus éloignées (Patikoglou and Burley, 1997). Ces séquences sont la cible de protéines qui interagissent spécifiquement avec l'ADN. L'élément de promoteur le mieux caractérisé est la boîte TATA, localisée à -25pb avant le TSS. La boîte TATA est liée par une série de facteurs de transcription dits généraux car ils sont essentiels pour l'initiation de la transcription de l'ensemble des ARN messagers (ARNm) de la cellule (Roeder, 1996). Ces facteurs de transcription généraux tels que les TFII-B, -D, -E, -F et -H recrutent l'ARN polymérase II, l'enzyme responsable de la synthèse des ARNm. Les facteurs de transcription généraux et l'ARN polymérase II,

associés au niveau du promoteur minimal, forment un complexe de protéines /ADN, appelé complexe de pré-initiation (PIC, Pre-Initiation Complex) (Patikoglou and Burley, 1997). En plus du PIC, d'autres facteurs de transcription régulent de façon précise la quantité d'ARN messagers produite par l'ARN polymérase II. Ces protéines régulatrices reconnaissent des séquences d'ADN spécifiques dans le promoteur distal et elles influencent la transcription en stimulant ou en inhibant la formation du PIC, en activant l'une des étapes qui suit l'assemblage du PIC (l'initiation, l'élongation...) ou encore en modifiant la condensation de la chromatine (**Figure 28**) (Green, 2005). En jouant sur les mêmes mécanismes, les protéines régulatrices peuvent avoir un effet positif ou négatif sur la transcription (Gaston and Jayaraman, 2003). Dans tous les cas, l'activité des facteurs de transcription implique des interactions protéine / protéine pour le recrutement de médiateurs ou pour l'interaction directe avec les composants du PIC. Ces interactions protéine / protéine nécessitent la formation de boucles et de repliements de l'ADN pour que les éléments de régulation distants aient un effet sur le TSS (**Figure 28**) (Kulaeva et al., 2012).

3.1.2. Les principaux domaines protéiques des facteurs de transcription

La recherche sur les protéines régulatrices de la transcription a débuté dans les années 1950 avec la génétique bactérienne. Certains de ces régulateurs ont été isolés et purifiés ce qui a permis de mettre en évidence leur capacité à lier spécifiquement les séquences d'ADN régulatrices de l'expression génique. La liaison à l'ADN implique qu'une partie de la surface de la protéine soit complémentaire de motifs spécifiques présents à la surface de l'ADN. La fixation de la protéine se fait par plusieurs contacts de différentes natures (liaisons hydrogènes ou ioniques, interactions hydrophobes...). Il est courant d'obtenir une vingtaine de contacts ou plus lors d'une interaction protéine / ADN, ce qui en fait l'une des interactions les plus spécifiques et robustes décrites en biologie (Alberts et al., 1994). Grâce aux techniques, telles que la cristallographie associée à la diffraction de rayon-x ou à la résonance magnétique nucléaire, la caractérisation des domaines de liaison à l'ADN de certaines protéines a été effectuée. En effet, au sens strict, un facteur de transcription est une protéine capable de lier l'ADN et d'influencer la transcription. Ainsi, le domaine de liaison à l'ADN (DBD, DNA Binding Domain) est le cœur du facteur de transcription et dans les bases de données, nous retrouvons plus de 130

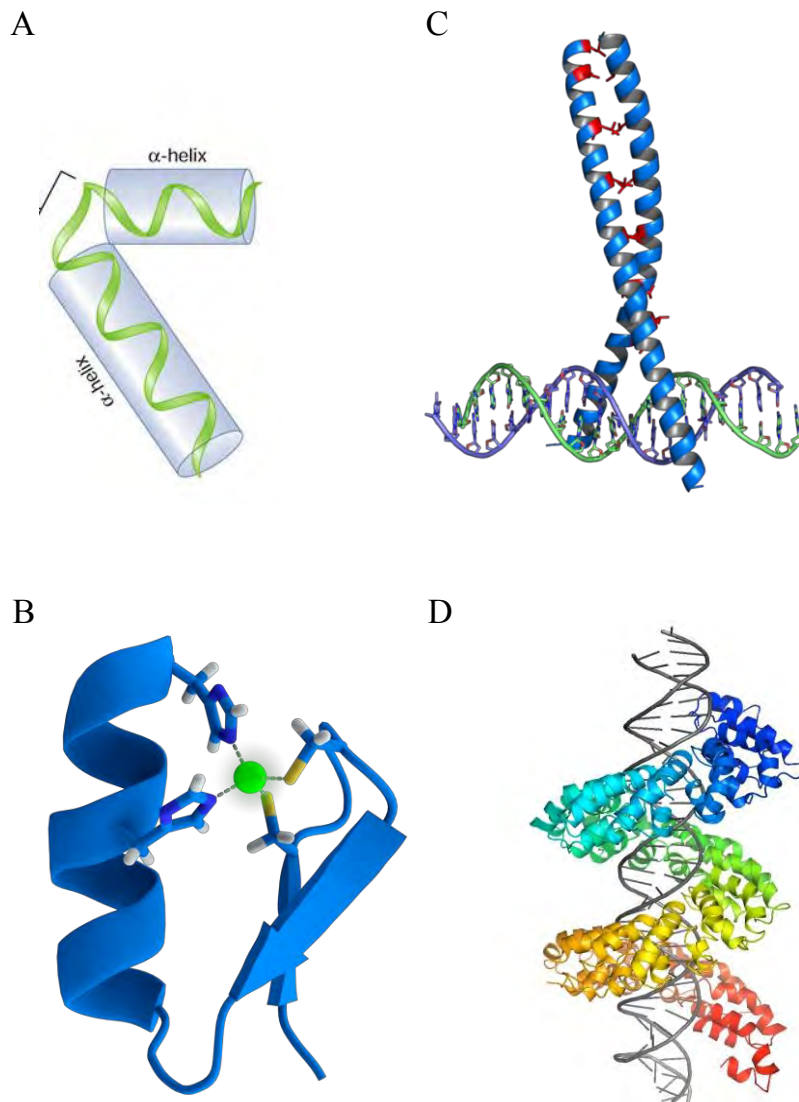


Figure 29: Représentation 3D de quatre motif de liaison à l'ADN

(A) Motif helix-turn-helix, constitué de deux hélices alpha reliées entre elles par une boucle d'acides aminés. (B) Motif à doigts de zinc, les feuillets beta et hélice alpha sont reliés entre eux par un atome de zinc (vert). (C) Motif Leucine zipper, deux hélices alpha sont enroulées et maintenues par des leucines (rouge). (D) Structure type d'un TAL, constituée de répétition de 34 résidus très conservés excepté deux acides aminés qui reconnaissent la base azoté.

Sources: (A) <http://wps.prenhall.com>
 (B-C) <http://commons.wikimedia.org/wiki/User:Splette>
 (D) <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Genome.html>

DBDs différents (Charoensawan et al., 2010). Néanmoins ces domaines peuvent être regroupés en grandes familles en fonction du type de structure formé. Ainsi, le motif helix-turn-helix (HTH) est l'un des plus communs, il consiste en deux hélices alpha reliées entre elles par une chaîne d'acides aminés (**Figure 29A**) (Aravind et al., 2005). L'hélice disposée à l'extrémité carboxyle (C-ter) est appelée hélice de reconnaissance car elle s'insère dans le sillon majeur pour reconnaître la séquence cible (Alberts et al., 1994). Un autre motif bien caractérisé est le doigt de zinc (Zinc-finger) qui est composé d'hélices alpha et de feuillets beta, associés par un ou plusieurs atomes de zinc (**Figure 29B**) (Berg, 1990). Enfin, le motif leucine zipper, incluant les domaines helix-loop-helix (HLH), présente la particularité d'intervenir à la fois dans la liaison à l'ADN et dans la dimérisation de protéines (**Figure 29C**) (Alber, 1992). Ces trois motifs représentent parfaitement la diversité des structures sur lesquelles sont basés les DBDs, des facteurs de transcription. Plus récemment, une avancée cruciale dans l'étude des interactions protéines / ADN a été réalisée avec la découverte des TAL (Transcription Activator-Like) (**Figure 29D**) (Bogdanove and Voytas, 2011). En effet, avant cette découverte il était encore compliqué voire impossible de déterminer quelle serait la séquence cible d'un DBD en connaissant uniquement sa structure protéique. Avec la compréhension de leur structure atypique constituée de répétitions d'acides aminés, les études sur les TALs ont brisé cette barrière, ouvrant la voie à de nombreuses applications biotechnologiques (Schornack et al., 2013).

La capacité à interagir avec l'ADN n'est pas la seule caractéristique des facteurs de transcription puisqu'ils ont aussi la capacité d'influencer la transcription. Cette action se fait par un autre domaine protéique, qui dans le cas des activateurs transcriptionnels, est appelé domaine activateur (AD). Initialement décrit comme un domaine acide et chargé négativement (Ptashne, 1988), l'AD est en réalité plus complexe et est principalement caractérisé par son processus d'activation. En effet, l'activation de la transcription passe essentiellement par le recrutement et la stabilisation directe ou indirecte des membres du PIC (Green, 2005). Dans ce processus, l'intervention de complexes multi-protéiques intermédiaires, tels que SAGA ou Mediator, est courante et de nombreux facteurs de transcription ont la capacité d'interagir avec ces complexes (Green, 2005; Herbig et al., 2010). Les facteurs de transcription recrutent aussi via leur AD des protéines intervenant dans le remodelage de la chromatine (Kim et al., 2012a; Kim et al., 2012b). Ces protéines,

telles que les histones acétyl-transférase, vont décondenser la structure de l'ADN afin de faciliter l'accès du PIC et des autres facteurs de transcription aux sites de liaison. Dans le cas des inhibiteurs de la transcription, les processus impliqués sont identiques même si chez le facteur de transcription, le domaine responsable de cette activité n'est pas aussi bien défini que l'AD (Gaston and Jayaraman, 2003). Similairement au SAGA et au Mediator qui participent à l'activation de la transcription, il existe aussi des complexes multi-protéiques de corépresseurs recrutés par les facteurs de transcription répresseurs (Simon and Kingston, 2009). Ces complexes possèdent souvent une ou plusieurs enzymes modificatrices d'histone, telle(s) que les histones déacétylases ou méthylases, conduisant à la condensation de la chromatine (Simon and Kingston, 2009). En outre, la répression de la transcription se fait souvent par une inhibition des coactivateurs tels que SAGA ou Mediator via une compétition sur les sites de liaison (Gaston and Jayaraman, 2003; Wong and Struhl, 2011). De plus, il faut garder à l'esprit qu'un même facteur de transcription peut cumuler un effet de répression ou d'activation de la transcription en fonction du contexte nucléotidique du promoteur, de ses interactions avec les autres régulateurs et des conditions physiologiques (Gaston and Jayaraman, 2003; Wong and Struhl, 2011). Enfin, la plupart des mécanismes évoqués dans cette partie ont été étudiés sur la levure ou sur des systèmes animaux, peu d'étude fondamentale sur la transcription sont réalisées chez les plantes qui sont le cadre biologique de notre étude.

3.2. La biologie des facteurs de transcription NF-Y

Les facteurs de transcription NF-Y ont été identifiés, tout d'abord dans la levure, comme des régulateurs du métabolisme respiratoire (Pfeifer et al., 1987; McNabb and Pinto, 2005). Depuis, les NF-Y ont été caractérisés chez l'ensemble des eucaryotes et ont été démontrés comme capables de se fixer à l'élément de promoteur bien connu: la boîte CCAAT aussi appelée Y-box (Dolfini et al., 2012).

3.2.1. Les protéines liant la boîte CCAAT

La transcription des gènes de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité est régulée par une série d'éléments de promoteurs conservés, appelés Z box, X box, Y box et octamer (Didier et al., 1988). La Y box, qui est essentielle à la transcription de ces gènes, contient une boîte CCAAT inversée, c'est la première description de ce type d'élément

régulateur (Dolfini and Mantovani, 2013). La boîte CCAAT est l'un des éléments les plus communs des promoteurs eucaryotes (Mantovani, 1999; Dolfini and Mantovani, 2013). Initialement décrite comme un élément du promoteur minimal (au même titre que la boîte TATA, le signal cap ou la boîte GC), la boîte CCAAT se situerait chez les animaux, entre -60 et -100 pb du TSS de la plupart des gènes (Bucher, 1990; Mantovani, 1999). Cependant, la proximité des boîtes CCAAT et TATA semble être davantage une exception que la règle. Qui plus est, une étude chez l'homme a démontré que la plupart des boîtes CCAAT se trouvaient dans les 600pb avant le TSS avec un pic à -80pb, alors que la boîte TATA est dans la zone -25 à -30pb (Dolfini et al., 2009). De plus, il a récemment été démontré que des éléments CCAAT éloignés (jusqu'à -5,3 kpb du codon ATG) peuvent jouer un rôle dans la régulation de la transcription de certains gènes chez *Arabidopsis* (Cao et al., 2014). La proximité de la boîte CCAAT avec d'autres éléments régulateurs a aussi été mise en évidence dans de nombreuses études qui font état de la probable synergie entre les protéines liant la boîte CCAAT et d'autres régulateurs transcriptionnels (Dolfini et al., 2009; Liu and Howell, 2010) Depuis les années 1980, la recherche de facteurs de transcription capables de lier la Y-box a permis l'identification d'une série de protéines.

Les C/EBP (CCAAT/Enhancer-Binding Protein) sont une famille de facteurs de transcription associés au basic leucine zipper et composés de 6 membres (Tsukada et al., 2011). Ces protéines ont été identifiées par leur capacité à lier les boîtes CCAAT mais des études, associant des oligonucléotides aléatoires et des gels retards, ont par la suite démontré que les C/EBP ont une autre spécificité au-delà de la boîte CCAAT (Osada et al., 1996; Dolfini and Mantovani, 2013). En effet, le consensus déterminé par Osada et ses collaborateurs est: RTTGCGYAAY (R= A ou G, et Y= C ou T) avec quelques variations en fonction du type de sous-unités (Osada et al., 1996).

De la même façon, les CTF/NF1 (CCAAT Transcription Factor / Nuclear Factor 1) initialement décrits comme liant la boîte CCAAT, présentent également une affinité pour d'autres éléments régulateurs (Zorbas et al., 1992). Ces facteurs de transcription, bien que liant effectivement le promoteur de α -Globin humaine, présentent une affinité pour un élément proche de la boîte CCAAT présentant le consensus: GGG(N)₆GCCA (Zorbas et al., 1992).

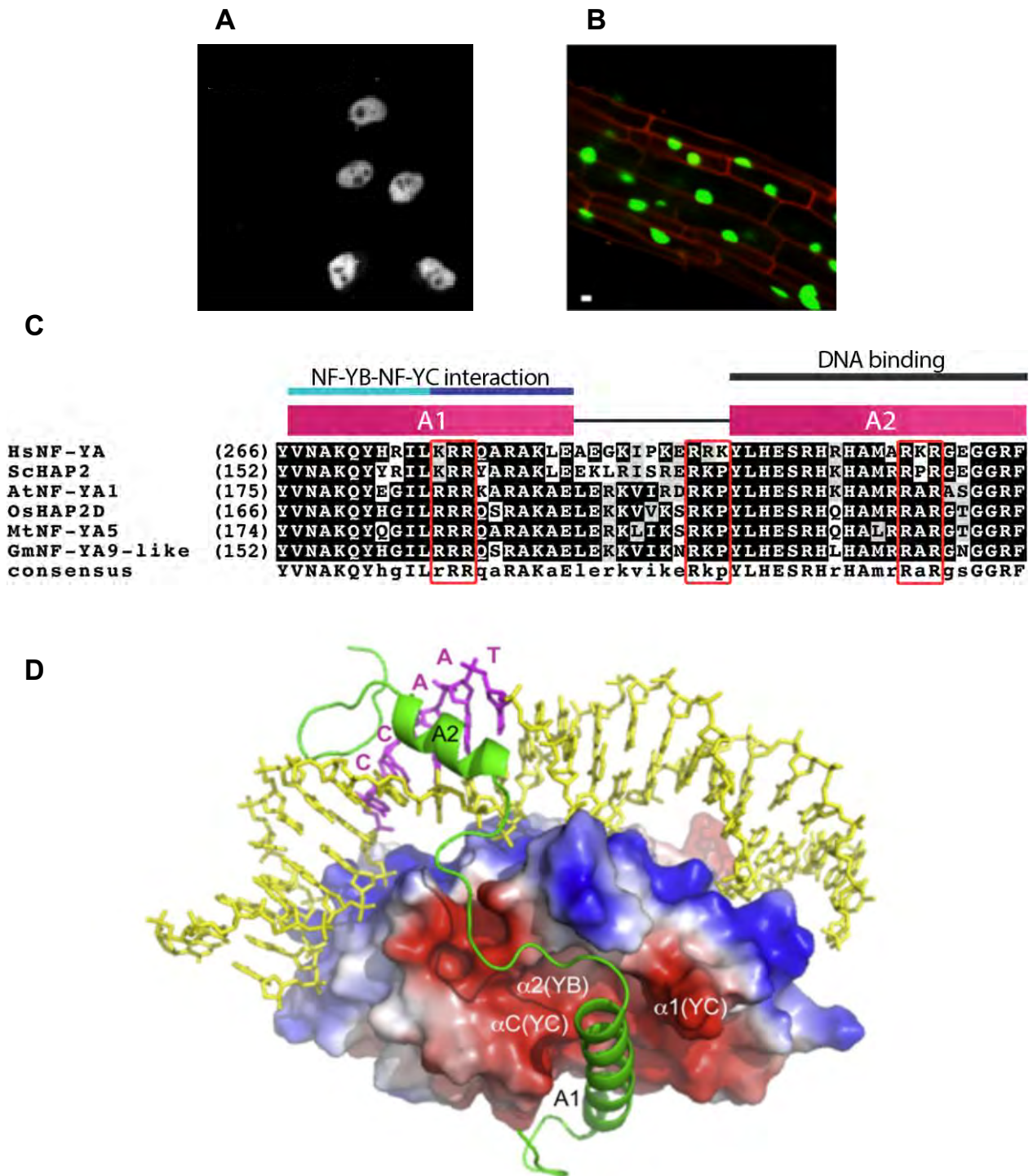


Figure 30 : Localisation et structure de NF-YA

(A) Localisation nucléaire de HsNF-YA fusionnée à la β galactosidase dans des cellules HeLa. (B) Localisation nucléaire de AtNF-YA4 fusionnée à la YFP dans une racine d'*A. thaliana*. (C) Alignement protéique des domaines conservés de sous-unités NF-YA. Les NLS sont encadrés en rouge. (D) Structure 3D du complexe NF-Y en interaction avec l'ADN (en jaune). NF-YA (en vert) se lie au dimère B-C (rouge/blanc/bleu) avec le domaine A1 tandis que le domaine A2 plonge dans le sillon mineur pour lier la boîte CCAAT.

Sources (A) Kahle et al., 2005
 (B) Liu and Howell, 2010
 (C) Laloum et al., 2013
 (D) Nardini et al., 2013

La protéine YB-1 (Y Box-binding Protein), identifiée par plusieurs approches, a été nommée ainsi en fonction de sa capacité à lier la Y box et donc la séquence CCAAT (Didier et al., 1988; Eliseeva et al., 2011). La protéine YB-1 présente des rôles pléiotropiques dans le noyau de la cellule mais aussi dans le cytoplasme et l'apoplasme (Eliseeva et al., 2011). YB-1 est capable de se lier à l'ADN mais aussi aux ARNm et elle est impliquée dans la quasi-totalité des processus liés à ces acides nucléiques (Eliseeva et al., 2011). Enfin, les Nuclear Factor- Y (NF-Y), aussi appelés CBF (CCAAT Box-binding Factor) ou HAP (Heme Activator Protein, chez la levure), sont des facteurs de transcription hétérotrimériques capables de lier avec une haute affinité la boîte CCAAT (Dolfini and Mantovani, 2013). Ce complexe transcriptionnel est composé de trois protéines indépendantes et conservées chez l'ensemble des eucaryotes. Une récente analyse sur les protéines, liant la boîte CCAAT dans le cadre des cancers chez les mammifères, a établi que les NF-Y sont les protéines les plus affines et spécifiques de cet élément régulateur (Dolfini and Mantovani, 2013).

3.2.2. *Structure et formation des complexes NF-Y*

Les complexes NF-Y sont composés de trois sous-unités (quatre chez la levure) et sont retrouvés chez tous les eucaryotes. Les sous-unités de ce complexe présentent des localisations subcellulaires différentes et l'assemblage final du trimère NF-Y dans le noyau suit une démarche précise qui a bien été caractérisée (Mantovani, 1999; Dolfini et al., 2012).

3.2.2.1. La sous-unité NF-YA

La sous-unité NF-YA (HAP2 chez la levure) a été démontrée comme localisée dans le noyau, à la fois chez les animaux (**Figure 30A**) (Frontini et al., 2004; Kahle et al., 2005), dans la levure (Pinkham et al., 1987) et chez les plantes (**Figure 30B**) (Liu and Howell, 2010). Chez les animaux, cette localisation nucléaire est due à l'interaction de NF-YA avec l'importine β (Kahle et al., 2005). Cette interaction est dépendante de résidus basiques formant des NLS (Nuclear Localisation Signal), localisés dans les domaines conservés de liaison à l'ADN et d'interaction avec les sous-unités NF-YB et NF-YC (**Figure 30C**) (Kahle et al., 2005; Laloum et al., 2013). Etant donné la forte conservation de ces domaines entre les animaux et les plantes, nous pouvons émettre l'hypothèse que les sous-unités NF-YA de plantes sont localisées dans le noyau par des mécanismes similaires.

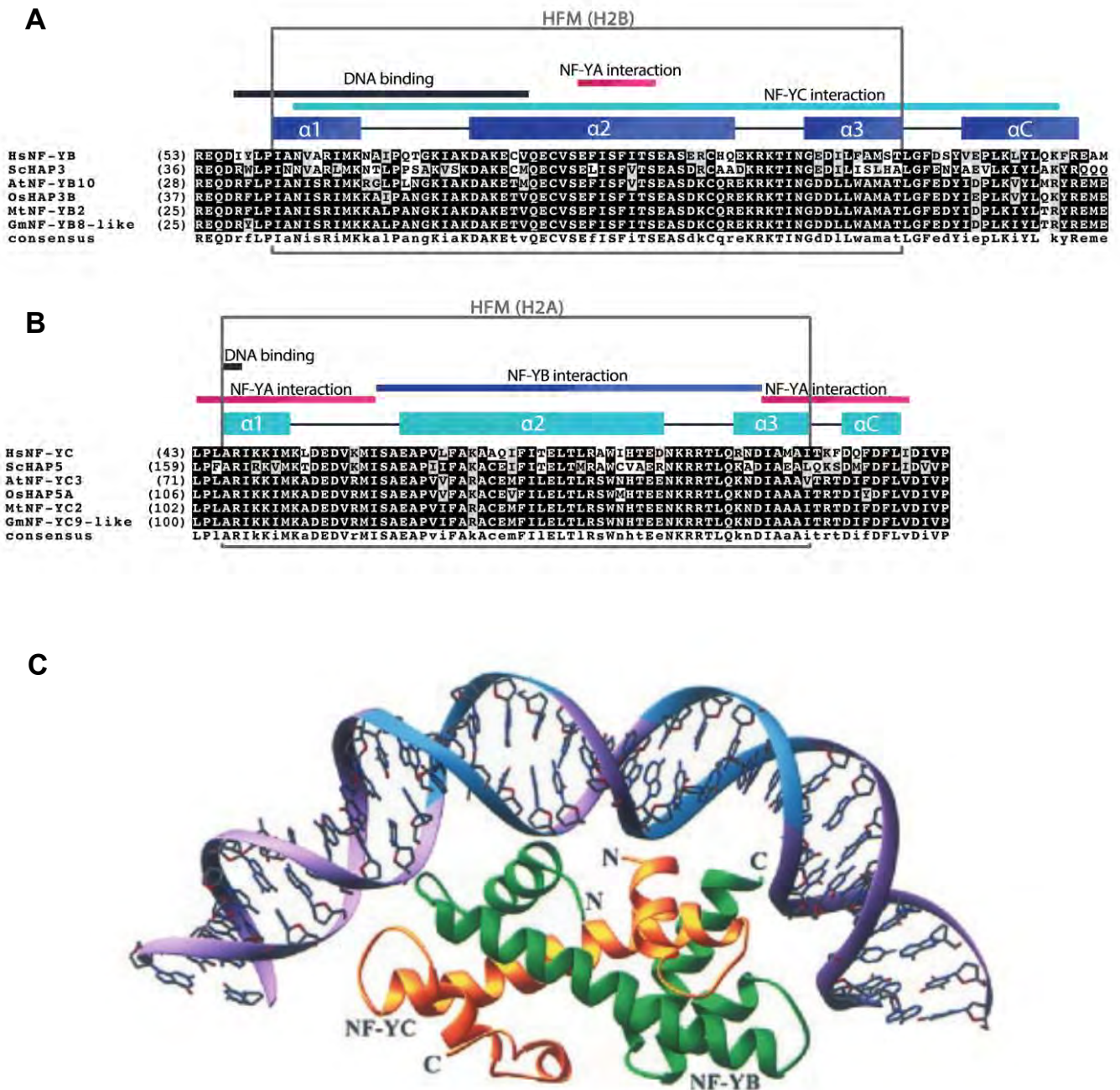


Figure 31: Structure des sous-unités B et C du complexe NF-Y

(A) Alignement protéique des domaines conservés de sous-unités NF-YB. Les différents domaines sont représentés par les boîtes de couleur. (B) Alignement protéique des domaines conservés de sous-unités NF-YB. Les différents domaines sont représentés par les boîtes de couleur. (C) Structure 3D du complexe du dimère NF-YB (vert) NF-YC (jaune) en interaction avec l'ADN (violet).

Sources: (A-B) Laloum et al., 2013
 (C) Romier et al., 2003

Dans le complexe NF-Y, la sous-unité A est impliquée dans la liaison spécifique à la boîte CCAAT et elle possède un domaine d'activation riche en glutamine et en résidus hydrophobes (Mantovani, 1999). La liaison du complexe NF-Y à l'ADN ne se fait que sous la forme trimérique. La sous-unité NF-YA, bien qu'étant responsable de la liaison à la boîte CCAAT, ne peut agir en tant que facteur transcription seule (Kim et al., 1996; Sinha et al., 1996). NF-YA possède deux principaux domaines nécessaires à ses fonctions: un domaine de liaison au dimère NF-YB / NF-YC (appelé A1) et un domaine de liaison à l'ADN (appelé A2) (**Figure 30C**) (Mantovani et al., 1994). Ces deux domaines très conservés sont constitués d'hélices alpha reliées entre elles par une boucle de dix à quinze acides aminés. L'hélice alpha A2 constitue le DBD de NF-YA qui est relativement original et elle ne présente qu'une homologie de séquence avec le régulateur de la floraison CONSTANS (Wenkel et al., 2006). Lors de la liaison à l'ADN, le domaine A2 de NF-YA s'insère dans le sillon mineur de l'ADN pour lier l'oligonucléotide CCAAT, occasionnant un repliement de l'ADN (bending) d'environ 80° (**Figure 30D**) (Nardini et al., 2013). Le domaine A1 est requis pour l'interaction avec le dimère NF-YB et NF-YC. De façon intéressante, la sous-unité NF-YA ne peut pas interagir avec NF-YB ou NF-YC seule, la formation du dimère B / C est un prérequis pour l'interaction avec NF-YA.

3.2.2.2. Le dimère NF-YB / NF-YC

Les sous-unités B et C du complexe NF-Y présentent respectivement une forte homologie de séquence avec les histones H2B et H2A mais aussi avec les protéines NC2 β et α (Baxevanis et al., 1995; Dolfini et al., 2012). En effet, NF-YB et NF-YC possèdent un domaine HFM (Histone Fold Motif) qui correspond au domaine globulaire des histones, requis pour la liaison non spécifique à l'ADN et pour la formation des complexes multimériques (Dolfini et al., 2012). De façon intéressante, les domaines impliqués dans les interactions protéiques et la liaison à l'ADN au sein du dimère NF-YB / NF-YC, recouvrent le domaine HFM (**Figure 31A-B**) (Kim et al., 1996; Sinha et al., 1996). Des expérimentations précises de délétion et de mutagenèse ont identifié les domaines et les acides aminés requis pour chacune des fonctions de ce dimère (**Figure 31A-B**) (Kim et al., 1996; Sinha et al., 1996). De plus, chez les animaux, des études de cristallographie ont permis de modéliser la formation de ce dimère et son action lors du recrutement de la sous-unité NF-YA et de la liaison à l'ADN (**Figure 31B**) (Romier et al., 2003; Nardini et al., 2013). Les domaines conservés de NF-YB et NF-YC sont constitués de quatre hélices

alpha reliées entre elles par des boucles d'acides aminés (Laloum et al., 2013). Les trois premières hélices (appelées $\alpha 1$ à $\alpha 3$) constituent le domaine HFM, la dernière hélice (αC) est aussi présente chez les histones et les protéines NC2. Dans le cas d'NF-YC, elle jouerait un rôle particulier dans la formation du trimère et dans l'interaction avec d'autres protéines (**Figure 31B**) (Romier et al., 2003). Grâce à ces domaines, les deux sous-unités s'associent tête-bêche comme les histones H2A/H2B et les NC2 α/β , même si quelques différences sont à signaler, à la fois dans l'identité de séquence et dans l'assemblage (Romier et al., 2003). Ce dimère présente la capacité d'interagir avec la molécule d'ADN de façon non spécifique, ce qui permet de stabiliser le complexe NF-Y / ADN. Cette interaction est dépendante de liaisons électrostatiques et de van der Waals entre la face supérieure basique du dimère NF-YB / NF-YC et le squelette de sucres phosphatés chargés négativement de l'ADN (Nardini et al., 2013). Ainsi, la déformation de la structure d'ADN induite par la liaison de NF-YA à la boîte CCAAT est partiellement compensée par le dimère NF-YB / NF-YC, qui modifie localement la structure d'ADN à la manière des histones (Nardini et al., 2013). La localisation subcellulaire du dimère NF-YB / NF-YC semble varier d'un organisme à l'autre mais dans tous les cas, nous assistons à des relocalisations au cours du processus d'assemblage du complexe. Chez les animaux, deux études principales se sont intéressées à la localisation de NF-YB et de NF-YC. La première étude a démontré que NF-YA et NF-YB sont localisés dans le noyau. Cependant, la sous-unité NF-YC est distribuée à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau (**Figure 31A-C**) (Frontini et al., 2004). De plus, la localisation nucléaire de NF-YC est dépendante de son interaction avec NF-YB et elle est régulée par le cycle cellulaire. Ainsi, la relocalisation des sous-unités dans le noyau est un mécanisme de régulation qui permet de contrôler la formation du complexe NF-Y et donc des gènes qu'il régule (Frontini et al., 2004). Une deuxième étude a confirmé ces premières observations et elle a établi que la translocation du dimère NF-YB / NF-YC dépend de l'importine 13 (Kahle et al., 2005). Les deux sous-unités ne possèdent pas de NLS définis et même si elles ont la capacité de diffuser dans le noyau, via les pores nucléaires, elles sont aussi importées de façon active. L'importine 13 est cependant incapable de lier les sous-unités B et C indépendamment, elle requiert la formation du dimère. Aussi, il a été démontré que l'importine 13 agit en compétition avec la sous-unités NF-YA, en se fixant sur les plateformes HFM du dimère B/C (Kahle et al., 2005). Chez les végétaux, la situation semble être légèrement différente, c'est la sous-unité NF-YB qui est cytoplasmique et relocalisée dans le noyau, via son interaction avec NF-YC

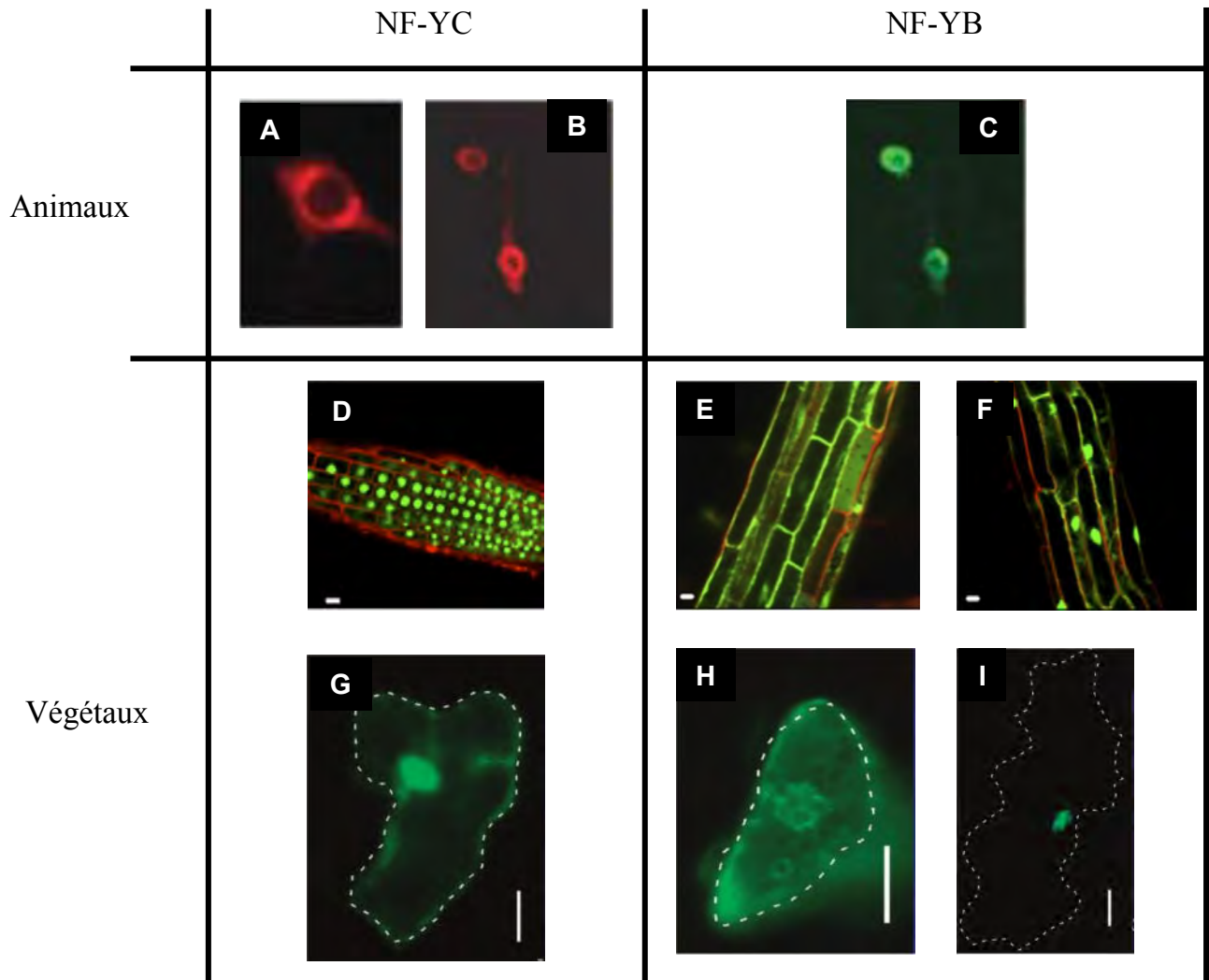


Figure 32: Localisation et relocalisation de NF-YB et NF-YC

(A-C) Immunolocalisation de Flag-NF-YC et NF-YB dans des cellules NIH 3T3. Exprimée seule, la protéine NF-YC est localisée dans le cytoplasme de la cellule (A) mais la co-expression de NF-YB induit une relocalisation nucléaire (B). NF-YB, quand a elle est localisée dans le noyau (C). Chez *A. thaliana*, la sous-unité NF-YC2 fusionnée à la GFP est localisée dans le noyau (D et G). La sous unité NF-YB3 est quant à elle cytoplasmique (E) et relocalisée dans le noyau après un traitement tunicamycine pendant 4H (F). De façon similaire, NF-YB10 d'*A. thaliana* est cytoplasmique lorsqu'elle est exprimée seule (H), mais une co-expression de NF-YC2 induit une relocalisation de NF-YB10 dans le noyau (I)

Sources: (A-C) Frontini et al., 2004
 (D-F) Liu and Howell, 2010
 (G-I) Hackenberg et al., 2012

qui quant à lui est nucléaire (Liu and Howell, 2010; Hackenberg et al., 2012). Chez *A. thaliana*, dans le cas de la réponse au stress de l'endoréticulum plasmique (ER), défini comme une accumulation de protéines altérées dans leur structure tertiaire dans ce compartiment cellulaire, il a été démontré que AtNF-YB3 qui est cytoplasmique en temps normal (**Figure 32E**), est relocalisé dans le noyau après induction du stress (**Figure 32F**). Dans le même contexte, AtNF-YC2 présente une localisation nucléaire qui n'est pas altérée par le traitement (**Figure 32D**) (Liu and Howell, 2010). Une deuxième étude, toujours chez *A. thaliana*, étaye cette hypothèse en démontrant que AtNF-YB10, lorsqu'elle est exprimée seule, est cytoplasmique alors que la co-expression de AtNF-YC2 induit son accumulation dans le noyau (**Figure 32G-I**) (Hackenberg et al., 2012). Ainsi, le mécanisme de translocation du dimère NF-YB/NF-YC dans le noyau semble être conservé entre les plantes et les animaux. En effet, la sous-unité cytoplasmique varie mais la formation du dimère paraît être requise pour observer la localisation nucléaire du système.

3.2.2.3. Spécificité d'interaction entre les sous-unités de plantes

La plupart des études structurales qui ont permis de définir les domaines d'interaction et le processus de formation de complexes NF-Y, ont toutes été réalisées sur les systèmes animaux (Mantovani et al., 1994; Kim et al., 1996; Sinha et al., 1996; Mantovani, 1999). Toutefois chez les plantes, il existe un niveau supérieur de complexité. En effet, alors que chaque type de sous-unités est encodé par un seul gène chez les animaux et la levure, il existe une petite famille de gènes (une dizaine) chez les plantes (Petroni et al., 2012; Laloum et al., 2013). Par conséquent, il se pose la question de la spécificité d'interaction entre toutes ces sous-unités. Par exemple, chez *A. thaliana* il existe 29 gènes codant pour des NF-Y, ce qui autorise la formation d'environ 900 hétérotrimères différents (Calvenzani et al., 2012). Cette question a été étudiée par plusieurs groupes, principalement chez *A. thaliana* mais aussi de façon plus modeste chez *O. sativa*. La première étude réalisée sur le riz s'est concentrée sur la sous-unité OsHAP3A (OsNF-YB2) et sur sa capacité à interagir avec des HAP2 (NF-YA) et HAP5 (NF-YC) dans la levure par double hybride (Thirumurugan et al., 2008). Dans cette étude, les auteurs concluent à une spécificité d'interaction relativement forte. En effet, la sous-unité OsNF-YB2 n'interagit qu'avec deux NF-YA sur huit testés et avec cinq NF-YC sur sept testés (Thirumurugan et al., 2008). La très forte spécificité entre OsNF-YB2 et les NF-YA peut néanmoins s'expliquer par le fait que le dimère NF-YB/NF-YC est prérequis pour l'interaction avec

NF-YA. Les interactions NF-YB/NF-YA observées en levure sont donc probablement dépendantes de la présence d'une sous-unité NF-YC (HAP5) de levure. Plus récemment, deux autres études plus approfondies sur les sous-unités NF-Y d'*A. thaliana* sont venues compléter ces conclusions. La première a testé l'ensemble des homo et hétérodimérisations possibles entre les sous-unités NF-Y, tout en incluant les protéines divergentes, NC2 α et β (Hackenberg et al., 2012). Les auteurs ont testé 1224 interactions différentes par le système du double hybride dans la levure et ils n'ont pu confirmer une interaction positive que pour 8% d'entre elles, révélant une très forte spécificité d'interaction en apparence, cependant, ce résultat est pondéré. En effet, les homodimères testés n'ont *a priori* aucun sens biologique puisqu'ils n'entrent pas dans la composition d'un facteur de transcription NF-Y. De plus, les auteurs ont aussi testé les interactions entre les sous-unités NF-YA et NF-YB ou NF-YC alors que le dimère NF-YB/NF-YC est requis pour l'interaction avec les NF-YA. Enfin, les NC2 α et β sont des protéines apparentées aux NF-Y mais en réalité appartenant à une autre classe de protéines, qui ne présente pas toutes la capacité d'interagir avec les NF-Y. La nomenclature d'*A. thaliana* a été clarifiée depuis (Petroni et al., 2012). Parce qu'il n'autorise que des études d'interactions deux-à-deux, le système double hybride ne permet l'étude correcte que de la spécificité entre les protéines NF-YB et NF-YC. En reprenant les données générées par Hackenberg et ses collaborateurs uniquement sur ce type d'hétérodimérisations, nous arrivons à 52% d'interactions possibles. De façon complémentaire, une seconde étude sur *A. thaliana* est focalisée sur la dimérisation des NF-YB et NF-YC. Dans cet objectif, les auteurs ont utilisé le système double hybride et ils ont testé les 81 interactions entre les neuf NF-YC et les neuf NF-YB d'*A. thaliana*. Dans cette expérimentation, plus de 85% des interactions ont pu être confirmées, révélant une faible spécificité d'interaction. De surcroît, les quelques protéines n'interagissant pas ensemble en double hybride, ont par la suite montré une interaction par "pull down" (Calvenzani et al., 2012). Au cours de cette étude, les auteurs ont donc conclu que l'ensemble des interactions entre NF-YB et NF-YC sont possibles avec un certain degré d'affinité. En conclusion, les trois études principales, portant sur l'analyse de la spécificité d'interaction au sein du complexe NF-Y, présentent des messages relativement différents. Or, le système double hybride n'est probablement pas le meilleur outil pour évaluer des différences d'interaction fines et il est probable qu'au sein de la cellule végétale, la situation est différente. Au-delà de l'affinité d'interaction entre les sous-unités, c'est

vraisemblablement l'abondance relative de chacune des sous-unités au sein de la cellule qui va prévaloir pour la formation des complexes.

3.2.2.4. Régulations transcriptionnelles post-traductionnelles des NF-Y

Comme de nombreux facteurs de transcription, l'expression et l'activité des complexes NF-Y sont finement régulées par la cellule (Dolfini et al., 2012). Chez les animaux, il ne semble pas y avoir de régulations transcriptionnelles majeures des membres du complexe NF-Y, qui possèdent une expression quasi constitutive (Mantovani, 1999; Dolfini et al., 2012). Cependant, toujours chez les animaux, nous observons une régulation post-transcriptionnelle à la fois par un épissage alternatif de chacune des sous-unités (Dolfini et al., 2012) et par PTGS (Post Transcriptional Gene Silencing) via les microARN (Chen et al., 2011). Chez les plantes, la régulation transcriptionnelle des NF-Y est plus complexe et elle est probablement liée à la diversification fonctionnelle et structurelle des sous-unités observées chez celle-ci (Détailé dans la partie 3.3. (Laloum et al., 2013)). Outre cette régulation transcriptionnelle, nous observons une régulation post-transcriptionnelle, notamment sur certaines sous-unités *NF-YA* qui sont la cible de microARN169 (Combié et al., 2006; Li et al., 2008b; Reynoso et al., 2012; Ni et al., 2013; Sorin et al., 2014). Chez *M. truncatula*, *MtNF-YA1* est la cible d'une PTGS particulière via un petit peptide issu de l'épissage alternatif du premier intron (Combié et al., 2008). Chez les animaux, il a été reporté trois types de modifications post-traductionnelles sur les protéines NF-Y: ubiquitination, acétylation et phosphorylation (Dolfini et al., 2012; Nardini et al., 2013). Les sous-unités NF-YA et NF-YB sont toutes les deux des cibles de protéines de la famille des KAT (Lysine (K) Acetyl Transferase) telles que p300 (Dolfini et al., 2012). Même si l'effet des KAT sur NF-YB est encore mal connu, l'acétylation de résidus lysines sur le domaine A1 de NF-YA contribue à protéger la protéine de la polyubiquitination et ainsi à augmenter sa stabilité (Manni et al., 2008; Dolfini et al., 2012). En ce qui concerne la phosphorylation, seule la sous-unité NF-YA a été caractérisée comme portant cette modification suite à l'interaction avec CDK2 lors de la régulation du cycle cellulaire (Yun et al., 2003; Chae et al., 2004). Enfin, la sous-unité NF-YB est ubiquitinée sur le résidu lysine 138 de la même façon que l'histone H2B, ce qui vient parfaire la comparaison entre ces deux familles de protéines (Nardini et al., 2013). Aucune modification post-traductionnelle des sous-unités NF-Y n'a encore été rapportée chez les plantes. Cependant, étant donnée la forte conservation entre les systèmes, nous pouvons

faire l'hypothèse que les acétylations et les phosphorylations décrits chez les animaux sont retrouvées chez les végétaux.

3.3. Rôles des NF-Y chez les plantes, article 1: CCAAT-box binding factor, Y so many?

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion de participer à l'écriture d'une revue bibliographique sur le rôle des facteurs de transcription NF-Y chez les plantes. En combinant des approches phylogéniques et les données d'expression disponibles, nous avons dressé une synthèse des processus dans lesquels sont impliqués les NF-Y chez les plantes. En parallèle, un deuxième article a apporté des informations complémentaires (Petroni 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).

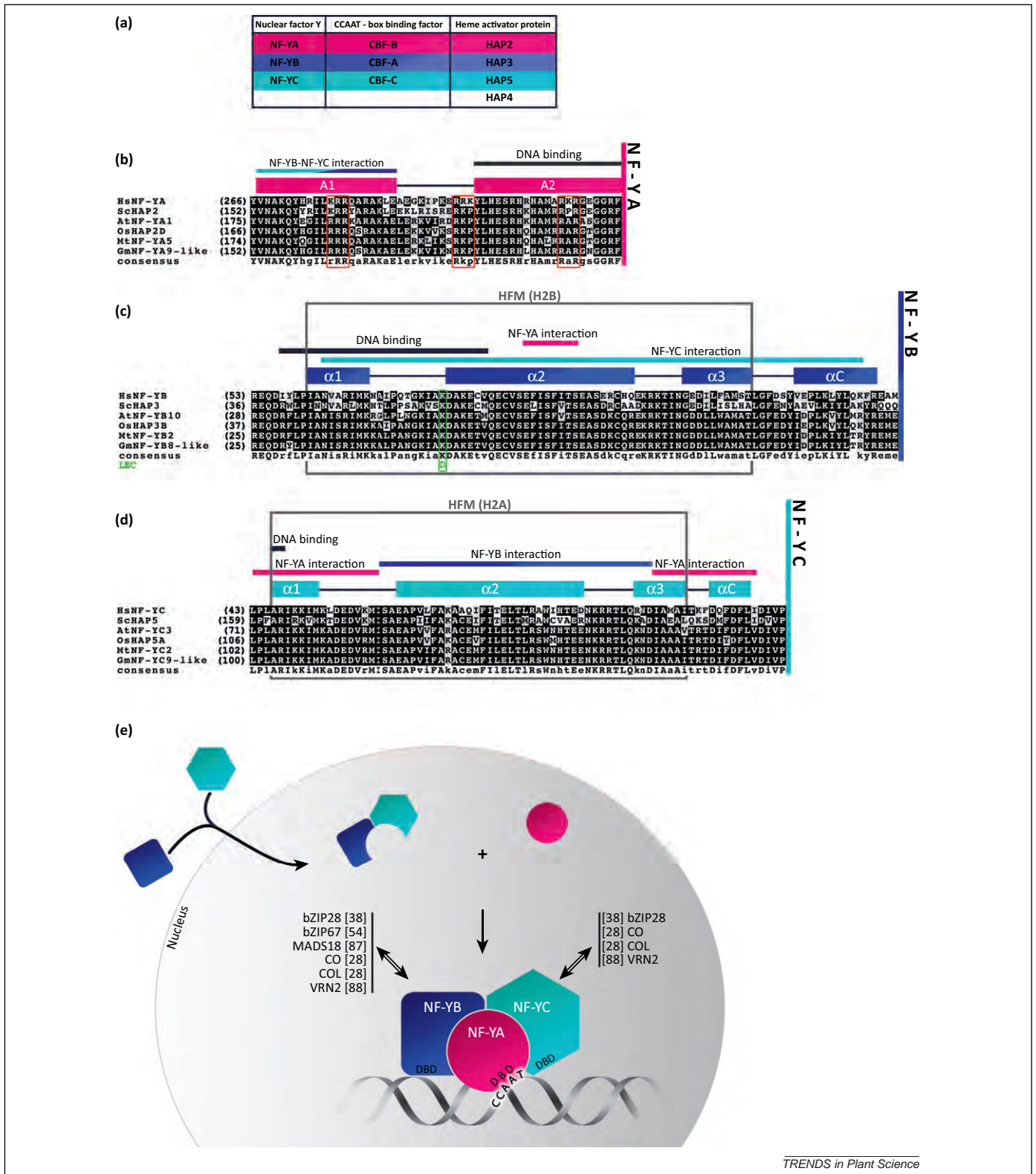


Figure 1. Hypothetical assembly of the NF-Y heterotrimer in plants and conserved domains of the three NF-Y subunits. **(a)** Nomenclature found for CCAAT-box binding factor encoding genes in the literature. **(b)** Amino acid alignment of conserved domains of NF-YA proteins from different organisms: 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

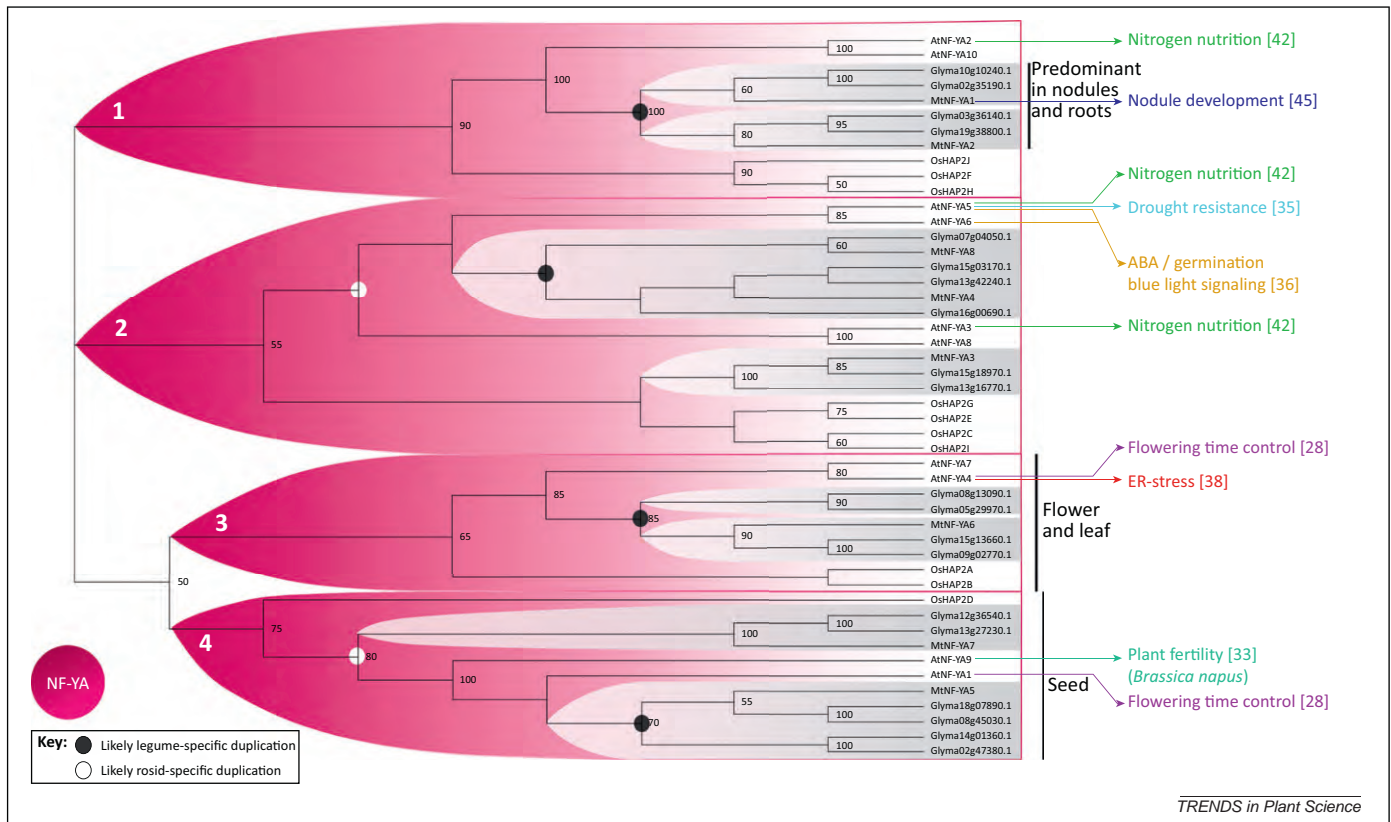


Figure 2. Phylogenetic relationships between NF-YA proteins from *Arabidopsis thaliana* (10 proteins), *Oryza sativa* (rice) (10 OsHAP2s), *Medicago truncatula* (8) and *Glycine max* (soybean) (20). Note that in soybean, the large number of NF-Y sequences (approximately double) can be explained by a 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>; 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].

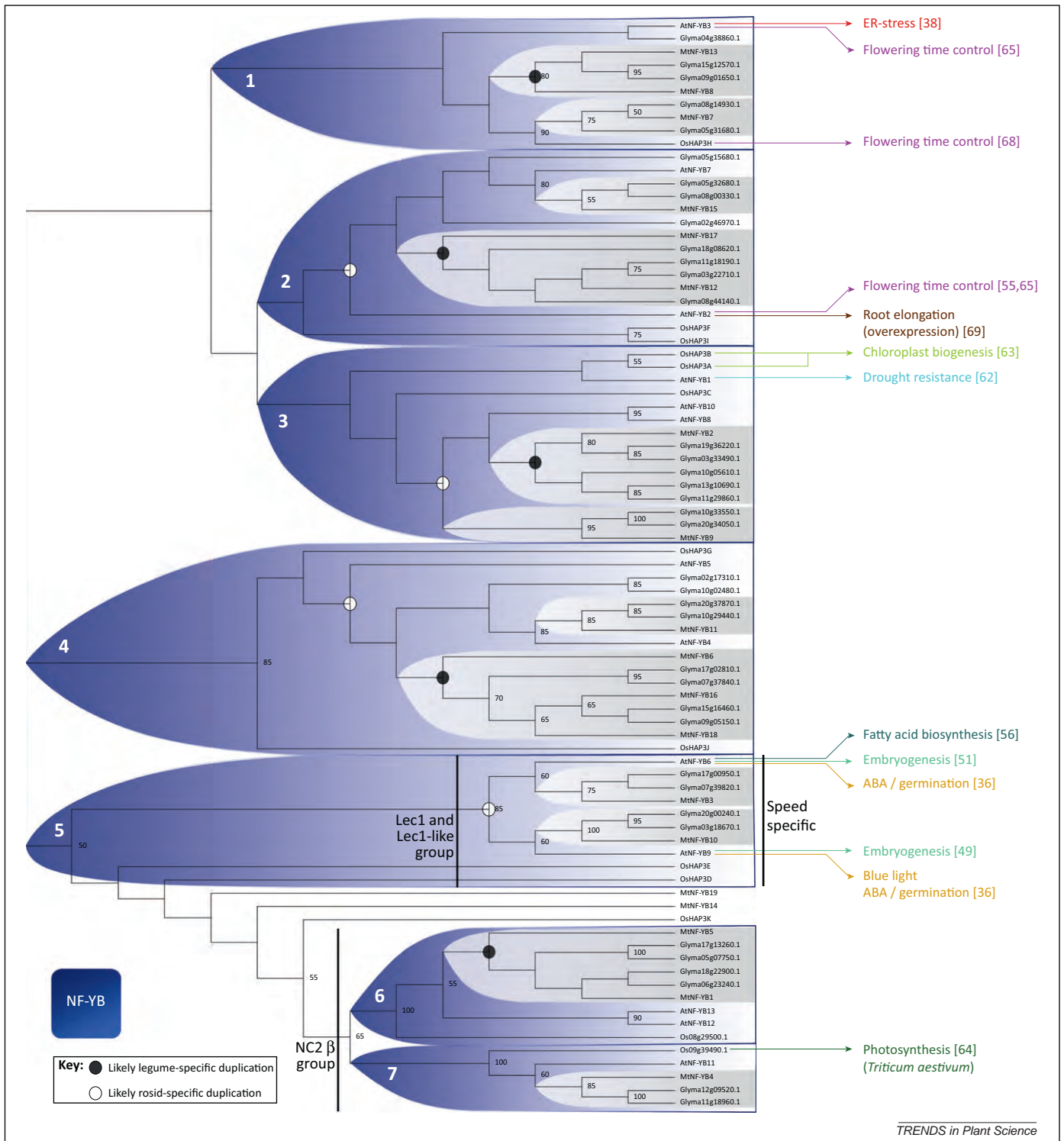


Figure 3. Phylogenetic relationships between NF-YB proteins from *Arabidopsis thaliana* (13 proteins), rice (*Oryza sativa*) (12 OsHAP3s), *Medicago truncatula* (19) and soybean (*Glycine max*) (39). The same approach has been used as that for the NF-YA tree (Figure 2). All the NF-YB genes are likely 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 NC2 β proteins. In animals, the NC2 β proteins are transcriptional repressors of the TATA-binding protein (TBP); they contain histone-fold domains and act in complexes with NC2 α 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.

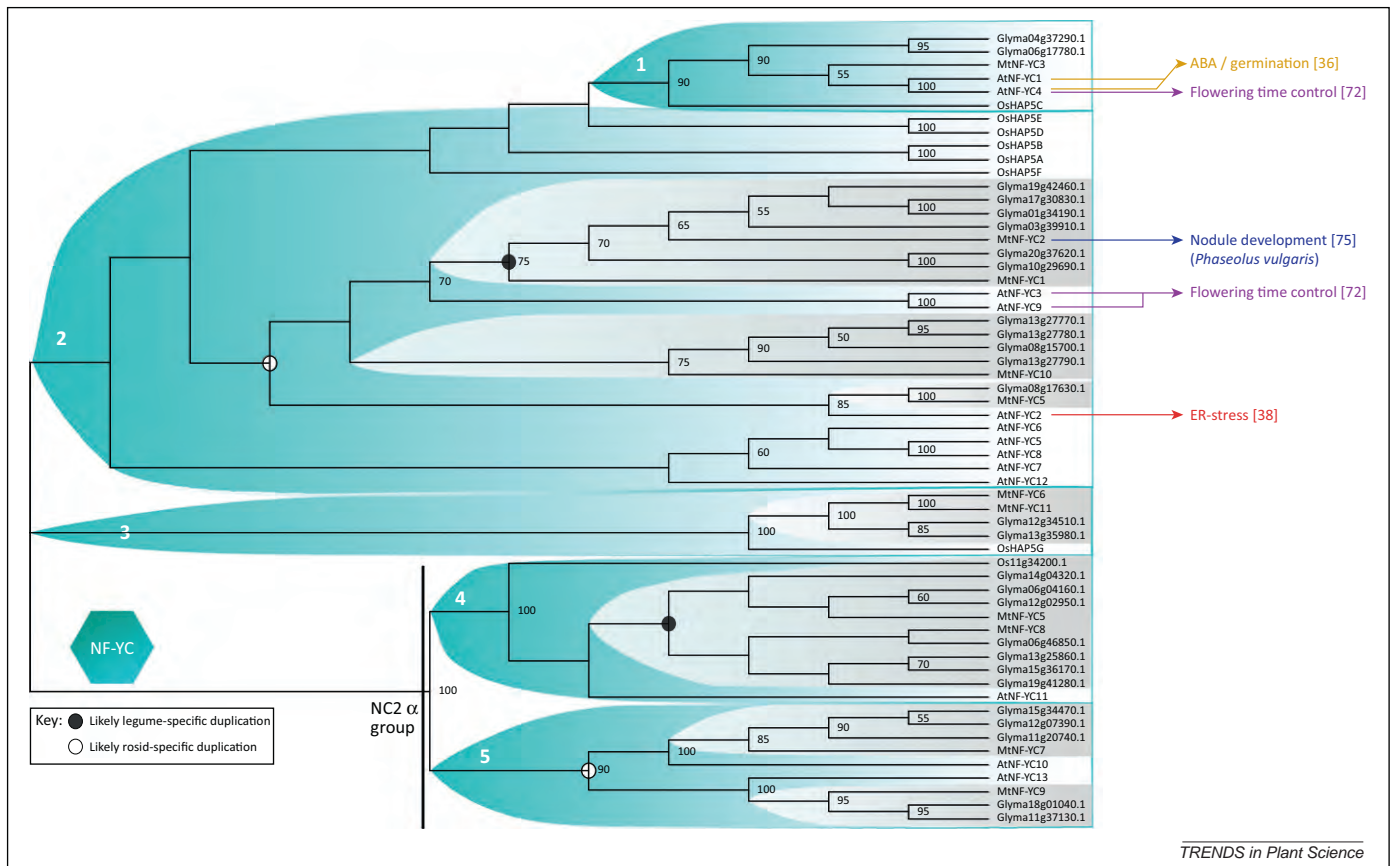


Figure 4. Phylogenetic relationships between NF-YC proteins from *Arabidopsis thaliana* (13 proteins), *Oryza sativa* (rice) (8 OsHAP3s), *Medicago truncatula* (11) and *Glycine max* (soybean) (27). The same approach as that for the NF-YA and NF-YB trees has been used (Figures 2 and 3). All the NF-YC 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 above-mentioned 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
- Caretto, 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

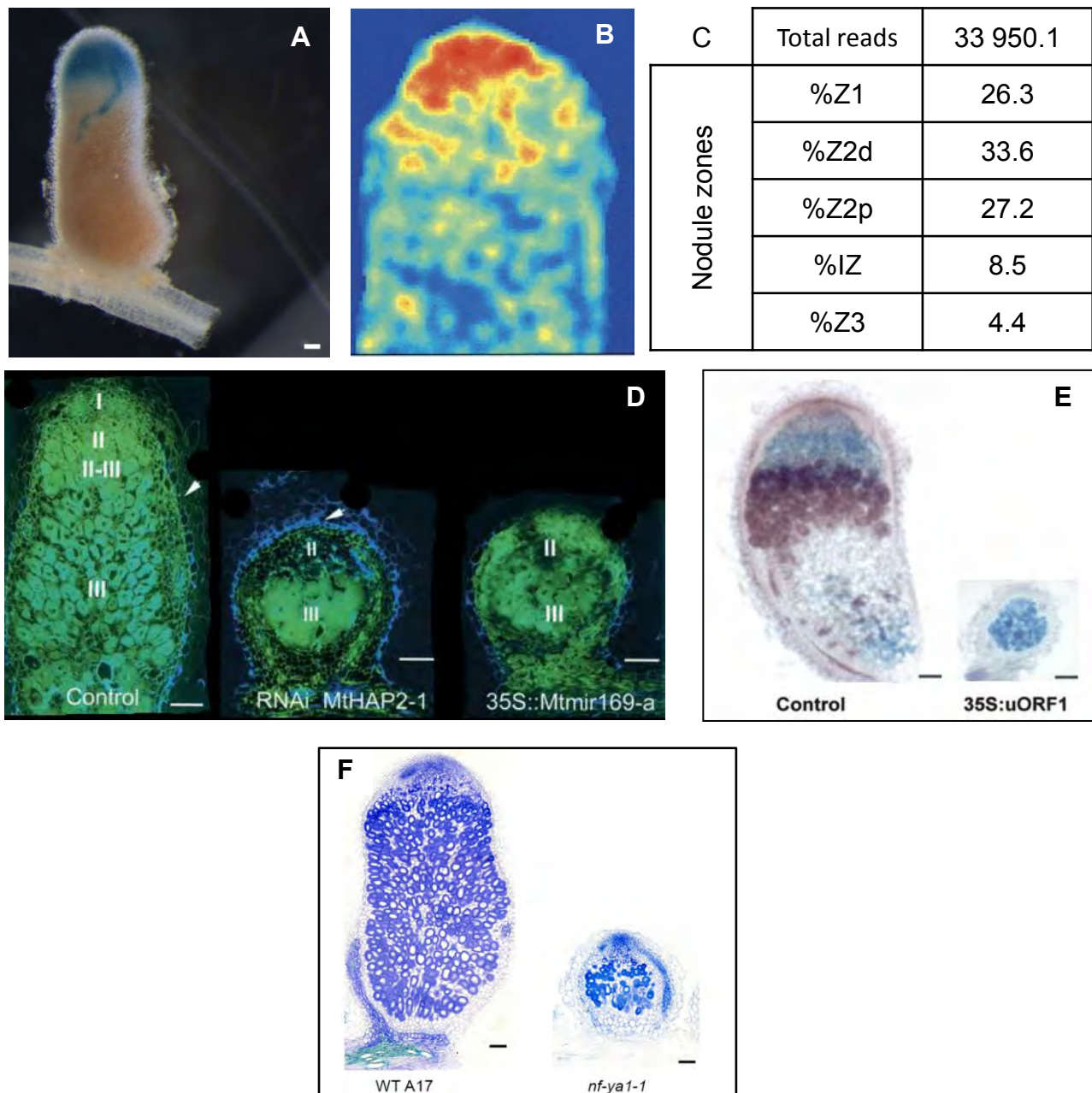


Figure 33: *MtNF-YAI* est exprimé à l'apex du nodule et est nécessaire à son développement chez *M. truncatula*.

(A) Localisation histochimique de *pNF-YAI:GUS* dans un nodule de *M. truncatula* 35 jours après inoculation. (B) Hybridation *in situ* de *NF-YAI* sur une coupe longitudinale de nodule. (C) nombre de lectures totales par séquençage d'ARN de *NF-YAI* dans un nodule de 10 jours (normalisation *deseq*) et répartition de ces lectures en fonction des zones isolées. (D) Phénotype de la diminution de l'expression de *NF-YAI* par RNAi ou par surexpression de miR169a. Phénotype de la diminution de l'expression de *NF-YAI* par surexpression de uORF1. (F) Phénotype nodulaire du mutant *nf-ya1-1*.

Sources: (A et F) Laporte et al., 2014
 (B et D) Combier et al., 2006
 (C) Roux et al., 2014
 (E) Combier et al., 2008

3.4. Les NF-Y impliqués dans la nodulation

De façon complémentaire et plus approfondie que la revue bibliographique, nous allons nous focaliser sur le rôle des NF-Y au cours de la symbiose fixatrice d'azote. La première sous-unité NF-Y décrite dans la symbiose est MtNF-YA1, précédemment appelée MtHAP2-1, publiée en 2006 (Combier et al., 2006). Depuis, plusieurs études ont complété cette description, à la fois chez *M. truncatula* mais aussi sur la deuxième légumineuse modèle *L. japonicus* puis sur la plante d'intérêt agronomique *P. vulgaris*.

3.4.1. MtNF-YA1 chez *M. truncatula*

MtNF-YA1 a été identifié par des analyses transcriptomiques comme un facteur de transcription fortement induit lors du processus de nodulation chez *M. truncatula* (El Yahyaoui et al., 2004). Des analyses d'expression fines par hybridation d'ARN *in situ*, par fusion transcriptionnelle *pMtNF-YA1:GUS* et par séquençage d'ARN couplé à la microdissection laser, ont permis d'établir que *MtNF-YA1* est fortement exprimé dans la partie apicale du nodule, au niveau des zones méristématique et d'infection (**Figure 33A-C**) (Combier et al., 2006; Laporte et al., 2014; Roux et al., 2014). Cette localisation est la conséquence d'un contrôle très fin de l'expression de *MtNF-YA1* par des mécanismes de régulations post-transcriptionnelles, impliquant le microARN miR169a et un petit peptide uORF1 (Combier et al., 2006; Combier et al., 2008). Le miR169a est exprimé dans la zone d'infection et possède la capacité de se fixer sur le 3' UTR (UnTranslated Region) de *MtNF-YA1*, ce qui conduit à la dégradation de l'ARN messager (Combier et al., 2006). De plus, une étude plus récente implique le miR169a dans la régulation de la traduction de *MtNF-YA1* et de son recrutement par les polysomes (Reynoso et al., 2012). L'uORF1 est quant à lui issu d'un épissage alternatif du premier intron de *MtNF-YA1* qui conduit à la formation d'un petit peptide de 62 acides aminés (Combier et al., 2008). La proportion d'ARN messager de *MtNF-YA1* épissé alternativement augmente au cours de la nodulation, principalement dans la zone d'infection (Combier et al., 2008). Ainsi, l'expression de ce gène est finement contrôlée et restreinte à l'apex du nodule où MtNF-YA1 joue un rôle majeur. En effet, la diminution de l'expression de *MtNF-YA1* par RNAi ou par surexpression de miR169a ou de uORF1, conduit à la formation de petits nodules avec un développement fortement perturbé (**Figure 33D-E**) (Combier et al., 2006; Combier et al., 2008). Aussi, l'utilisation d'un mutant *Mtnf-ya1-1* tilling présentant un codon stop précoce

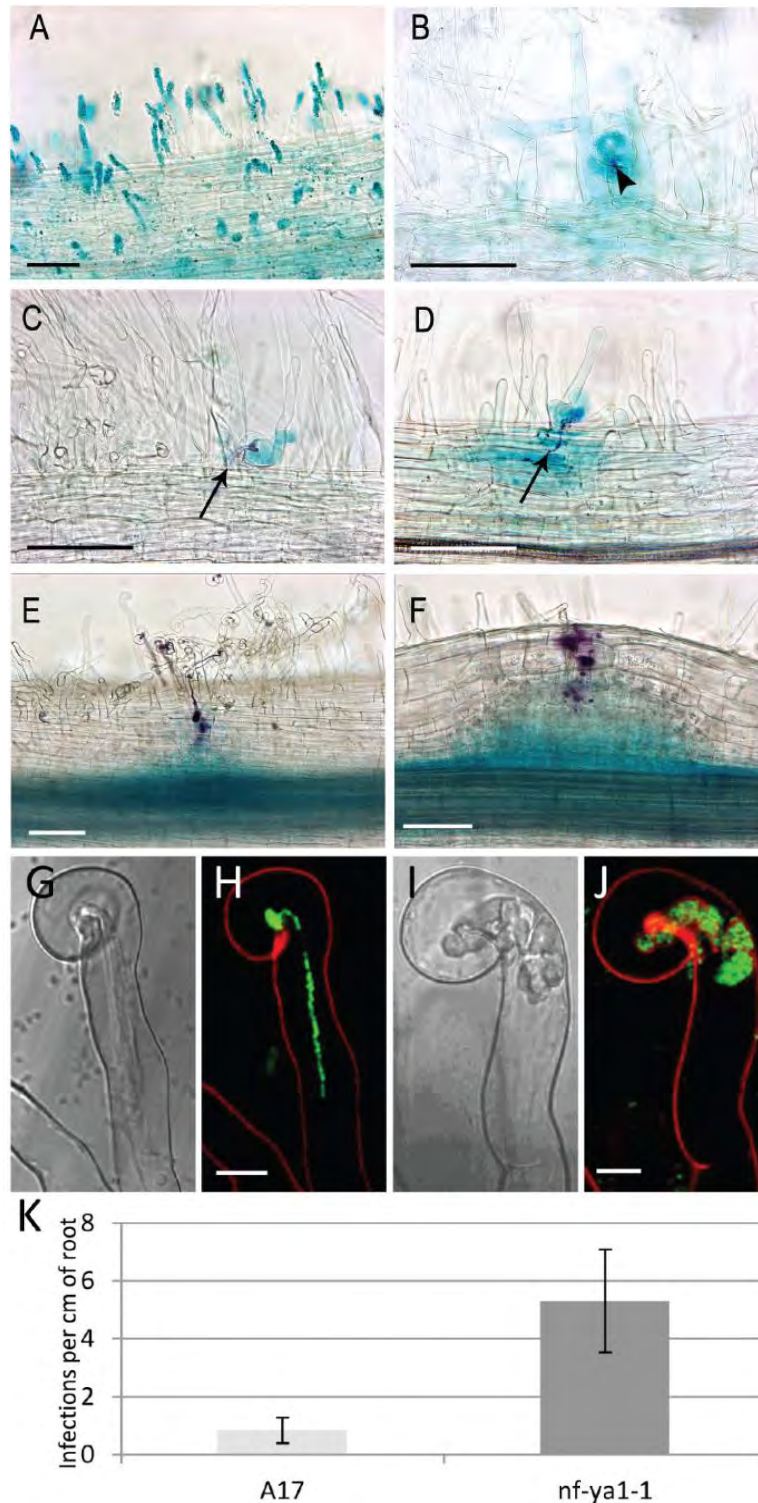


Figure 34: *NF-YAI* est exprimé et requis lors du processus d'infection rhizobienne chez *M. truncatula*.

(A-F) Localisation histochemique de *pNF-YAI:GUS* (bleu) au cours de l'infection par *S. meliloti* portant une construction *pHema:LacZ* (violet). (G-J) Imagerie confocale de cordons d'infection bactérien (vert) dans des poils absorbants racinaires sauvages (G-H) ou chez le mutant *nf-ya1-1* (I-J). (K) nombre de sites d'infections par centimètre de racine chez le sauvage (gris clair) ou chez le mutant *nf-ya1-1* (gris foncé).

Source: Laporte et al., 2014

qui conduit à la formation d'une protéine non fonctionnelle, a récemment permis de confirmer ces résultats, validant également que les nodules formés chez le mutant sont moins nombreux et non fixateurs (**Figure 33F**) (Laporte et al., 2014). D'autre part, la régulation spatio-temporelle de *MtNF-YA1* est importante et l'expression de formes de *MtNF-YA1* insensibles au miR169a ou de RNAi sur uORF1, conduit à la formation de nodules altérés dans leur développement (Combiér et al., 2006; Combiér et al., 2008). Ainsi MtNF-YA1 est un facteur de transcription fortement régulé, nécessaire à la formation du nodule et à la persistance du méristème chez *M. truncatula*. Une étude récente avec une approche "fate map" a permis de mieux caractériser le rôle de MtNF-YA1 dans la mise en place du méristème nodulaire. Le mutant *Mtnf-ya1-1* est précisément affecté dans la division de la couche corticale C3, qui donne naissance au méristème nodulaire (**Figure 9**) (Xiao et al., 2014). Dans ce sens, les couches C3 et C4 qui sont à l'origine de la formation du primordium nodulaire et d'une partie du nodule, ne sont pas affectées. Ainsi, dans l'organogénèse nodulaire, MtNF-YA1 joue un rôle spécifique dans la division des cellules méristématiques.

D'autre part, un rôle plus précoce de *MtNF-YA1* a été rapporté lors de l'infection rhizobienne. Par l'utilisation d'une fusion *pMtNF-YA1:GUS* et d'analyses transcriptomiques, les auteurs ont caractérisé une expression précoce de *MtNF-YA1* dans l'épiderme racinaire, quelques heures après inoculation avec les bactéries *S. meliloti* (**Figure 34A**) (Laporte et al., 2014). Cette expression est maintenue lors du processus d'infection et nous observons une corrélation très forte avec la progression des cordons d'infection (**Figure 34B-F**). De plus, l'induction de *MtNF-YA1* est dépendante de composants de la voie de signalisation NF tels que NFP, LYK3 ou DMI1. L'analyse du mutant *Mtnf-ya1-1* lors du processus d'infection révèle que la formation et la progression du cordon d'infection sont fortement altérées (**Figure 34G-J**) (Laporte et al., 2014). Une étude en microscopie électronique à transmission de la structure des cordons d'infection dans le mutant *Mtnf-ya1-1* révèle une paroi plus fine et moins cohérente chez le mutant, comparée au sauvage (Laporte et al., 2014). Enfin, cette altération du processus d'infection est accompagnée par une augmentation significative du nombre d'infections chez le mutant (**Figure 34K**) (Laporte et al., 2014). En conclusion, chez *M. truncatula*, le facteur de transcription NF-Y est exprimé à la fois au cours des étapes précoces et tardives de

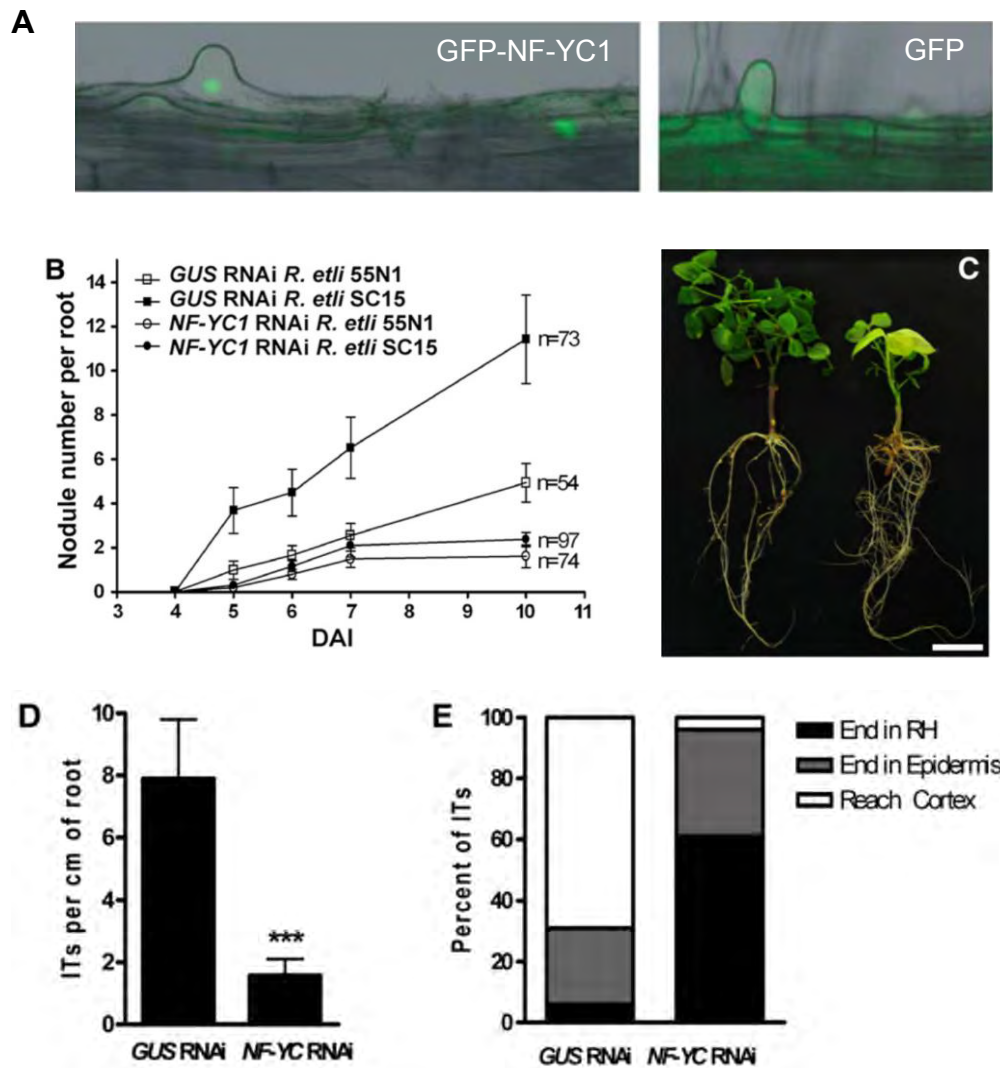


Figure 35: PvNF-YC1 est localisée dans le noyau et requise pour la symbiose entre *P. vulgaris* et *R. etli*.

(A) La fusion GFP-PvNF-YC1 est localisée dans le noyau des cellules racinaires de *P. vulgaris* (photo de gauche) alors que la GFP seule diffuse dans l'ensemble de la cellule (photo de droite). (B) nombre de nodules formés par racine de *P. vulgaris* transformées par une construction RNAi ciblant *pvNF-YC1* ou la *GUS* (contrôle) et inoculées avec une souche compétitive (SC15) ou pas (55N1). (C) Illustration du phénotype de déficience en azote entraîné par la diminution de l'expression de *NF-YC1* (plante de droite) comparé au contrôle (plante de gauche). (D) nombre de cordons d'infection formés par centimètre de racine chez le RNAi et le contrôle. (E) Progression des cordons d'infection chez le RNAi et le contrôle

Source: Zanetti et al., 2010

l'interaction symbiotique et il est impliqué dans les processus d'infection rhizobienne et d'organogénèse nodulaire.

3.4.2. *PvNF-YC1* chez *P. vulgaris*

PvNF-YC1 a été identifié chez le haricot (*P. vulgaris*) comme un gène fortement induit, suite à une inoculation avec des rhizobia compétitifs, en comparaison avec des rhizobia peu compétitifs (Zanetti et al., 2010). La protéine *PvNF-YC1* est localisée de façon prédominante dans le noyau des cellules racinaires de *P. vulgaris*, ceci de façon indépendante de la présence des rhizobia (**Figure 35A**) (Zanetti et al., 2010). Au niveau fonctionnel, la diminution de l'expression de *PvNF-YC1* par RNAi affecte à la fois le développement nodulaire, l'infection rhizobienne et la réponse au NF (**Figure 35B-E**). En effet, la construction RNAi, ciblant spécifiquement *PvNF-YC1*, diminue fortement le nombre et le développement de nodules formés en réponse aux deux types de bactéries (**Figure 35B-C**). De surcroît, l'induction des CDPK (Cyclin DePendent Kinases): *CDC2*, *CDC25* et de la cycline *CYCB*, impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, est fortement réduite dans le RNAi *PvNF-YC1* (Zanetti et al., 2010). En ce qui concerne l'infection rhizobienne, la construction RNAi diminue le nombre de sites d'infections et affecte la progression des cordons d'infections ; la majorité étant stoppée dans l'épiderme racinaire (**Figure 35D-E**) (Zanetti et al., 2010). Enfin, la surexpression de *PvNF-YC1* augmente le nombre de nodules formés à la fois avec la souche compétitive mais aussi non compétitive de rhizobia, nivelant la différence entre les deux bactéries. Nous constatons donc, malgré la différence entre des nodules déterminés et indéterminés, une convergence entre les phénotypes obtenus en supprimant *PvNF-YC1* et *MtNF-YA1*, à la fois sur le développement nodulaire mais aussi sur l'infection rhizobienne.

Plus récemment, un crible double hybride dans la levure, utilisant *PvNF-YC1* comme appât, a permis l'identification d'un facteur de transcription de type GRAS, impliqué dans la symbiose fixatrice d'azote et dans la formation des racines latérales (Battaglia et al., 2014; Rípodas et al., 2014). Ce facteur de transcription, appelé *PvSIN1* (SCL13 Involved in Nodulation 1), est assez éloigné phylogénétiquement de *NSP1* et 2, les facteurs de transcription GRAS impliqués dans les étapes précoces de la nodulation (voir 2.2.2.2). Il est localisé à la fois dans le noyau et le cytoplasme des cellules mais semble interagir avec *PvNF-YC1* dans le noyau des cellules de *N. benthamiana* (Battaglia et al.,

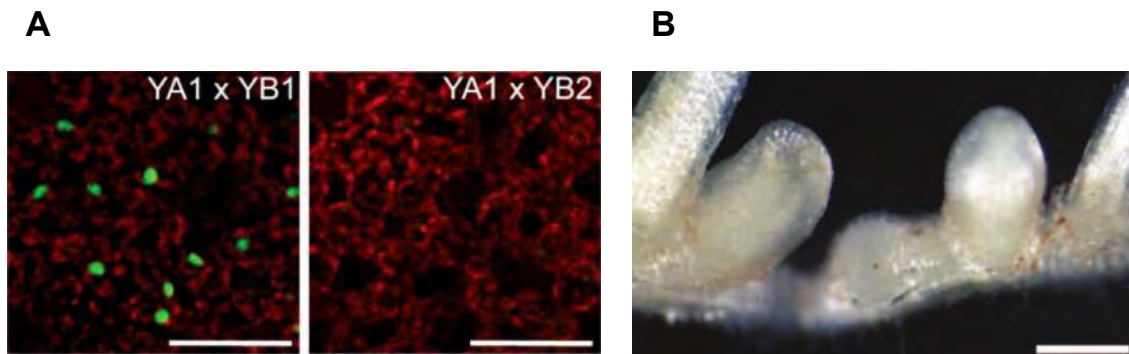


Figure 36: LjNF-YA1 et LjNF-YB1 dimèrisent et sont impliqués dans la formation de divisions corticales racinaires.

(A)Expérimentation de BiFC, cYFP_NF-YA1 interagit avec nYFP-NF-YB1 mais pas avec nYFP-NF-YB2. (B) L'expression ectopique de *pLjUb:NF-YA1* et *p35S:NF-YB1* dans des racines de *L. japonicus* induit la formation de divisions corticales en l'absence de rhizobium.

Source: Soyano et al., 2013

Tableau 2: Inventaire des sous-unités du complexe NF-Y impliquées dans la symbiose rhizobienne

Nom	Type	espèce	Fonction	Références
MtNF-YA1 (HAP2-1)	NF-YA	<i>M. truncatula</i>	Infections et développement nodulaire	Combier et al., 2006 Combier et al., 2008 Laporte et al., 2014
PvNF-YC1	NF-YC	<i>P. vulgaris</i>	Infections et développement nodulaire	Zanetti et al., 2010
LjNF-YA1	NF-YA	<i>L. Japonicus</i>	développement nodulaire	Soyano et al., 2013
LjNF-YB1	NF-YB	<i>L. Japonicus</i>	développement nodulaire	Soyano et al., 2013

2014). La diminution de l'expression de *PvSINI* affecte le nombre de nodules formés, la taille des nodosités et l'infection rhizobienne de façon très similaire à un RNAi sur *PvNF-YC1*. Cependant, *PvSINI* paraît jouer un rôle supplémentaire lors de la formation des racines secondaires car la construction RNAi diminue de façon significative la taille de ces structures (Battaglia et al., 2014). Ainsi, PvSINI constitue un nouveau type de protéine interagissant avec des facteurs de transcription NF-Y, en plus de bZIP28, de CONSTANS et de VRN2, qui ont déjà été décrits comme interagissant avec des sous-unités NF-YC de plantes (Wenkel et al., 2006; Liu and Howell, 2010; Li et al., 2011). De plus, cela suggère que les complexes NF-Y symbiotiques fonctionnent en association avec d'autres facteurs de transcription pour contrôler l'activation de leurs cibles.

3.4.3. *LjNF-YB1* et *LjNF-YA1* chez *L. japonicus*

Comme nous l'avons déjà évoqué dans la partie 2.2.2., chez la plante modèle *L. japonicus*, il a été montré que NIN contrôle l'expression des facteurs de transcription NF-Y. Une étude récente démontre en effet que l'induction de *LjNF-YB1* et de *LjNF-YA1* (l'orthologue de *MtNF-YA1*) par les rhizobia est dépendante de NIN (Soyano et al., 2013). Les auteurs ont révélé que le facteur de transcription *NIN* est capable de se lier au promoteur des deux sous-unités NF-Y et d'activer leur transcription. Aussi, *LjNF-YA1* et *LjNF-YB1* sont capables de former un hétérodimère *in planta* de façon partiellement spécifique, probablement via le recrutement d'une sous-unité NF-YC de tabac (**Figure 36A**) (Soyano et al., 2013). Enfin, une expression ectopique de ces deux sous-unités NF-Y suffit à induire la formation de divisions corticales, apparentées à l'organogénèse nodulaire (**Figure 36B**) (Soyano et al., 2013). En conclusion, cette étude confirme le rôle de NF-YA1 dans le développement nodulaire chez deux légumineuses *M. truncatula* et *L. japonicus*. Enfin, la notion de complexe NF-Y est abordée, même s'il manque encore un troisième partenaire.

3.4.4. Synthèse

Ainsi, il existe à ce jour quatre sous-unités NF-Y dans trois plantes différentes, décrites comme impliquées dans la nodulation. De façon intéressante, les trois types de sous-unités NF-Y sont représentés (NF-YA, NF-YB et NF-YC) (**Tableau 2**). De plus, nous observons des similarités dans les phénotypes associés aux quatre gènes, ils sont tous

impliqués dans le développement nodulaire et pour au moins deux d'entre eux, il existe un phénotype d'infection rhizobienne. D'autre part, excepté dans le cadre de l'étude chez *L. japonicus* où une ébauche de complexe NF-Y apparaît, nous pouvons noter que toutes les sous-unités sont étudiées seules et non sous la forme de complexe trimérique. Enfin, la sous-unité NF-YA1 est retrouvée chez deux légumineuses, impliquées dans le même processus. Ainsi, nous notons une certaine conservation dans le rôle des NF-Y au cours de la symbiose fixatrice d'azote. Par conséquent, nous pouvons formuler l'hypothèse que les orthologues des sous-unités, identifiées dans les différents systèmes, fonctionnent ensemble au sein d'un même complexe symbiotique. Cependant, parmi les légumineuses décrites, *P. vulgaris* et *L. japonicus* présentent des nodules à développement déterminé alors que *M. truncatula* possède des nodules à développement indéterminé. Nous pouvons donc supposer qu'il existe certaines divergences entre ces complexes NF-Y en fonction du type de nodule à former.

4. Projet de thèse

L'équipe de David Barker et Pascal Gamas s'intéresse notamment à la régulation de la transcription au cours de la symbiose fixatrice d'azote entre *M. truncatula* et *S. meliloti*. Dans ce cadre, la caractérisation de *MtNF-YA1* a permis d'identifier un nouveau facteur de transcription impliqué dans l'infection rhizobienne et dans le développement nodulaire (Combiér et al., 2006; Combiér et al., 2008; Laporte et al., 2014). Ces travaux ont soulevé plusieurs points quant au rôle de ce gène lors de la symbiose, qui sont:

- L'analyse de l'expression de *MtNF-YA1* lors des étapes d'infection a révélé une expression de ce gène précoce dès 6 heures après inoculation. Qui plus est, cette expression est dépendante de composants de la voie de signalisation NF (Laporte et al., 2014). Ainsi, est-ce que *MtNF-YA1* joue un rôle précoce au cours des étapes pré-symbiotiques ?
- Le phénotype du mutant *Mtnf-ya1-1* a permis de confirmer les phénotypes de développements nodulaires, déjà observés par la diminution de l'expression de *MtNF-YA1* par approche RNAi. De plus, il a permis de caractériser un nouveau rôle de ce gène au cours de l'infection rhizobienne. Cependant, dans chacune des étapes de ce processus, le mutant *Mtnf-ya1-1*, bien que sévèrement affecté n'est pas bloqué. Ainsi, nous observons toujours une pénétration des bactéries et une organogénèse nodulaire même si elle est réduite dans le mutant, ce qui laisse penser à une redondance fonctionnelle. En effet, les sous-unités NF-Y sont encodées par des familles multigéniques chez les plantes. Chez *M. truncatula*, il existe huit gènes *NF-YA*, dont le gène *MtNF-YA2* qui est très proche de *MtNF-YA1* (Laloum et al., 2013). Est-il possible que *MtNF-YA2* joue un rôle au moins partiellement redondant à *MtNF-YA1* au cours de la symbiose rhizobienne ?
- Comme nous l'avons déjà évoqué, les facteurs transcription NF-Y ne peuvent lier l'ADN que sous une forme trimérique. Par conséquent, *MtNF-YA1* requière au moins une sous-unité NF-YB et une sous-unité NF-YC pour se fixer à l'ADN. Chez les animaux comme chez les plantes, il a été démontré que les complexes NF-Y s'associent avec d'autres régulateurs de transcription pour réguler leurs cibles (Dolfini et al., 2012; Laloum et al., 2013). Nous pouvons

donc nous interroger sur la composition des complexes protéiques formés autour de MtNF-YA1 au cours de la symbiose rhizobienne ?

Mon projet de thèse vise à répondre à ces questionnements et s'inscrit dans la continuité du travail de Tom Laloum, un ancien étudiant en thèse du groupe. Durant son stage de master, cet étudiant a initié la caractérisation des complexes NF-Y, formés autour de MtNF-YA1 au cours de la symbiose fixatrice d'azote. Par la suite, il s'est intéressé à l'implication de MtNF-YA1 et de son homologue proche MtNF-YA2 au cours de la signalisation NF. Au cours de mon doctorat, je me suis impliqué dans ces deux thématiques avec un accent porté sur la caractérisation des complexes NF-Y, qui constitue mon projet principal.

Au début de ma thèse, en octobre 2011, seules deux sous-unités NF-Y possédant un rôle dans la symbiose rhizobienne avaient été décrites: *MtNF-YA1* et *PvNF-YC1* (Combiér et al., 2006; Combiér et al., 2008; Zanetti et al., 2010). Chacune de ces sous-unités avait été étudiée seule et non dans un contexte de complexe NF-Y. Ainsi, au sein de l'équipe une recherche de protéines, interagissant avec MtNF-YA1, a été initiée afin de tenter de mieux comprendre le rôle de MtNF-YA1 au sein d'un complexe multi-protéique. Ce premier crible double hybride a permis l'identification de deux sous-unités NF-YC qui interagissent avec MtNF-YA1. Cette identification a servi de base pour mon projet de thèse. En associant des approches d'interactions protéine/protéine sans *a priori* avec des études mécanistiques et fonctionnelles, nous avons caractérisé des complexes NF-Y impliqués dans la symbiose rhizobienne. Dans la continuité de ce travail, nous avons souhaité étudier au-delà du complexe NF-Y et chercher d'autres partenaires protéiques impliqués dans la symbiose rhizobienne. L'identification de deux protéines TIFY (ou JAZ) a ainsi constitué une piste de travail intéressante. Enfin, je me suis aussi impliqué dans le projet de la caractérisation de la redondance fonctionnelle entre *MtNF-YA1* et *MtNF-YA2* au cours des étapes précoces de la symbiose rhizobienne.

Dans une logique de travail, nous détaillerons dans un premier temps les résultats obtenus sur la redondance fonctionnelle entre *MtNF-YA1* et *MtNF-YA2*, avant de nous intéresser aux approches d'interactions protéine/protéine. La première partie des résultats sera présentée sous la forme d'un article scientifique, récemment accepté à la publication dans "The Plant Journal". La deuxième partie consistera en la caractérisation des

complexes NF-Y impliqués dans la symbiose rhizobienne. Cette partie sera également rédigée sous la forme d'un article scientifique, dans la perspective d'une soumission à la publication en 2014. Enfin, la troisième partie des résultats résumera le travail fourni dans la caractérisation des protéines "non NF-Y", principalement sur les protéines TIFY. D'autre part, au cours de ma thèse, j'ai eu une implication plus mineure dans deux articles scientifiques récemment publiés, qui seront présentés dans les annexes.

CHAPITRE II: RESULTATS

1. Redondance fonctionnelle entre MtNF-YA1 et MtNF-YA2 pour le contrôle des étapes précoces de la symbiose rhizobienne

1.1. Introduction et résumé de l'article

Chez les plantes, la famille des facteurs de transcription NF-Y présente une certaine diversité structurale puisque chaque type de sous-unité est encodée par une dizaine de gènes (Laloum et al., 2013). Cette diversité crée un système modulaire permettant aux sous-unités végétales d'être impliquées dans des processus très divers, mais occasionne aussi une redondance fonctionnelle entre les gènes. Plusieurs études font états de cette redondance, notamment dans le contrôle de l'embryogénèse (Yamamoto et al., 2009) mais aussi de la floraison (Kumimoto et al., 2010) chez *A. thaliana*. Dans le cadre de *Mtnf-ya1-1*, le phénotype partiel, moins tranché que celui d'autres mutants de facteurs de transcription précoces tel que *nsp1*, *nsp2* ou *ern1*, laisse penser à ce type de redondance. De plus, chez *M. truncatula* il existe une sous-unité NF-YA très proche de MtNF-YA1, appelée MtNF-YA2 (Laloum et al., 2013). Ainsi la première partie de l'article consiste en l'analyse fine du profil d'expression de *MtNF-YA1* et *MtNF-YA2* démontrant que *MtNF-YA2* est bien exprimé dans les bons tissus au cours du processus symbiotique et qu'il peut donc y tenir un rôle. Cette analyse conforte aussi l'hypothèse du rôle précoce de ces gènes, en montrant une induction de *MtNF-YA1* dès quatre heures après un traitement NF dans l'épiderme racinaire. Afin d'observer si *MtNF-YA2* possède en effet la capacité de suppléer *MtNF-YA1* lorsque ce dernier est muté, nous avons réalisé plusieurs analyses fonctionnelles. Premièrement, suite à la récente description du rôle de MtNF-YA1 dans l'infection rhizobienne (Laporte et al., 2014), nous avons procédé à une diminution de l'expression de *MtNF-YA2* par RNAi dans le mutant *Mtnf-ya1-1* et mesuré un effet quantitatif et qualitatif sur l'infection rhizobienne. En parallèle, une approche de RNAi globale touchant à la fois *MtNF-YA1* et *MtNF-YA2* a mis en évidence un phénotype fort de développement nodulaire, en réduisant significativement le nombre de nodosités formées. Les profils d'expression de ces deux gènes suggérant aussi un rôle au cours de la signalisation NF, nous avons testé l'effet du double RNAi sur l'induction de nodulines précoces par les NF. Ainsi, nous avons démontré que les inductions de *ERN1* et *ENOD11* mais pas *NSP1* étaient fortement affectées après un traitement NF de quatre heures. De façon intéressante, cet effet

n'est pas observé dans un RNAi ne ciblant que *MtNF-YA2* ou dans le mutant simple *Mtnf-ya1-1*. Cette observation confirme le rôle précoce de ces deux gènes dans la voie de signalisation NF, probablement en amont d'*ERN1* et en aval ou en parallèle du dimère NSP. Afin de vérifier que les sous-unités MtNF-YA1 et MtNF-YA2 possédaient bien une activité transcriptionnelle au cours de la signalisation NF, nous avons mesuré l'effet de la surexpression de ces gènes sur *ENOD11*. L'utilisation de lignées portant la construction *pENOD11:GUS* croisées avec les mutants *ern1*, *nsp1* et *dmi3* (Journet et al., 2001; Cerri et al., 2012) a permis de démontrer que MtNF-YA1 est capable d'activer le promoteur de *ENOD11*, mais de façon dépendante de *ERN1* et *NSP1*. Nous savons qu'au cours de la voie de signalisation NF, le dimère NSP1 et NSP2 active la transcription d'*ERN1* qui va lui-même activer *ENOD11*. Nous avons donc testé l'hypothèse selon laquelle MtNF-YA1 et MtNF-YA2 activent le promoteur d'*ERN1*, en parallèle ou de façon synergique au dimère NSP. Pour cela, nous avons combiné des approches de transactivation chez *N. benthamiana* et de CHIP-qPCR chez *M. truncatula*. Ainsi, nous avons démontré que ces facteurs de transcription se lient directement à la boîte CCAAT située à -423pb dans le promoteur de *ERN1* et qu'ils activent la transcription de ce gène, probablement de façon synergique à NSP1 et NSP2.

Two CCAAT-box-binding transcription factors redundantly regulate early steps of the legume-rhizobia endosymbiosis

Tom Laloum^{1,2,†,‡}, Maël Baudin^{1,2,†}, Lisa Frances^{1,2}, Agnes Lepage^{1,2}, Benjamin Billault-Penneteau^{1,2}, Marion R. Cerri^{1,2,§}, Federico Ariel³, Marie-Françoise Jardinaud^{1,2,4}, Pascal Gamas^{1,2}, Fernanda de Carvalho-Niebel^{1,2} and Andreas Niebel^{1,2,*}

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

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

³Centre National de la Recherche Scientifique, Institut des Sciences du Végétal, F-91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France,

and ⁴ENSAT, INPT-Université de Toulouse, Avenue de l'Agrobiopole, Auzeville-Tolosane, 31326 Castanet-Tolosan, France

Received 10 February 2014; revised 30 April 2014; accepted 2 June 2014.

*For correspondence (e-mail andreas.niebel@toulouse.inra.fr).

†These authors contributed equally to this work.

‡Present address: Faculty of Biology, Technion, Haifa, Israel.

§Present address: Faculty of Biology, Genetics, University of Munich (LMU), D-82152 Martinsried, Germany.

SUMMARY

During endosymbiotic interactions between legume plants and nitrogen-fixing rhizobia, successful root infection by bacteria and nodule organogenesis requires the perception and transduction of bacterial lipo-chitooligosaccharidic signal called Nod factor (NF). NF perception in legume roots leads to the activation of an early signaling pathway and of a set of symbiotic genes which is controlled by specific early transcription factors (TFs) including CYCLOPS/IPD3, NSP1, NSP2, ERN1 and NIN. In this study, we bring convincing evidence that the *Medicago truncatula* CCAAT-box-binding *NF-YA1* TF, previously associated with later stages of rhizobial infection and nodule meristem formation is, together with its closest homolog *NF-YA2*, also an essential positive regulator of the NF-signaling pathway. Here we show that *NF-YA1* and *NF-YA2* are both expressed in epidermal cells responding to NFs and their knock-down by reverse genetic approaches severely affects the NF-induced expression of symbiotic genes and rhizobial infection. Further over-expression, transactivation and ChIP-PCR approaches indicate that *NF-YA1* and *NF-YA2* function, at least in part, via the direct activation of *ERN1*. We thus propose a model in which *NF-YA1* and *NF-YA2* appear as early symbiotic regulators acting downstream of *DMI3* and *NIN* and possibly within the same regulatory complexes as NSP1/2 to directly activate the expression of *ERN1*.

Keywords: transcription factor, nuclear factor Y, legume–rhizobium symbiosis, Nod factor signaling, CCAAT box-binding factor, *Medicago truncatula*.

INTRODUCTION

Legume plants are able to establish root symbioses with soil microorganisms to improve nutrient acquisition. The root endosymbiotic association between legumes and soil bacteria known as rhizobia leads to the formation of root nodules in which the differentiated bacteria convert atmospheric nitrogen into a form that can be assimilated by the host plant in exchange for photosynthates. Nodulation is generally initiated within a specific 'susceptible' root zone close to the root tip, where initial bacteria–host recognition takes place. In temperate legumes such as *Medicago truncatula*, local remodeling of the cell wall and plasma membrane of susceptible root hairs (RHs) leads to the formation of tubular structures called infection threads (ITs) through which bacteria reach the inner root cortical cell layers

(Oldroyd and Downie, 2008). Coincident with infection, cell divisions are activated in root cortical cells that are located beneath the growing ITs, leading to nodule organogenesis. These concomitant processes require a bacteria–plant molecular dialogue in which secreted rhizobial lipo-chitooligosaccharide molecules called Nod Factors (NFs) play a key role (Oldroyd, 2013). Studies conducted with different model legumes have shown that NFs activate a particular signaling pathway that ultimately results in characteristic nuclear-associated calcium oscillations (Sieberer *et al.*, 2009; Capoen *et al.*, 2011). Within the nucleus, this sustained calcium spiking is decoded by a calcium and calmodulin-dependent kinase called CCaMK or DMI3 in *M. truncatula*. CCaMK then phosphorylates

CYCLOPS/IPD3 (Yano *et al.*, 2008) that has recently been shown to function as a transcriptional regulator in *Lotus japonicus* (*L. japonicus*) (Singh *et al.*, 2014). CYCLOPS, together with other TFs belonging to the GRAS (NSP1 and NSP2) (Kalo *et al.*, 2005; Smit *et al.*, 2005), ERF (ERN1) (Andriankaja *et al.*, 2007; Middleton *et al.*, 2007; Cerri *et al.*, 2012), and NIN (Marsh *et al.*, 2007) families are reported to act downstream of CCaMK/DMI3 to modulate early symbiotic gene expression. In the case of *Medicago truncatula*, NSP1/NSP2 and ERN1 have been implicated in the epidermis-specific transcriptional activation of the well characterized *ENOD11* marker gene, encoding a proline-rich cell-wall associated protein (Journet *et al.*, 2001; Boisson-Dernier *et al.*, 2005). While NSP1 binds to the promoter of *ERN1* and together with NSP2 positively regulates *ERN1*, ERN1 in turn directly regulates the transcription of *ENOD11* in RHs responding to NFs (Hirsch *et al.*, 2009; Cerri *et al.*, 2012). Several members of the Nuclear Factor Y (NF-Y) family involved in the legume rhizobium interaction have also been identified and studied (Combiér *et al.*, 2006, 2008; Zanetti *et al.*, 2010; Soyano *et al.*, 2013; Laporte *et al.*, 2014). NF-Y is a CCAAT-box-binding heterotrimeric TF complex composed of three distinct proteins called NF-YA, NF-YB and NF-YC (Mantovani, 1999), and encoded in plants by small multigenic families of approximately 10 members (Laloum *et al.*, 2013). In common bean a positive role during nodule organogenesis and rhizobial infection has been described for one NF-YC member called *PvNF-YC1* (Zanetti *et al.*, 2010). In *L. japonicus*, *LjNF-YA1* and *LjNF-YB1* have been shown to play an important role during nodule organogenesis by promoting and/or stimulating cortical cell divisions under the direct control of the NIN TF (Soyano *et al.*, 2013). Initially discovered as a gene strongly upregulated during nodule organogenesis (El-Yahyaoui *et al.*, 2004; Moreau *et al.*, 2011), the *M. truncatula* *NF-YA1* (formerly called *HAP2-1*) has been shown to regulate nodule meristem function and persistence (Combiér *et al.*, 2006, 2008) and more recently also progression of rhizobial infection (Laporte *et al.*, 2014). In addition, *NF-YA1* expression was shown to be upregulated also prior to rhizobial infection, as early as 6 h post-inoculation, suggesting a potential role also during early signaling stages preceding rhizobial infection (Laporte *et al.*, 2014). However, a null mutant of *NF-YA1* has a less severe infection and nodule organogenesis phenotype as compared with that described for plants mutated in other NF-signaling genes (Combiér *et al.*, 2006; Laporte *et al.*, 2014). We now show that this can be explained by the presence of the closely related *NF-YA2* TF gene (Laloum *et al.*, 2013), whose activity is partly redundant with *NF-YA1*. Indeed, the specific knock-down of both *NF-YA1* and *NF-YA2* strongly impairs NF-dependent signaling as well as the initiation of infection in *M. truncatula* RHs. We also demonstrate that *NF-YA1*, together with *NF-YA2*, control *ENOD11* expression by directly and positively regulating the transcription of *ERN1*.

RESULTS

The closely related *NF-YA1* and *NF-YA2* genes show overlapping expression patterns during early and late stages of nodulation

As shown by a phylogenetic analysis of plant NF-YA proteins the *M. truncatula*, *NF-YA1* and *NF-YA2* belong to the same subgroup of root- and nodule-expressed genes together with other plant NF-YAs (Laloum *et al.*, 2013; Soyano *et al.*, 2013). The *NF-YA1* and *NF-YA2* proteins display more than 70% of overall protein sequence identity, and share highly conserved DNA-binding and subunit-assembly domains (100 and 90.5% of identity, respectively) (Figure S1). Using RNA sequencing from laser micro-dissected nodule tissues (Roux *et al.*, 2014), we have shown that *NF-YA1* and *NF-YA2* transcripts both exhibit a similar expression gradient from proximal to apical nodule tissues, where the highest transcript levels are found (Figure 1a,b). However, while transcripts of both TFs are detected at high levels in nodules, only *NF-YA2* is well expressed in nitrogen-starved roots in the absence of bacterial inoculation (Figure 1a,b).

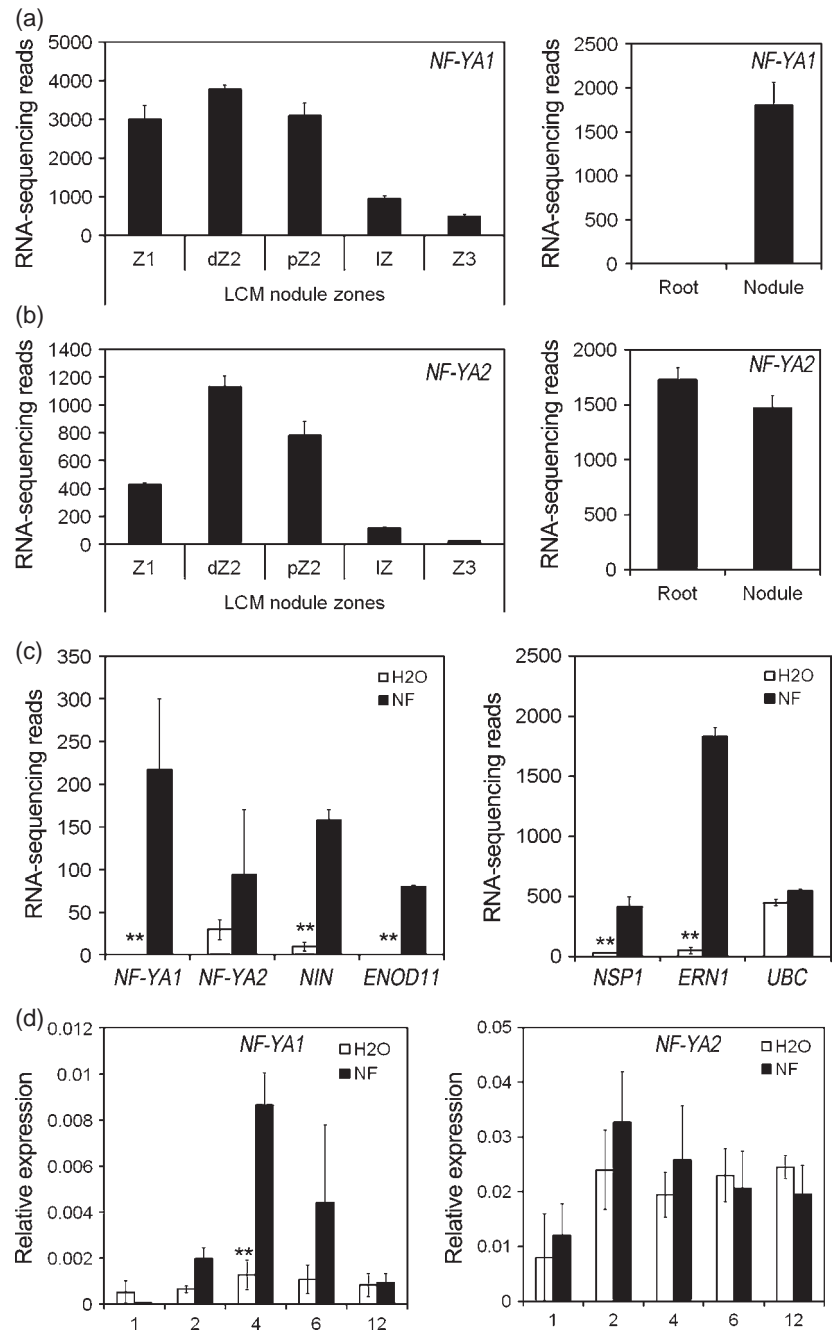
We have recently shown that *NF-YA1* expression in rhizobium-inoculated roots depends upon a functional NF-perception and signaling machinery (Laporte *et al.*, 2014). To evaluate whether *NF-YA1* and *NF-YA2* were also expressed during the earliest stages of NF signaling in roots, we thus analyzed their transcript levels in roots in response to NF treatments. RNA-seq analysis of laser-dissected root epidermal tissues of the pre-infection zone, 24 h after treatment with NFs, showed that *NF-YA1* transcripts were strongly upregulated, together with the known epidermal NF markers *NSP1*, *ERN1*, *ENOD11* and the NF-responsive TF gene *NIN*, while the increase of *NF-YA2* transcript levels was not statistically significant due to high variability (Figure 1c). Experiments using promoter-GUS lines confirmed expression of *NF-YA1* and *NF-YA2* in RHs of NF-treated roots (Figure S2). While symbiotic expression of *NF-YA1* was specific to RHs, *NF-YA2* expression was also detected in cortical and vascular tissues. Time course experiments further showed that the upregulation of *NF-YA1* by NFs could be detected by qRT-PCR in entire roots as early as 2 h after treatment and was maximal after 4 h, while *NF-YA2* expression remained more or less constant (Figure 1d). Given the high level of identity for the two encoded proteins and the partially overlapping expression patterns of *NF-YA1* and *NF-YA2* we hypothesized that these two genes could play sequential and partially overlapping roles during nodulation.

NF-YA1 and *NF-YA2* play partially overlapping roles in the regulation of rhizobial infection and nodulation

In a previous study, we showed that IT progression is severely altered in the *nf-ya1-1* null mutant (Laporte *et al.*,

Figure 1. Expression profile of *NF-YA1* and *NF-YA2* in root and nodule tissues.

(a, b) Expression analysis of *NF-YA1* (a) and *NF-YA2* (b) using RNA-Seq in entire organs or following laser microdissection. DESEQ-normalized RNA-Seq values from three biological repetitions are shown. Fourteen-day-old laser-dissected nodule zones correspond to the meristematic zone (Z1), apical and distal infection zone (dZ2 and pZ2), nodule interzone (IZ) and the nitrogen-fixing zone (Z3). Root and Nodule samples represent entire organs collected 10 dpi. (c) Expression analysis of *NF-YA1* and *NF-YA2* and other NF-signaling genes (*NIN*, *ENOD11*, *NSP1* and *ERN1*) using RNA-Seq in laser-dissected root epidermal cells following mock (white boxes) or 24-h NF treatment (black boxes). The expression of the reference ubiquitin (*UBC*) gene is also indicated. Error bars represent the standard error (SE). Significant mean differences were detected using negative binomial tests ($P \leq 0.01$). (d) Time course expression analysis by qRT-PCR of *NF-YA1* and *NF-YA2* in entire roots after 1, 2, 4, 6 and 12 h of NF (black boxes) or mock (white boxes) treatments. Error bars represent SE from the average of three biological repeats. Significant mean differences were detected using a Wilcoxon test ($P \leq 0.05$).



2014). Nevertheless, some ITs still succeed in penetrating into more internal root tissues and nodule organogenesis is initiated. In order to evaluate whether this partial phenotype could be due to the presence of *NF-YA2*, we knocked down the expression of *NF-YA2* in the *nf-ya1-1* mutant using an *NF-YA2*-specific RNAi construct whose specificity was confirmed by qRT-PCR (Figure S3a). While no clear symbiotic phenotype was observed in wild-type (A17) plants transformed with the *NF-YA2*-specific RNAi construct (WT/*NF-YA2*-RNAi composite plants), a drastic effect was observed in *nf-ya1-1* transformed roots carrying

the *NF-YA2*-specific RNAi construct (*nf-ya1-1/NF-YA2* RNAi plants) (Figure 2a–d), which was clearly more pronounced than those observed in the single *nf-ya1-1* null mutant. Indeed only few ITs were formed in *nf-ya1-1/NF-YA2* RNAi roots, and were mostly arrested in infection foci in curled RHs, which strongly affected the ability of these *nf-ya1-1/NF-YA2* RNAi roots to form mature nodules, as compared with control roots. In order to quantify these observations, we compared the number of ITs that reached the root cortex with the number of abortive ITs in RHs. We observed a higher proportion of arrested ITs in *nf-ya1-1* (72%) (Figure 2d)

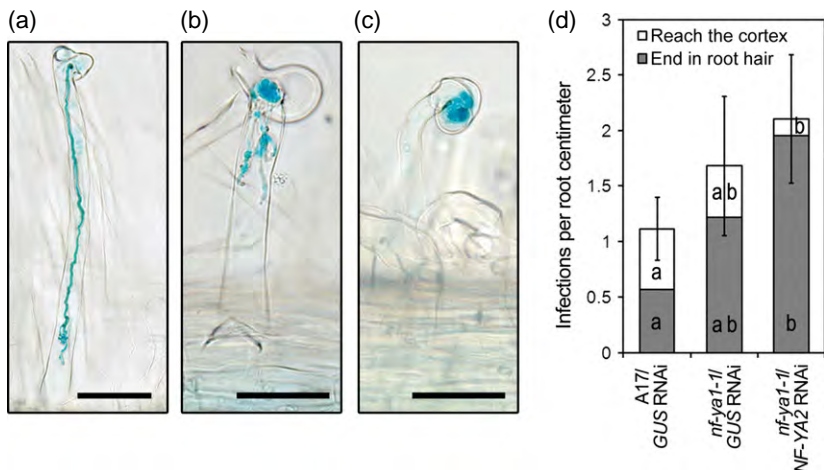


Figure 2. Infection thread phenotypes of *NF-YA*-silenced roots.

(a-c) Predominant IT phenotype in control plants (WT *GUS* RNAi) (a), in the single null mutant *nf-ya1-1* (b) and in *nf-ya1-1* expressing a *NF-YA2* RNAi construct (c). Observations were made 6 days after inoculation (dai) using a *LacZ*-expressing *S. meliloti* strain (blue). Bars = 50 μ m.

(d) Histograms representing the number of ITs that reach the cortex (white) or end in RHs (grey). Error bars correspond to the confidence interval ($\alpha = 0.05$) for the total amount of infection per cm of root. Groups were set following a Kruskal–Wallis test ($P \leq 0.05$).

compared with control roots (51%) and an even higher proportion in the *nf-ya1-1/NF-YA2-RNAi* roots, in which almost all infections were arrested in RHs (93%) (Figure 2d). As a complementary means to confirm the redundant roles of *NF-YA1* and *NF-YA2* during nodulation, we designed an RNAi construct, termed *NF-YA* RNAi, strongly reducing the expression of both *NF-YA1* and *NF-YA2*, while the expression of the other *NF-YA* genes was not affected with the exception of *NF-YA6*, for which a slight but significant reduction was observed (Figure S3b). As expected, the nodulation of *NF-YA* RNAi composite plants was severely impaired. Most ITs of RNAi composite plants were arrested early in infection foci formed in curled RHs (Figure S4). Sixteen days post-inoculation, 50% of *NF-YA* RNAi plants failed to develop nodules, in contrast with control plants. When *NF-YA* RNAi plants did develop nodules, only 2 ± 1 nodules were detected per plant at 16 dpi, compared with 9 ± 1.5 nodules in control plants (Figure S4c). Taken together, these data indicate that *NF-YA1* and *NF-YA2* can redundantly contribute to the regulation of rhizobial infection and nodulation in *M. truncatula*.

NF-YA1 and NF-YA2 both regulate *ERN1* and *ENOD11* expression in response to NFs

In order to evaluate to what extent *NF-YA1* and *NF-YA2* have redundant functions during pre-infection stages, we measured expression levels of the known NF-signaling genes *NSP1*, *ERN1* and *ENOD11* in root samples of control and *NF-YA* RNAi plants after 4 h of NF treatment. While the expression of *NSP1* was still upregulated by NFs in *NF-YA* RNAi roots, the upregulation of both *ERN1* and *ENOD11* were significantly reduced (Figure 3). Indeed this effect was striking as compared with that observed in the single mutant *nf-ya1-1*, for which there was no difference in *ENOD11* and *ERN1* upregulation by NFs (Figure S5a). As for infection/nodulation, no effect on *ENOD11/ERN1* upregulation was observed in *NF-YA2* RNAi roots (Figure S5b,c). These results suggest that *NF-YA1* and *NF-YA2* are both involved in NF-induced expression of *ERN1* and *ENOD11* but not of *NSP1* and that they may act upstream of *ERN1* to regulate its expression during early steps of the NF response.

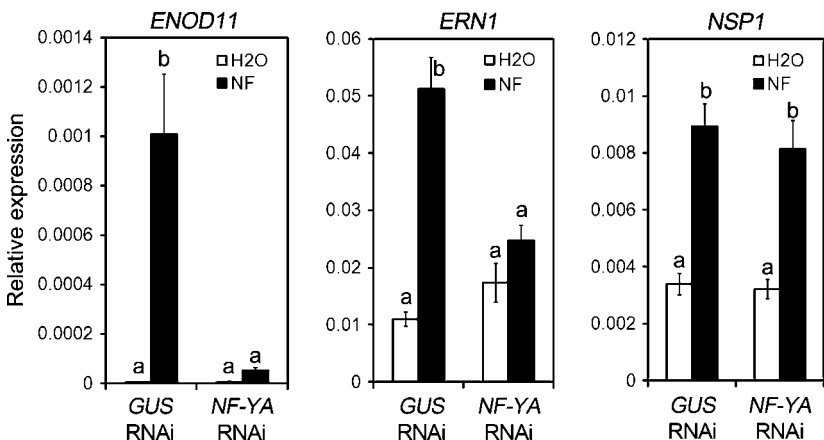


Figure 3. *NF-YA1* and *NF-YA2* are both required for NF-induced expression of *ENOD11*, *ERN1* but not *NSP1*.

qRT-PCR analysis of *ENOD11*, *ERN1* and *NSP1* expression in H2O (white boxes) or NF-treated (black boxes) transgenic roots expressing a *GUS* RNAi (control) or *NF-YA* RNAi construct, silencing both *NF-YA1/2*. Groups were set following a Kruskal–Wallis test ($P \leq 0.05$).

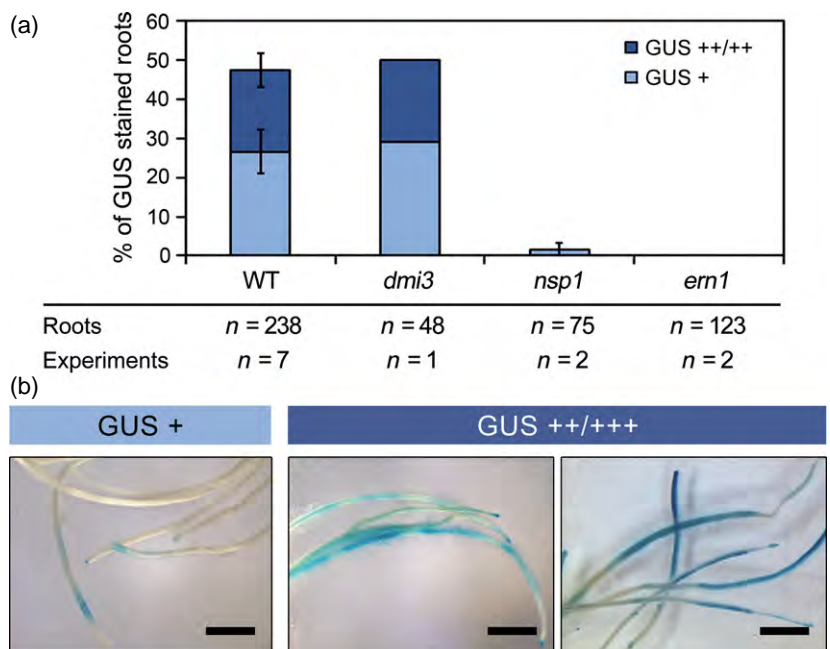
To investigate whether the expression patterns of *NF-YA1* and *NF-YA2* are consistent with putative roles upstream of *ERN1* during NF signaling, their expression profiles were analyzed in *M. truncatula* lines carrying mutations in major NF-signaling genes positioned upstream of *ERN1*. Our results showed that the expression of *NF-YA1* was induced in WT (A17), *nsp1* and *ern1* roots 4 h after NF treatment, while this induction was abolished in the *dmi3* and *nin* mutant backgrounds (Figure S6b). On the other hand, the expression of *NF-YA2* was not significantly upregulated in the different genotypes (Figure S6a). This indicates that *NF-YA1* (but not *NF-YA2*) expression is dependent on DMI3 and NIN. However, the fact that NF-induction of *NF-YA1* is not dependent on either *NSP1* or *ERN1* implies a potential role of *NF-YA1* either upstream of these two regulators or in a parallel pathway. When we checked the NF-induced expression of *ENOD11* in the same mutant backgrounds we confirmed that, as expected, *ENOD11* expression depends upon *DMI3* and also upon *NSP1* and *ERN1*. In the *nin* mutant background the decrease in *ENOD11* expression is however not statistically significant, possibly as the result of the constitutive expression of *NF-YA2* in roots (Figure S6c). Taken together these results suggest that *NF-YA1* and *NF-YA2* can both regulate redundantly NF-induced expression of *ERN1* and *ENOD11* and that *NF-YA1* but not *NF-YA2* acts downstream of *DMI3* and *NIN* and independently of *NSP1*.

The NF-YA1 and NF-YA2 TFs activate *ENOD11* expression via *ERN1* in *Medicago truncatula* roots

Our previous analyses using *NF-YA* RNAi constructs suggested that *NF-YA1/2* are acting upstream of *ERN1* and

ENOD11 in the NF-signaling pathway (Figure 3). *ERN1* acts as a positive regulator of *ENOD11* and is able to mimic the NF-elicited *ENOD11* response in non-symbiotic conditions when over-expressed in transgenic roots under the control of the 35S constitutive promoter (Andriankaja *et al.*, 2007; Cerri *et al.*, 2012). To evaluate whether NF-YA TFs indeed act upstream *ERN1* and *ENOD11* during NF signaling, we addressed the question of whether *NF-YA1* over-expression was also able to activate the transcription of a 2.3-kb *pENOD11:GUS* fusion in transgenic roots. Using the same approach as for *ERN1* (Cerri *et al.*, 2012) we showed that a high proportion of *NF-YA1*-over-expressing roots displayed a clear activation of the *pENOD11:GUS* fusion in epidermal root tissues in the absence of symbiotic treatment (Figure 4). Similar results were obtained by over-expressing *NF-YA2* (Figure S7). These results suggest that over-expression of NF-YA TFs is able to mimic NF-elicited activation of the *pENOD11:GUS* fusion in root epidermal cells as previously demonstrated for *ERN1*. To evaluate whether the activation of the *pENOD11:GUS* fusion by *NF-YA1* over-expression is dependent on the presence of *ERN1* we decided to conduct the same experiments in the *ern1* mutant background. As shown in Figure 4a *NF-YA1* over-expression was no longer able to activate *ENOD11* expression in this mutant background, providing evidence that *NF-YA1* acts upstream of *ERN1* to activate the expression of *pENOD11:GUS* fusion in transgenic roots. Similar results were observed in the *nsp1* mutant background (Figure 4), in which *NF-YA1* upregulation by NFs is however normal (Figure 3b). Taken together, these results indicate that constitutive expression of *NF-YA1* or *NF-YA2* can bypass the early NF-signal transduction leading to the

Figure 4. NF-independent transactivation of *ENOD11* expression in *M. truncatula* roots. Transgenic *M. truncatula* roots carrying a *p35S: NF-YA1* construct were generated following *A. rhizogenes* transformation of stable *M. truncatula* lines (wild-type A17, *dmi3*, *nsp1* or *ern1*) carrying the *pENOD11:GUS* fusion. Transgenic roots expressing *NF-YA1* showed significant activation of the *pENOD11:GUS* fusion in root epidermal cells only in A17 and in *dmi3* mutant backgrounds. (a) The relative intensity of GUS staining of roots from independent composite plants (*n*) were visually annotated and represented in (a) as the percentage of composite plants showing moderate (GUS+, light blue bars) to strong/very strong (GUS+/+++, dark blue bars) stained roots after 4 h of the GUS reaction as illustrated in (b). Bar = 1 cm.



activation of *ENOD11* via an *ERN1*-and potentially *NSP1*-dependent pathway.

NF-YA1 is a direct positive regulator of *ERN1*

Studies in both animals and plants have shown that the NF-YA TF subunit is localized in the nucleus. Using NF-YA1 N-terminally-tagged by YFP, we have been able to show that NF-YA1 also displays a strict nuclear localization consistent with its predicted role as a CCAAT-box binding TF (Figure S8a-c). To evaluate whether NF-YA1 can act as a direct transcriptional activator of *ERN1* and *ENOD11* we performed transactivation assays in *Nicotiana benthamiana* cells. *ENOD11* transcription was previously shown to be under the control of two distinct promoter regulatory units conferring expression either in RHs responding to NFs or at rhizobial infection sites (Boisson-Dernier *et al.*, 2005). Despite the fact that the NF-YA1 protein is expressed in *N. benthamiana* leaves, none of the *pENOD11*-derived transcriptional fusions was activated by NF-YA1, while the *4xNFbox-p35Smin:GUS* and the *INF-GUS* fusion constructs were in turn respectively activated by *ERN1* and *NSP1/NSP2*, in line with previously published data (Figure S9a,b) (Cerri *et al.*, 2012). This suggests that NF-YA1 is not able to directly activate the transcription of *ENOD11* target sequences. We then tested the ability of NF-YA1 to activate the transcription of a 2.3-kb *pERN1:GUS* reporter construct shown before to be sufficient for conferring symbiotic expression in *M. truncatula* (Cerri *et al.*, 2012). In comparison to control samples, an almost 10-fold increase of the GUS activity level was observed when *NF-YA1* was co-infiltrated with this construct (Figures 5a and S8d,e). This transactivation was also observed in the presence of *NF-YA2* (Figure S10) and was lost when using a mutated version of NF-YA1, impaired in DNA recognition (Figures 5a and S8 g,h), as described in Mantovani *et al.* (1994). These data therefore indicate that NF-YA1 and NF-YA2 can positively regulate the transcription of *ERN1*. However, *ERN1* can also be transcriptionally regulated by the *NSP1/NSP2* heterodimer (Cerri *et al.*, 2012). We thus examined whether the co-expression of *NSP1* and *NSP2* together with *NF-YA1* would influence the transcriptional activation of *ERN1*. Interestingly, such co-expression led to a significant increase in *pERN1:GUS* transcriptional activation levels when compared with *NF-YA1**, a mutated NF-YA1 version comprising a substitution of the conserved RGE tripeptide by an AAA triplet in the DNA-binding domain or YFP control samples (Figure 5d). This suggests that NF-YA1 could act synergistically with the *NSP1/NSP2* complex to activate *ERN1* transcription.

A detailed inspection of the *ERN1* promoter revealed six putative CCAAT motifs in a region of 1.4 Kb upstream of the Transcription start site (TSS), which are either overlapping or in the neighborhood of several putative *NSP1* binding sites (Hirsch *et al.*, 2009) (Figures S11 and 5c). In order

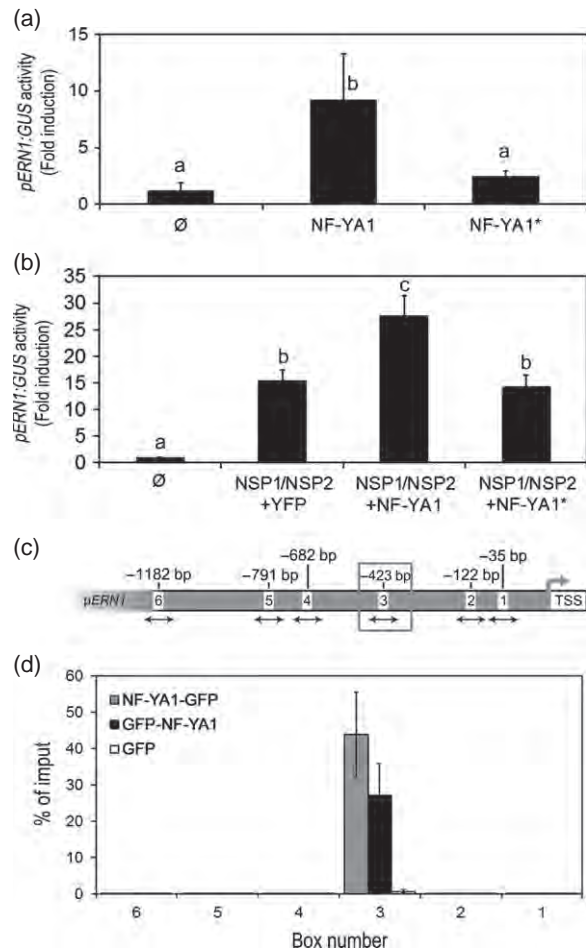


Figure 5. *ERN1* is a direct target of NF-YA1.

(a, b) Transactivation assays of *pERN1:GUS*. Transcription activation assays were performed in *N. benthamiana* epidermal cells by agroinfiltration of a *pERN1:GUS* transcriptional fusion in combination with a number of 3xHA-tagged protein constructs. Fluorimetric GUS activity was measured in *N. benthamiana* leaf discs after agroinfiltration of *pERN1:GUS* alone (Ø), or in combination with NF-YA1 or NF-YA1*, a mutated NF-YA1 version comprising a substitution of the conserved RGE tripeptide by an AAA triplet in the DNA-binding domain (Figure S8). Fluorimetric GUS activity driven by the *pERN1:GUS* fusion was also measured in *N. benthamiana* leaf discs co-expressing *NSP1* and *NSP2* together with a control YFP protein or an active (NF-YA1) or inactive (NF-YA1*) form of NF-YA1 (b). Data are represented as fold induction in relation to control (Ø) samples. Error bars correspond to the standard error (SE) of mean GUS activity values derived from 10 to 20 individual samples from three independent experiments. Groups a, b and c were set following a Kruskal–Wallis test ($P \leq 0.05$).

(c) Schematic representation of CCAAT-boxes found in 1.4 kb sequences of *ERN1* upstream of the Transcription Start Site (TSS). The CCAAT-boxes are numbered as 1–6, and their respective distances from the TSS are indicated. Arrows indicate the DNA region amplified by qPCR in the genomic input DNA or in NF-YA1-co-precipitated samples. The preferentially bound box no. 3 is highlighted by a grey box.

(d) ChIP-qPCR analysis of NF-YA1 binding to the *ERN1* promoter. Transgenic roots expressing *NF-YA1-GFP* (black boxes) or *GFP-NF-YA1* (grey boxes) as well as the *GFP* alone (negative control, white boxes) under the control of the 35S promoter were generated and used in ChIP experiments using anti-GFP antibodies. qPCR was performed using primers surrounding the six CCAAT-boxes present in the promoter of *ERN1* (c). IP values were normalized against those obtained using input genomic DNA. Values represent the average value calculated from two biological repeats and error bars correspond to the standard error (SE) of the mean percentage of input.

to investigate whether NF-YA1 can directly interact *in vivo* with one of these putative CCAAT-binding motifs, we performed ChIP followed by real-time quantitative PCR (ChIP-qPCR) experiments. Transgenic *M. truncatula* roots over-expressing either GFP alone (negative control) or N- and C-terminal GFP-tagged NF-YA1 proteins were generated. In young nodulated roots (4 dpi), qPCR amplification of the DNA regions surrounding the six CCAAT-boxes detected a strong enrichment of co-precipitated box 3 DNA fragments for both N- and C-terminal NF-YA1 GFP fusion expressing roots, but not in the GFP control (Figure 5d). This result strongly suggests that NF-YA1 specifically binds to the third CCAAT-box located 423 bp upstream of the transcription start site (TSS) of *ERN1*, and provides additional evidence that NF-YA1 and NF-YA2 are both direct positive regulators of *ERN1* expression.

DISCUSSION

Despite the symbiotic expression of *NF-YA1* associated with early NF-signaling pre-infection events (Laporte *et al.*, 2014), a null *nf-ya1-1* mutant is less severely affected during nodulation than previously described mutants of other TFs regulating early symbiotic steps such as *nin*, *nsp1*, *nsp2* or *ern1* (Kalo *et al.*, 2005; Smit *et al.*, 2005; Marsh *et al.*, 2007; Middleton *et al.*, 2007). Here we show that this is most likely due to the existence of the closely related *NF-YA2* that is redundant with *NF-YA1* during NF signaling and rhizobial infection.

Functional overlap between *NF-YA1* and *NF-YA2* was demonstrated by the use of two complementary RNAi strategies to knock down the expression of both TFs. These strategies similarly led to a specific reduction in the expression of both TFs and, as a consequence, to a more severe symbiotic phenotype than observed with the single *nf-ya1-1* mutant (Laporte *et al.*, 2014). Firstly, a much higher proportion of arrested ITs were unable to reach the root cortex, and secondly most infection events were blocked at the microcolony stage before ITs are initiated. This therefore suggests a potential role for *NF-YA1/2* in the initiation of rhizobial infection. Finally, nodule formation was also much more severely impaired.

This enhanced symbiotic phenotype is associated with the specific knock down of both *NF-YA1* and *NF-YA2* genes. The expression of all the remaining *NF-YA*-related genes, with the exception of *NF-YA6*, was not affected by this RNAi knock-down (Figure S3a). However *NF-YA6* transcript levels were not reduced when using the *NF-YA2* RNAi construct in conjunction with the *nf-ya1-1* mutant (Figure S3a,b), and in addition, *NF-YA6* is significantly less expressed in comparison to *NF-YA1* and *NF-YA2* during nodulation (Roux *et al.*, 2014). Even if both *NF-YA1* and *NF-YA2* play redundant roles during initial signaling and infection steps of nodulation, the pronounced nodulation phenotype of the single *nf-ya1-1* mutant leads us to

propose that *NF-YA1*, which is highly and more specifically expressed during rhizobial symbiosis, plays the primary role during nodulation. Nevertheless, the basal expression level of *NF-YA2* in roots and RHs prior to infection is consistent with a possible role for this gene prior to *NF-YA1* induction. Unfortunately, the use of the *NF-YA2* RNAi construct has not revealed such a role yet, and future experiments using *nf-ya2* knock-out mutants are now required to examine the possibility of such a sequential mode of action.

It was previously suggested, using phylogenetic analysis, that *NF-YA1* and *NF-YA2* result from a recent gene duplication event (Laloum *et al.*, 2013) and our results indicate that they have mainly diverged at the level of their expression profiles, as frequently described for functionally redundant or partially redundant TFs (Singh and Hannehalli, 2008). This situation is reminiscent of the *ERN1* and *ERN2* genes that also share partially overlapping expression profiles and may also possess redundant function during the rhizobial symbiosis (Cerri *et al.*, 2012). On the basis of genome structure studies, it has been suggested that *ERN2* could be the original copy and might play a more prominent role during the more ancient arbuscular mycorrhizal symbiosis (Young *et al.*, 2011; Young and Bharti, 2012). Along this line, the soybean orthologs of *NF-YA2* (*GmNF-YA1a/b*) have recently been shown to play a positive role in the establishment of the AM-symbiosis (Schaarschmidt *et al.*, 2013), and the two *M. truncatula* *NF-YB* and *NF-YC* genes are also specifically transcribed in arbuscule-containing cells (Hogekamp *et al.*, 2011). Future studies will determine whether *MtNF-YA1* and *MtNF-YA2* play key roles during the AM symbiosis.

Because silencing of both TFs also led to a severe reduction in the transcriptional activation of *ERN1* and *ENOD11* in response to NFs, *NF-YA1/2* are also likely to play an active role in the early NF-signaling pathway that takes place in the root epidermis during rhizobial pre-infection symbiotic stages. We present converging evidence for the positioning of these TFs in the NF-signaling cascade as direct regulators of *ERN1* expression. *ERN1* encodes an ERF transcription factor that is necessary for NF-induced *ENOD11* expression and rhizobial infection (Middleton *et al.*, 2007). In most cases, ITs that form in the *ern1* mutant are blocked in infection foci, while limited numbers of ITs abort within the RH shaft. This is consistent with the phenotype of *nf-ya1-1/NF-YA2* RNAi and in the *NF-YA* RNAi roots also affected in IT formation and progression. We thus propose that *ERN1* is an important target of *NF-YA1* and *NF-YA2*, accounting for a substantial part of the role of these TFs during symbiotic pre-infection and infection. Further transcriptomic studies in the context of the double knock-down *NF-YA-RNAi*, associated with genome-wide ChIP-seq approaches should now help to identify additional direct targets of NF-Y TFs during different symbiotic

stages, thus leading to a more precise picture of the roles of *NF-YA1* and *NF-YA2*.

We show here that NF-elicited expression of *NF-YA1* is dependent on *NIN* and this is consistent with recent data obtained in *L. japonicus*. Indeed, the *NIN* TF, that has been described as an important positive regulator of initial steps of epidermal infection (Schäuser *et al.*, 1999) and nodule development (Marsh *et al.*, 2007), was recently shown to directly target *LjNF-YA1*, the *Lotus* ortholog of *NF-YA1*, and *LjNF-YB1* (Soyano *et al.*, 2013). In addition to positively regulating *NF-Y* genes, *NIN* was also shown to act as a direct positive regulator of *NPL* (Nodulation Pectate Lyase) involved in both pre-infection and infection events (Xie *et al.*, 2012). Our data suggest that *NIN*, by regulating the expression of *NF-YA1* regulates the subsequent transcription of *ERN1* and *ENOD11*. Nevertheless, *ENOD11* transcription is still activated in the *nin* mutant background during early NF signaling [Figure S6c and (Marsh *et al.*, 2007)], probably due to the activity of *NF-YA2* whose regulation is not dependent on *NIN* (Figure S6b). *NIN* was, as *ERN3*, also suggested to act as a repressor of NF-elicited *ENOD11* expression (Andriankaja *et al.*, 2007; Marsh *et al.*, 2007). Indeed, the *nin* mutant displays a more widespread and stronger *pENOD11-GUS* activity level compared with WT roots but only at later symbiotic stages. However, this 'inhibitory effect' of *NIN* was not observed at early stages, consistent with our results obtained at 4H after NF treatment (Figure S6c), but only at rather late time points after NF treatment (i.e., mainly 4 days and to a lesser extent 24H post treatment). This is in line with the recent characterization of the *L. japonicus daphne nin* mutant, in which a repressor role of *NIN* was also suggested during later stages of rhizobial infection (Yoro *et al.*, 2014). Taken together it is suggested that *NIN* may have a dual positive and negative role during nodulation and this may depend on the symbiotic stage considered, and thus the molecular environment of this TF, or by a differential regulation by *NSP1* or *IPD3*, both implicated in the regulation of *NIN* expression (Hirsch *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2014).

We show here that *NF-YA* TFs can bind to the promoter of *ERN1*. Nevertheless, *ERN1* expression is also dependent on *NSP1*, which can, as *NF-Y*, bind directly to the promoter of *ERN1* (Hirsch *et al.*, 2009; Cerri *et al.*, 2012). *NSP1* binds to AATTT-binding sites which are found many times as such or in their inverted form in *ERN1* promoter, but the precise binding site(s) has(ve) not yet been determined. Interestingly, AATTT motifs are found in the close vicinity of the third inverted CCAAT-box (ATTGG) of the *ERN1* promoter (Figure S11), shown here to be directly recognized by *NF-YA1*. In addition, both *NSP1/NSP2* and *NF-YA1* are able to activate the transcription of *ERN1* in *N. benthamiana* cells, raising the question of the functional links between these TFs in relation to the regulation of *ERN1* expression [Figure 5b and Cerri *et al.* (2012)]. Our co-expression

experiments in *N. benthamiana* cells suggest that *NSP1/NSP2* and *NF-YA1* may act synergistically to activate *ERN1* expression. In *Arabidopsis* it has been suggested that an *NF-Y* complex composed of *AtNF-YA4*, *AtNF-YB3* and *AtNF-YC2* subunits would function as a stabilizing enhancer of *bZIP28* during the ER-stress response (Liu and Howell, 2010). Furthermore an *NF-Y* complex potentiates *CONSTANS*-mediated activation of the *FT* gene (Tiwari *et al.*, 2010). The recent analysis of the crystal structure of the human *NF-Y* complex bound to a CCAAT-box (Nardini *et al.*, 2013) suggests that the *NF-Y* complex could, through the histone-fold motifs of its *NF-YB* and *NF-YC* subunits, modify the chromatin structure locally to facilitate transcriptional regulation either by the CCAAT-box binding subunit *NF-YA* or by other TFs present in the same transcriptional complex (Gnesutta *et al.*, 2013).

Taken together, our results lead us to propose that *NF-YA1/2*-containing complexes could act as major facilitators for enhancing *ERN1* transcriptional activation in association with *NSP1/2* complexes. However, to thoroughly understand the role of *NF-YA1/2* during nodulation it now appears essential to identify and characterize their interacting protein partners within different transcriptional complexes. This includes not only the *NF-YB* and *NF-YC* subunits, but also additional potential transcriptional co-regulators such as *NSP1/2*.

Our data establish *NF-YA1* and *NF-YA2* as important regulators of NF-mediated signaling and rhizobial infection initiation in *M. truncatula*. We propose a model, shown in Figure 6, positioning these two regulators in the context of

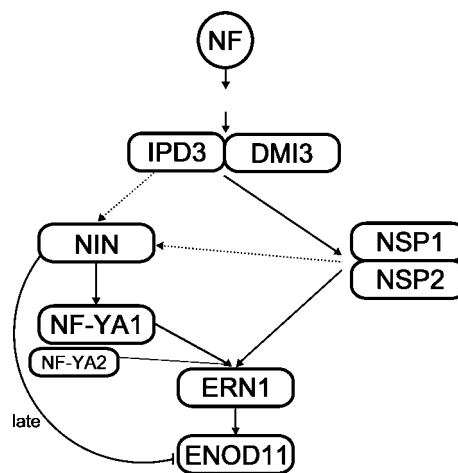


Figure 6. A model of the transcriptional regulatory network controlling NF-signal transduction in *Medicago truncatula*.

This model proposes the existence of at least two signaling pathways, involving the sequential or concomitant action of *NF-YA* or *NSP* TFs to regulate the expression of *ERN1* and *ENOD11* in root epidermal cells responding to NFs. Full arrows represent clear genetic or molecular evidence of direct or indirect links, while dotted arrows represent indirect evidence or evidence coming from another model (*Lotus japonicus*). See Discussion for detailed references.

what is known about early symbiotic signaling in both *L. japonicus* and *M. truncatula*. Since it is a phosphorylation substrate of DMI3, CYCLOPS/IPD3 appears as a primary response gene at the top of the NF-signaling cascade in *L. japonicus* (Yano *et al.*, 2008) and possibly also in *M. truncatula* (Grimsrud *et al.*, 2010; Rose *et al.*, 2012). Furthermore, it was recently shown in *L. japonicus*, that IPD3 directly controls the expression of *NIN* (Singh *et al.*, 2014). It remains to be proven that this is also the case in *M. truncatula*. NF-induced expression of *NSP2* depends on DMI3 (Kalo *et al.*, 2005) but beyond this genetic evidence, the molecular mechanism, involving CYCLOPS/IPD3 or not, remains however unknown. In addition to being a target of CYCLOPS, *NIN* also seems to be a target of NSP1 in *M. truncatula* (Hirsch *et al.*, 2009), and of IPN2, a MYB TF that interacts with NSP2 in *L. japonicus* (Kang *et al.*, 2014). However, it remains to be determined whether this is the case during earlier NF-signaling steps. The expression of *NIN* thus seems to be controlled by both CYCLOPS/IPD3 and NSP1/2 but their respective roles or interconnections remain to be clarified.

The present manuscript shows that NF-YA1 and NF-YA2 can directly regulate the NF-induced expression of *ERN1*, possibly within the same transcriptional complex as NSP1 and NSP2. While *NF-YA1* expression is NF-regulated via DMI3 and *NIN*, the expression of *NF-YA2* seems more constitutive in roots and its regulation is unknown. Our model thus proposes the existence of at least two independent pathways, one via IPD3/*NIN*/NF-YAs and the other via the NSPs, both leading to NF-induced *ERN1* and thus *ENOD11* expression. This is in accordance with previous models that propose the existence of alternative or parallel symbiotic signaling pathways that are independent or partially independent of early symbiotic TFs like NSPs or *NIN* (Murray, 2011).

Despite the difficulty of comparing results from different plants and a variety of experimental systems, the picture that is now emerging is that of a growing complexity of the regulatory circuits due to functional redundancies, as well as parallel, dynamic pathways that could vary depending on the symbiotic stage or the tissue considered.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Biological material and treatments

Several Jemalong lines were used in this study. Wild-type and L416 derived A17 lines harboring a 2.3 kb-promoter region of *ENOD11* fused to the *GUS* reporter gene (L416) (Journet *et al.*, 2001), and *dmi3* (TRV25 allele) (Catoira *et al.*, 2000), *nsp1-1* and *nsp1-2* (B85 and C54 alleles, respectively) (Catoira *et al.*, 2000), *ern1* (*bit1-1* allele) (Middleton *et al.*, 2007), *nin-1* (12S allele) (Marsh *et al.*, 2007), and *nf-ya1-1* (Laporte *et al.*, 2014) with or without the *pENOD11:GUS* fusion. *Medicago* seeds were germinated and grown on agar Fahraeus plates or in aeroponic 'caissons' as described in the *Medicago truncatula Handbook*. DNA

constructs were introduced in *E. coli* DH5 α , *A. rhizogenes* ARqua1 (Quandt *et al.*, 1993), or *A. tumefaciens* GV3101 and GV3103 strains. The 2011 *S. meliloti* strain (Ardourel *et al.*, 1994) constitutively expressing the *hemA-lacZ* fusion was used for this study. All the strains were grown on LB or TY medium supplemented with the appropriated antibiotic combinations.

NF treatments were performed by immersing roots for 1–12 h in either liquid Fahraeus (control) or a Fahraeus solution complemented with purified NFs (10^{-9} or 10^{-8} M).

DNA constructs

The *pNF-YA1:GUS* construct was obtained as described in (Laporte *et al.*, 2014). A 2.6 kb-DNA region upstream of the *NF-YA2* start codon was recombined in the pKGWFS7 vector (Karimi *et al.*, 2002) carrying the *uidA* gene using the Gateway technology (Invitrogen, <http://www.lifetechnologies.com/>). For the *NF-YA* RNAi and *NF-YA2* RNAi constructs, a 340-bp DNA region in the *NF-YA1* coding sequence and a 200-bp region in the *NF-YA2* 3' UTR have been introduced in the pFRN (derived from pFGC5941; NCBI accession number AY310901) vector using the Gateway technology (Invitrogen). For the transactivation studies in *Medicago* L416 roots, the *NF-YA1* ORF was introduced downstream of the p35S promoter in a pBL121-derived binary vector, after DNA digestion with *Bam*H1 and *Sac*1 restriction enzymes (Promega, Life Technologies, www.lifetechnologies.com/fr). For transient transformation of *N. benthamiana* leaves, YFP fusions were obtained by recombination of the corresponding ORFs into the PAM-PAT *p35S:YFP-GW* or *p35S:3xHA-GW* destination vectors (L. Deslandes, Laboratory of Plant Microbe Interactions). 3xHA constructs are the same as in Cerri *et al.* (2012). For the ChIP experiments, the *NF-YA1* coding sequence was amplified by PCR and recombined into the pK7FWG2 and pK7WGF2 according to the Gateway manufacturer's protocol (<https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/gatewayman.pdf>).

Transient expression in *Nicotiana benthamiana*

Plasmid constructs were introduced in GV3101 and GV3103 *A. tumefaciens* strains. For subcellular localization studies, YFP-NF-Y constructs were co-infiltrated with the viral silencing inhibitor protein P19 (Voinnet *et al.*, 2003). *A. tumefaciens* strains were grown in Luria-Bertoni medium under antibiotic selection at 28°C and harvested as described in (Andriankaja *et al.*, 2007). After 2 h of incubation at room temperature, equal volumes of *A. tumefaciens* cultures ($OD_{600} = 0.5$ for subcellular localization studies; $OD_{600} = 0.25$ for transactivation studies) were co-infiltrated into 3-week-old *N. benthamiana* leaves using a 1-mL syringe. Infiltrated plants were kept at 21°C in a growth chamber (16-h photoperiod, $70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light intensity). Subcellular localization, β -glucuronidase activity and protein expression were analyzed on leaf discs collected 36 h after infiltration. Protein extracts were charged on a poly-acrylamide gel, and gel blots were performed using anti-HA-peroxidase rat monoclonal antibodies (Roche, <https://lifescience.roche.com/shop/home>).

RNA extraction and quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from *Medicago* roots using the Macherey-Nagel Total RNA Isolation Kit according to the manufacturer's instructions (<http://www.mn-net.com/>). The RNA samples were quantified and RNA integrity was checked by Agilent RNA Nano-Chip (Agilent, <http://www.home.agilent.com/>). First-strand cDNA synthesis was performed using 500 ng to 1 μg of total RNA with an anchored oligo(dT) and SuperScript II (Invitrogen) or Roche reverse transcriptases, following the manufacturers' protocols.

Quantitative RT-PCR was performed on 384-well plates, with the Light Cycler 480 system (Roche) and using the SYBR Green I Master mix (Roche). The cycling conditions were as follows: 95°C for 5 min followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 15 sec, annealing and extension at 60°C for 1 min. Transcript levels for each of the target genes were normalized to the endogenous ubiquitin transcript level. The data shown are mean values obtained from two to five independent biological experiments with two to three technical repeats. Primer sequences for quantitative RT-PCR analyses are shown in Table S1.

Nodule and root microdissection, RNA sequencing and statistical analyses

RNA-seq analyses of root and nodule samples were performed as follows. Preparation of whole root and nodule samples, as well as laser-dissected nodule regions has been described in Roux *et al.* (2014). Laser-dissection of mock and NF-treated (10^{-8} M) epidermal root samples was conducted on 20 μ m transversal sections, using a NF-reactive 1 cm-long region 24 h after treatment. RNA extraction, rRNA depletion and RNA *in vitro* amplification were carried out as published (Roux *et al.*, 2014). Oriented paired-end sequencing (2×50 nt) was performed using an Illumina HiSeq 2000 by Fasteris SA (<https://www.fasteris.com>). Normalization of raw counts was carried out using DESEQ R package v1.12.0 (Anders and Huber, 2010). Estimated dispersion was calculated using the 'pooled' method with the sharing mode set to 'fit-only'. For each gene, we set generalized linear models (GLMs) according to a full model testing which regresses the genes expression on the treatment condition (Mock or NF). Tests for differential expression were performed as described in the DESEQ package.

GUS and β -galactosidase assays

Histochemical and fluorometric assays were performed as described in Cerri *et al.* (2012).

The magenta-Gal and X-Gal (5-bromo-6-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside; Biosynth B7200) substrates were used for histochemical (purple and blue, respectively) staining of the β -galactosidase activity within *S. meliloti*-containing ITs.

Microscopic methods

After coloration, root tissues were fixed in a 0.1 M phosphate buffer complemented with 2% glutaraldehyde, dehydrated in ethanol and included in agarose or Technovit 7100 (Heraeus Kulzer, <http://heraeus-kulzer.fr/>) resin. Roots were then sliced into 5- to 40- μ m sections using a Reichert Jung 2040 microtome. Root tissues were observed using a light microscope (Axioplan 2 Imaging; Carl Zeiss). Subcellular localization of NF-YA proteins in *N. benthamiana* leaf discs were observed with an epifluorescence microscope (Axiophot 2; Carl Zeiss, <http://www.zeiss.fr>).

Chromatin immuno-precipitation analysis

ChIP assays were performed 4 days after rhizobia inoculation of *Medicago* transformed roots bearing the following constructs: 35S:GFP (used as a negative control), 35S:NF-YA1-GFP or 35S:GFP-NF-YA1. Briefly, after plant material fixation in 1% (v/v) formaldehyde, tissues were homogenized, nuclei isolated and lysed, according to Gendrel *et al.* (2005). Cross-linked chromatin was then sonicated using a water bath Bioruptor[®] Plus (Diagenode; 30 sec on/30 sec off pulses, at high intensity for 60 cycles: twice 10 cycles in TPX tubes, Diagenode, plus 40 cycles in ordinary 1.5 ml tubes). ChIP was performed in an SX-8G IP-Star[®] Compact

Automated System (Diagenode, <http://www.diagenode.com>), using a Direct ChIP protocol incubating the samples with the antibodies (anti-GFP, ABCAM ab6556) for 12 h and Invitrogen Protein A Dynabeads[®], using standard parameters. Immunoprecipitated DNA was then recovered using the IPure kit in the SX-8G IP-Star[®] (Diagenode) and analysed by quantitative real-time PCR. An aliquot of untreated sonicated chromatin was processed in parallel for use as the total input DNA control. Two biological replicates were used for each construct and the result is given as the mean of both independent results.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank David Barker for critical reading of the manuscript. This work was funded by the ANR-09-BLAN-0033-01 HAPIHUB and ANR-08-GENO-106 SYMBiMICS for RNA-Seq analyses, and supported by the French Laboratory of Excellence project 'TULIP' (ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02). T.L. and M.R.C. were funded by a grant from the French Ministry of Education and Research, M.B. by an INRA CJS (Contrat Jeune Scientifique) contract and F.A. by a long term EMBO fellowship.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Figure S1. Protein alignment of NF-YA1 and NF-YA2 conserved domains.

Figure S2. Expression patterns of *NF-YA1* and *NF-YA2* in roots in response to NFs.

Figure S3. Specific downregulation of NF-Y genes by NF-YA2 or NF-YA-RNAi constructs.

Figure S4. *NF-YA* RNAi roots are strongly impaired in IT initiation and nodule formation.

Figure S5. Expression analyses of *NF-YAs* and early symbiotic marker genes in *NF-YA1* or *NF-YA2*-down-regulated roots.

Figure S6. Expression of *NF-YA1* and *NF-YA2* and *ENOD11* in mutants of the NF signaling pathway.

Figure S7. *NF-YA2* can, as *ERN1* and *NF-YA1* transactivate *ENOD11* expression in *M. truncatula* roots.

Figure S8. A mutation in the DNA-binding domain of *NF-YA1* controlling *pERN::GUS* activation.

Figure S9. *NF-YA1* does not activate the transcription of *ENOD11* regulatory sequences.

Figure S10. *NF-YA2* can transactivate *ERN1* transcription in *Nicotiana benthamiana* cells.

Figure S11. Three putative NSP1 binding sites surround the 3rd CCAAT box in the *ERN1* promoter.

Table S1. List of primers used.

REFERENCES

- Anders, S. and Huber, W. (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* **11**, R106.
- 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.
- 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.
- Boisson-Demier, A., Andriankaja, A., Chabaud, M., Niebel, A., Journet, E.P., Barker, D.G. and de Carvalho-Niebel, F. (2005) MtENOD11 gene activation during rhizobial infection and mycorrhizal arbuscule development

- requires a common AT-rich-containing regulatory sequence. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**, 1269–1276.
- Capoen, W., Sun, J., Wysham, D. *et al.* (2011) Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of legumes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **108**, 14348–14353.
- Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, R.V., Journet, E.P., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C. and Denarie, J. (2000) Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. *Plant Cell*, **12**, 1647–1666.
- 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 Physiol.* **160**, 2155–2172.
- Combiér, J.P., Frugier, F., de Billy, F. *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.
- 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 Dev.* **22**, 1549–1559.
- El-Yahyaoui, F., Kuster, H., Ben Amor, B. *et al.* (2004) Expression profiling in *Medicago truncatula* identifies more than 750 genes differentially expressed during nodulation, including many potential regulators of the symbiotic program(1 w). *Plant Physiol.* **136**, 3159–3176.
- Gendrel, A.V., Lippman, Z., Martienssen, R. and Colot, V. (2005) Profiling histone modification patterns in plants using genomic tiling microarrays. *Nat. Methods*, **2**, 213–218.
- Gnesutta, N., Nardini, M. and Mantovani, R. (2013) The H2A/H2B-like histone-fold domain proteins at the crossroad between chromatin and different DNA metabolisms. *Transcription*, **4**, 114–119.
- Grimsrud, P.A., den Os, D., Wenger, C.D., Swaney, D.L., Schwartz, D., Sussman, M.R., Ané, J.M. and Coon, J.J. (2010) Large-scale phosphoprotein analysis in *Medicago truncatula* roots provides insight into in vivo kinase activity in legumes. *Plant Physiol.* **152**, 19–28.
- 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**, 545–557.
- Hogekamp, C., Arndt, D., Pereira, P.A., Becker, J.D., Hohnjec, N. and Küster, H. (2011) Laser microdissection unravels cell-type-specific transcription in arbuscular mycorrhizal roots, including CAAT-box transcription factor gene expression correlating with fungal contact and spread. *Plant Physiol.* **157**, 2023–2043.
- 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. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**, 737–748.
- Kalo, P., Gleason, C., Edwards, A. *et al.* (2005) Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science*, **308**, 1786–1789.
- Kang, H., Chu, X., Wang, C. *et al.* (2014) A MYB coiled coil transcription factor interacts with NSP2 and is involved in nodulation in *Lotus japonicus*. *New Phytol.* **201**, 837–849.
- Karimi, M., Inze, D. and Depicker, A. (2002) GATEWAY(TM) vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* **7**, 193–195.
- Laloum, T., De Mita, S., Gamas, P., Baudin, M. and Niebel, A. (2013) CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many? *Trends Plant Sci.* **18**, 157–166.
- Laporte, P., Lepage, A., Fournier, J. *et al.* (2014) The CCAAT box-binding transcription factor NF-YA1 controls rhizobial infection. *J. Exp. Bot.* **65**, 481–494.
- 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.
- Mantovani, R. (1999) The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene*, **239**, 15–27.
- Mantovani, R., Lio, X., Pessara, U., Vanhuisduijnjen, R., Benoist, C. and Mathis, D. (1994) Dominant-negative analogs of NF-YA. *J. Biol. Chem.* **269**, 20340–20346.
- 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 Physiol.* **144**, 324–335.
- Middleton, P., Jakab, J., Penmetsa, R. *et al.* (2007) An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for Nod factor signal transduction. *Plant Cell*, **19**, 1221–1234.
- 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**, e16463.
- Murray, J.D. (2011) Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes. *Mol. Plant Microbe Interact.* **24**, 631–639.
- Nardini, M., Gnesutta, N., Donati, G. *et al.* (2013) Sequence-specific transcription factor NF-Y displays histone-like DNA binding and H2B-like ubiquitination. *Cell*, **152**, 132–143.
- Oldroyd, G.E.D. (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 252–263.
- Oldroyd, G.E.D. and Downie, J.A. (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 519–546.
- 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. *Mol. Plant Microbe Interact.* **6**, 699–706.
- Rose, C.M., Venkateshwaran, M., Grimsrud, P.A., Westphall, M.S., Sussman, M.R., Coon, J.J. and Ané, J.-M. (2012) Medicago PhosphoProtein Database: a repository for *Medicago truncatula* phosphoprotein data. *Front. Plant Sci.* **3**, 122.
- Roux, B., Rodde, N., Jardinaud, M.F. *et al.* (2014) An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *Plant J.* **77**, 817–837.
- Schaarschmidt, S., Gresshoff, P.M. and Hause, B. (2013) Analyzing the soybean transcriptome during autoregulation of mycorrhization identifies the transcription factors GmNF-YA1a/b as positive regulators of arbuscular mycorrhization. *Genome Biol.* **14**, R62.
- Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J. and Stougaard, J. (1999) A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature*, **402**, 191–195.
- Sieberer, B.J., Chabaud, M., Timmers, A.C., Monin, A., Fournier, J. and Barker, D.G. (2009) A nuclear-targetedameleon demonstrates intranuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* root hairs in response to rhizobial nodulation factors. *Plant Physiol.* **151**, 1197–1206.
- Singh, L.N. and Hannenhalli, S. (2008) Functional diversification of paralogous transcription factors via divergence in DNA binding site motif and in expression. *PLoS One*, **3**, e2345.
- Singh, S., Katzer, K., Lambert, J., Cerri, M. and Parniske, M. (2014) CYCLOPS, a DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development. *Cell Host Microbe*, **15**, 139–152.
- 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.
- Soyano, T., Kouchi, H., Hirota, A. and Hayashi, M. (2013) NODULE INCEPTION directly targets nf-y subunit genes to regulate essential processes of root nodule development in *Lotus japonicus*. *PLoS Genet.* **9**, e1003352.
- Tiwari, S.B., Shen, Y., Chang, H.-C. *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.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. and Baulcombe, D. (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* **33**, 949–956.
- Xie, F., Murray, J.D., Kim, J., Heckmann, A.B., Edwards, A., Oldroyd, G.E. and Downie, J.A. (2012) Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **109**, 633–638.
- Yano, K., Yoshida, S., Müller, J. *et al.* (2008) CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **105**, 20540–20545.
- Yoro, E., Suzuki, T., Toyokura, K., Miyazawa, H., Fukaki, H. and Kawaguchi, M. (2014) A positive regulator of nodule organogenesis, NODULE

INCEPTION, acts as a negative regulator of rhizobial infection in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* **165**, 747–758.

Young, N.D. and Bharti, A.K. (2012) Genome-enabled insights into legume biology. *Annu. Rev. Plant Biol.* **63**, 283–305.

Young, N.D., Debelle, F., Oldroyd, G.E.D. et al. (2011) The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature*, **480**, 520–524.

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.

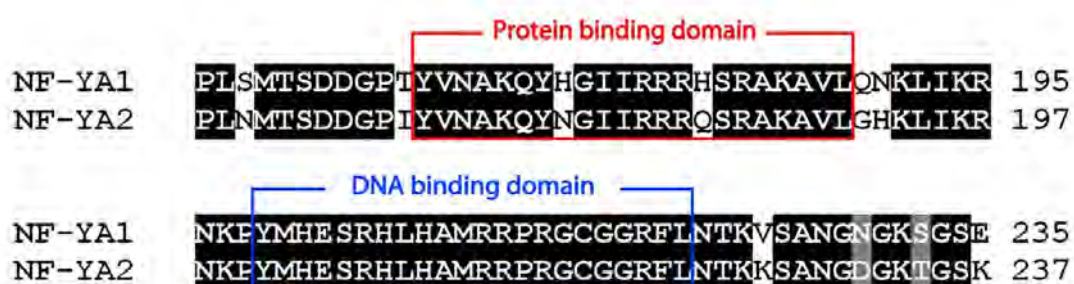


Figure S1. Protein alignment of NF-YA1 and NF-YA2 conserved domains
 Alignment of the conserved domains (NF-YA subunit interaction domain and DNA binding domain) of NF-YA1 and NF-YA2 using Multalin (Corpet, 1988). Amino-acid positions are indicated at the left of amino acid sequences.

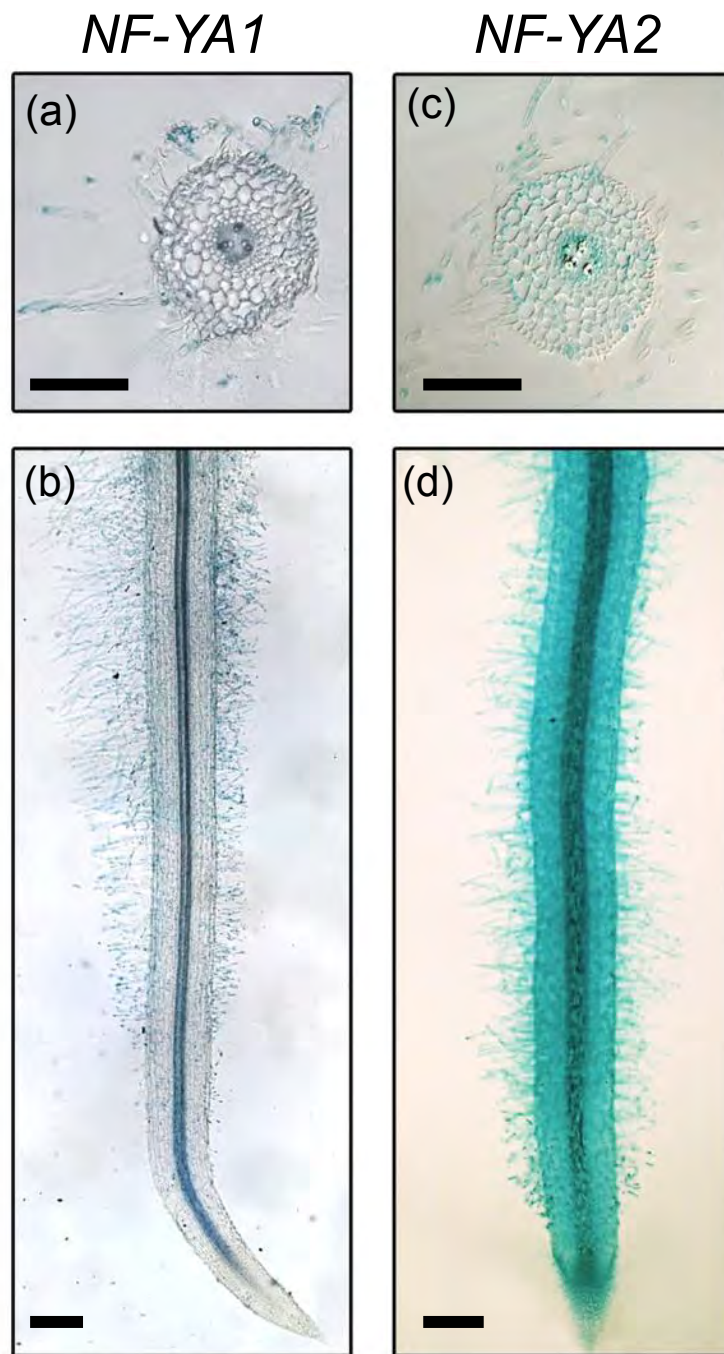
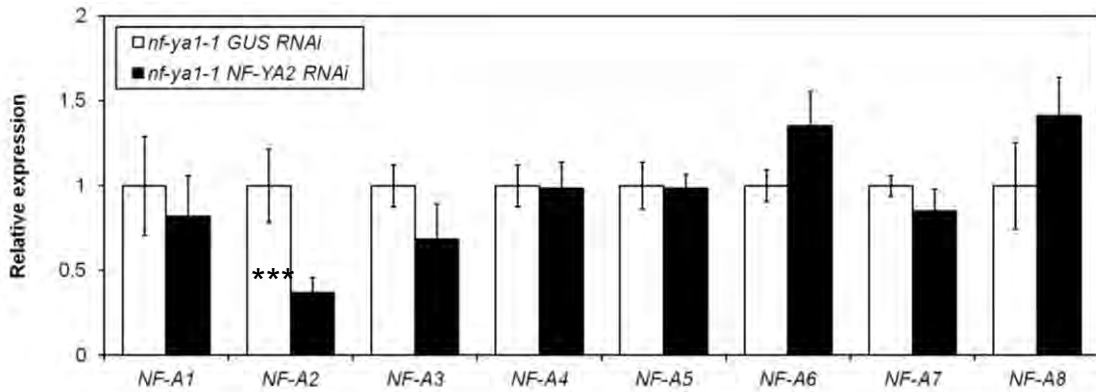


Figure S2. Expression patterns of *NF-YA1* and *NF-YA2* in roots in response to NFs.

Histochemical GUS staining of transgenic roots expressing a 2.2 kb *pNF-YA1:GUS* (a and b) or a 2.6 kb *pNF-YA2:GUS* (c and d) fusion following 6 h of NF treatment. a and c represent 40 μm transverse root sections, b and d highlight the unsectioned nodulation susceptible root zone. Bars = 500 μm .

(a)



(b)

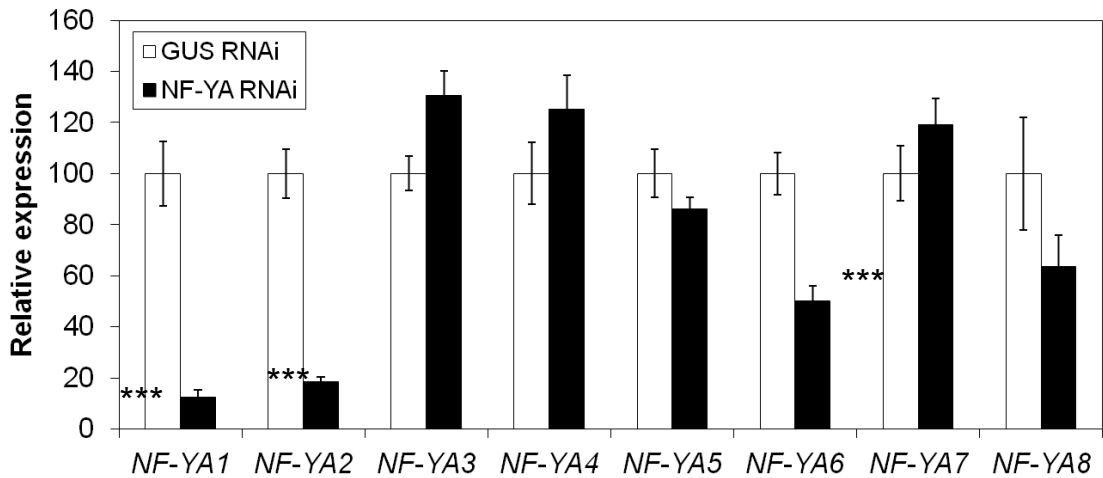


Figure S3. Specific downregulation of NF-Y genes by NF-YA2 or NF-YA –RNAi constructs

(a) Relative expression of *NF-YA1-8* genes, measured by qRT-PCR, in *nf-ya1-1/NF-YA2* RNAi roots (black bars) compared to *nf-ya1-1/GUS* control RNAi roots (white bars) 4 h after NF treatment. (b) Relative expression of *NF-YA1-8* genes, measured by qRT-PCR, in *NF-YA* RNAi roots (black bars) compared to *GUS* RNAi roots (white bars) 6 h after NF treatment. (a, b) Error bars correspond to the SE from the average of 20 to 30 individual roots. Significant mean differences were detected using Wilcoxon test ($p_{val} \leq 0.05$).

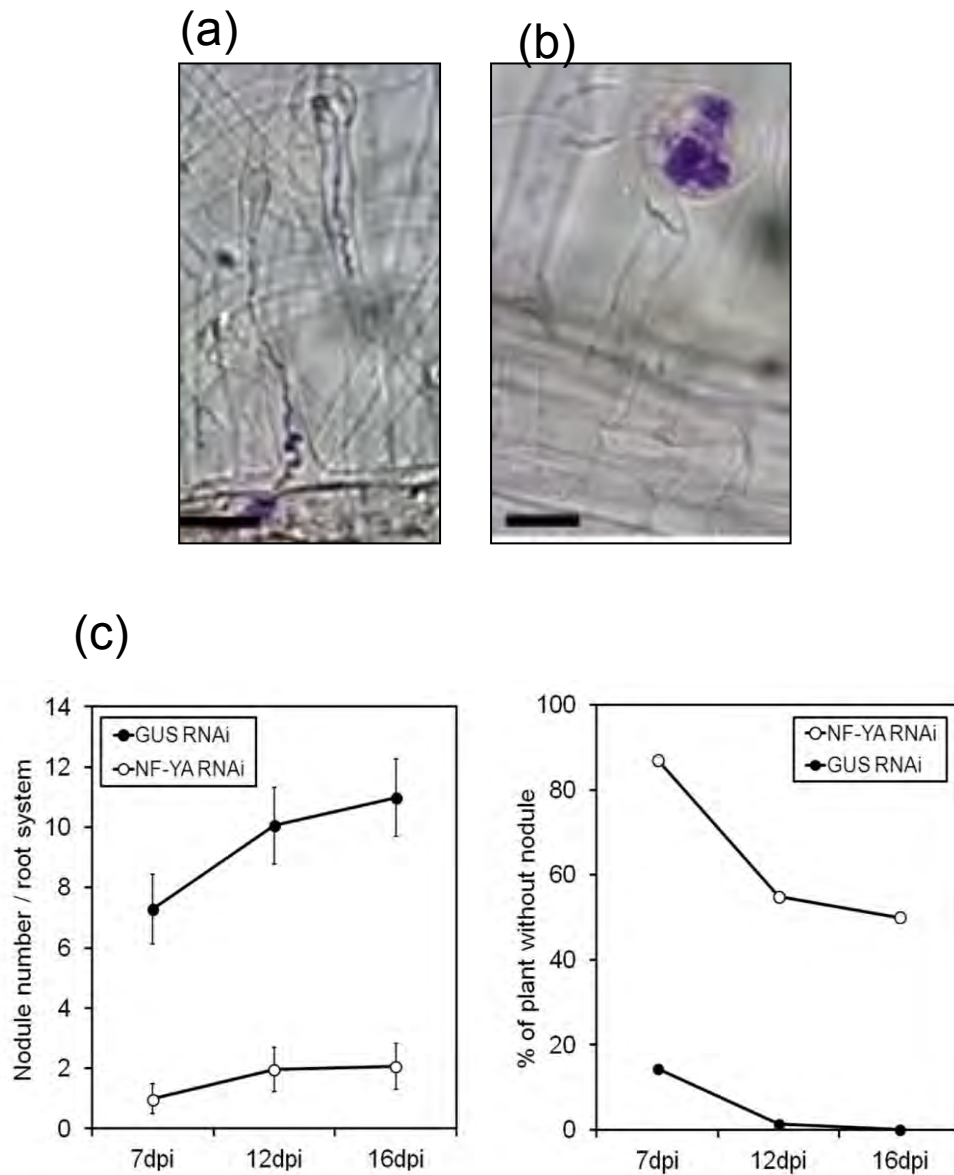


Figure S4. *NF-YA* RNAi roots are strongly impaired in IT initiation and nodule formation. (a, b) representative image of growing IT phenotype in control *GUS* RNAi (a), and abortive IT in *NF-YA* RNAi roots (b), 5 days after inoculation (dpi) with a *LacZ* - expressing *S. meliloti* strain (purple). Bars = 20 μ m (a) and 10 μ m (b). (c) Number of nodules were counted in a time course experiment in both control (*GUS* RNAi: black circles) and *NF-YA* RNAi (white circles) composite plants. Results shown on the left panel are the average number of nodules counted per composite plants from 80 plants. Error bars correspond to the standard deviation. The right panel represents percentage of plants showing no nodules

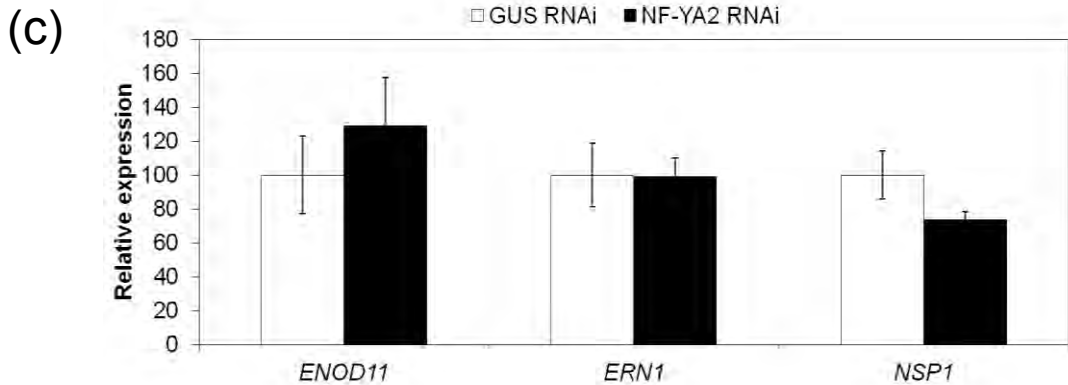
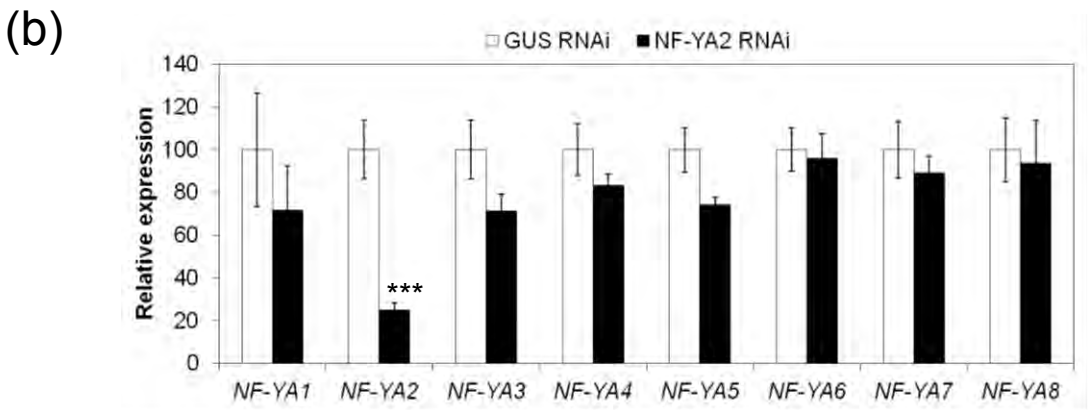
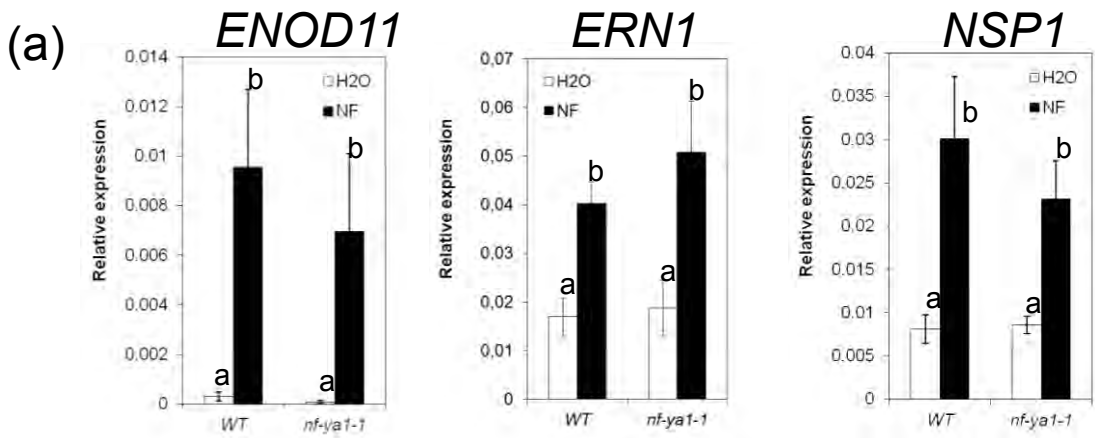


Figure S5. Expression analyses of *NF-YAs* and early symbiotic marker genes in *NF-YA1* or *NF-YA2*-down-regulated roots. (a) q-RTPCR analysis of *ENOD11*, *ERN1* and *NSP1* expression in control water-treated (H₂O, white boxes) or NF-treated (black boxes) roots of A17 (WT) or *nf-ya1-1*. Groups were defined following a Kruskal and Wallis test (pval ≤ 0.05). (b) Relative expression of all *NF-YA* genes in *GUS* RNAi control roots (white boxes) and in *NF-YA2* RNAi roots (black boxes). Significant mean differences were detected using Wilcoxon test (pval ≤ 0.05). (c) Relative expression of *ENOD11*, *ERN1* and *NSP1* in *GUS* RNAi controls (white boxes) or in *NF-YA2* RNAi roots (black boxes). Error bars correspond to the SE from the average of 3 to 5 biological replicates (30 to 50 roots) (a) or from the average of 10 to 20 individual roots (b-c).

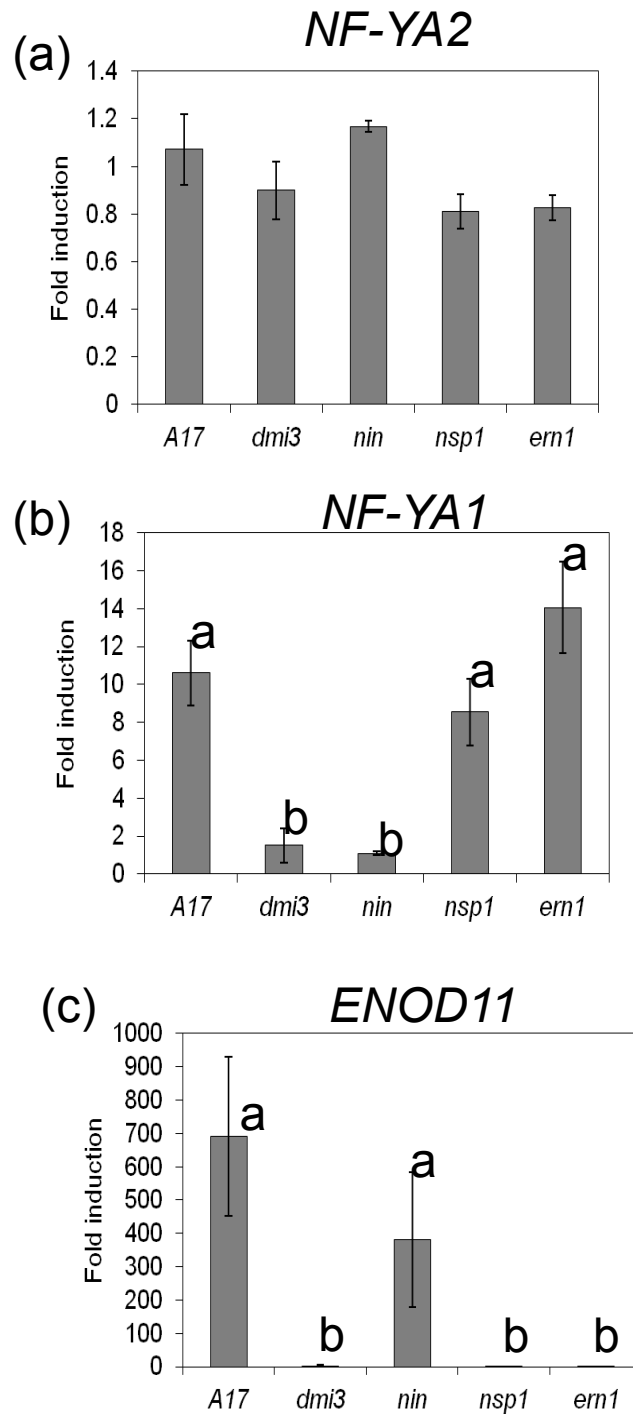


Figure S6. Expression of *NF-YA1* and *NF-YA2* and *ENOD11* in mutants of the NF signaling pathway.

q-RTPCR analysis of 10^{-8} M-NF-treated *NF-YA2* (a) or *NF-YA1*(b)-induction in A17 (WT) and in the NF-signaling mutants *dmi3-1*, *nin-1*, and *ern1-1*. Error bars correspond to the SE from the average of 3 to 5 biological replicates (30 to 50 roots). Groups were set following a Kruskal and Wallis test ($p \leq 0.05$).

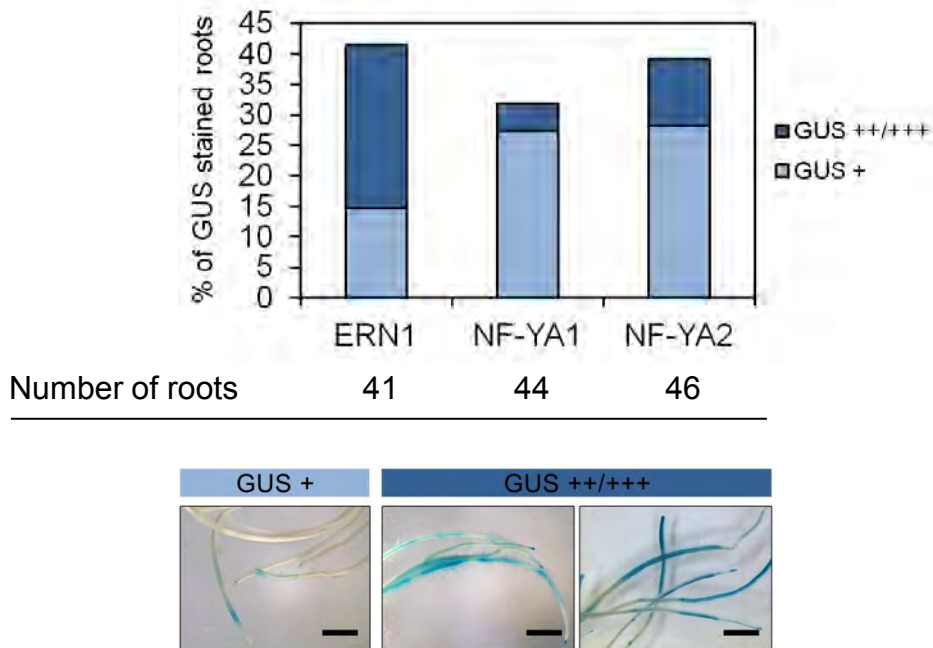


Figure S7. NF-YA2 can, as ERN1 and NF-YA1 transactivate *ENOD11* expression in *M. truncatula* roots.

Transgenic *M. truncatula* roots carrying a p35S:*NF-YA2* or a p35S:*NF-YA1* or a p35S:*ERN1* construct were generated following *A. rhizogenes* transformation of stable *M. truncatula* WT lines carrying the p*ENOD11*:*GUS* fusion. (a) The relative intensity of GUS staining of roots from independent composite plants (n) were visually annotated and represented in (a) as the percentage of composite plants showing moderate (GUS+, light blue bars) to strong/very strong (GUS++/+++, dark blue bars) stained roots after 4 h of the GUS reaction as illustrated in (b). Bar= 1cm. B).

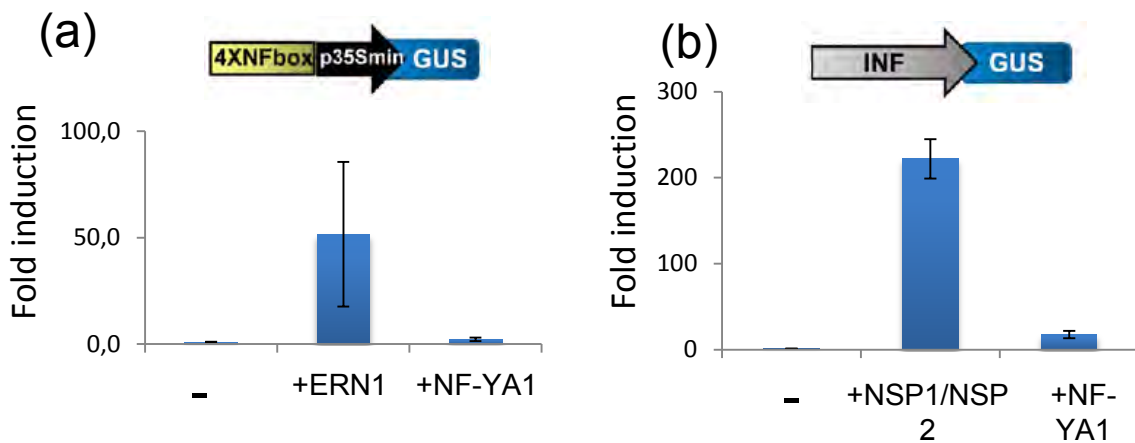


Figure S9. NF-YA1 does not activate the transcription of *ENOD11* regulatory sequences.

The ability of NF-YA1 TF to activate *ENOD11* promoter regulatory sequences was measured in *N. benthamiana* epidermal cells by co-expression of respective TFs and promoter-GUS fusions comprising *ENOD11* NF responsive 4 x *NF-box*:*GUS* (a) or *ENOD11* infection responsive *INF*:*GUS* (b) regions. The GUS activity driven by the respective promoter-GUS constructs was measured by fluorimetric GUS assays in infiltrated leaf discs co-expressing or not a 3xHA-tagged ERN1, NF-YA1 or NSP1/NSP2 TFs. Data is represented as fold induction in relation to control (-) samples.

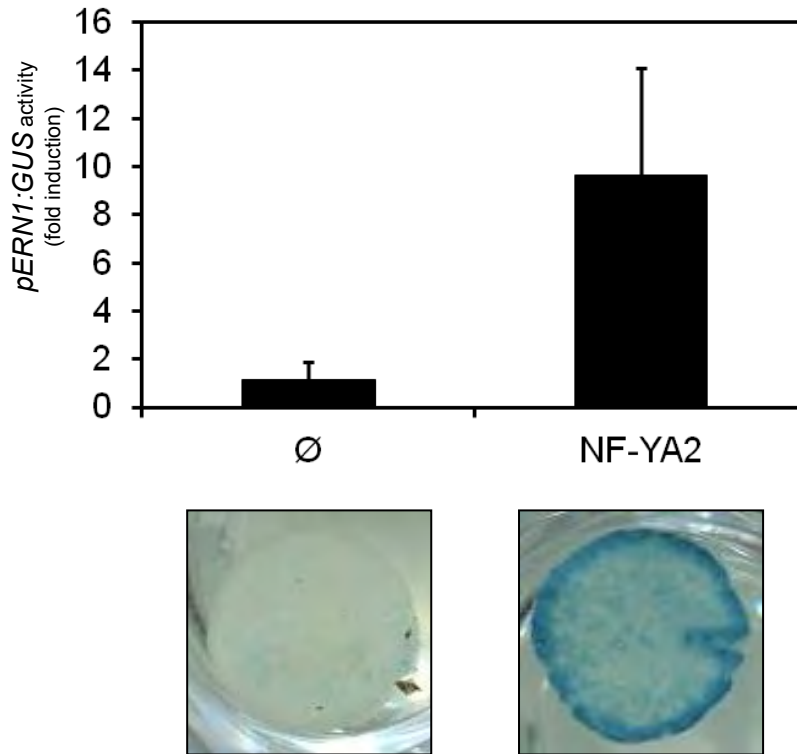


Fig S10. NF-YA2 can transactivate *ERN1* transcription in *Nicotiana benthamiana* cells.

A 3xHA-tagged NF-YA2 protein (3xHA-NF-YA2) is able to activate the transcription of a 2.3 kb *pERN1:GUS* transcriptional fusion in *N. benthamiana* cells. Fluorometric (a) or Histochemical (b) GUS activity was measured in leaf discs following agroinfiltration of *pERN1:GUS* alone (Ø), or in combination with 3xHA-NF-YA2.

pERN1

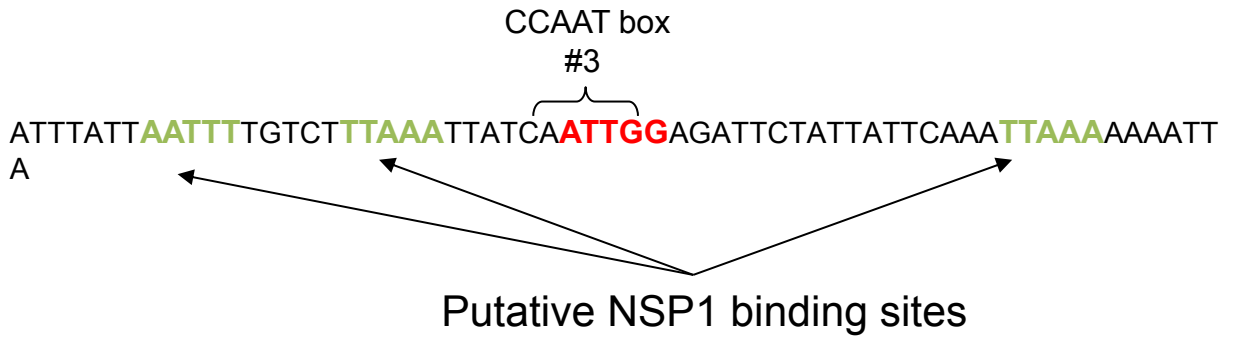


Figure S11. Three putative NSP1 binding sites surround the 3rd CCAAT box in the *ERN1* promoter.

-394 to -456 *ERN1* promoter sequences upstream the TSS (transcription start site). The inverted CCAAT box bound by NF-YA1 is highlighted in red, and putative NSP1 binding sites are highlighted in green.

Table S1

Primer name	Use	3'-5' sequence
MtNF-YA1_Asc1_for	Cloning of the NF-YA1 ORF	AGGCGCGCCTACCATGGCTATGCAACCTGTTT ATCTTAAAG
MtNF-YA1_Pme1_rev	Cloning of the NF-YA1 ORF	AGTTTAAACCTTATGGTTCCAGCAGCTGTCTG CCA
MtNF-YA1 partII For AscI	Cloning of the NF-YA RNAi fragment	AGGCGCGCCTACCTTTGCTGCCGAGCCACTT AATC
MtNF-YA1 partII Stop Rev PmeI	Cloning of the NF-YA RNAi fragment	TGTTTAAACCTTACAAGAAACGACCACCGCAT CCTC
NF-YA1 mut DBD for	Cloning of NF-YA1*	TGCAGCTGCCAAGACCAAGAGGATGCGGTGG TCG
NF-YA1 mut DBD rev	Cloning of NF-YA1*	CGACCACCGCATCCTCTTGGTCTTGGCAGCT GCA
BamH1-NF-YA1-atg-for3	Overexpression of NF-YA1 in Medicago roots	GGGATCCATGGCTATGCAACCTG
Sac1-NF-YA1-rev	Overexpression of NF-YA1 in Medicago roots	CTGAGCTCAAACCTTATGGTTCCAGC
NF-YA1_for_qPCR384	qRT-PCR	TCGGATCTACTGTCCACTCTTTGG
NF-YA1_rev_qPCR384	qRT-PCR	TTGGCATGACGATACCGTGTG
ENOD11_for3	qRT-PCR	CAGCCTCCACCTAGCATCCA
ENOD11_Rev2	qRT-PCR	CCACATGCAAAGATGGGACG
ERN1-314-Fw	qRT-PCR	TGTCTCATTGGATTCTCCTCTTGC
ERN1-391-Rev	qRT-PCR	TTGGAGCAGAAGCAACAGCA
NSP1_561F	qRT-PCR	AAGGTGCAGCTAAGGCCAATG
NSP1_624R	qRT-PCR	GCCCACCTACCATCCTTATTGTTT
NF-YA2_for_qPCR384	qRT-PCR	ACAGCTTTACCGTCGATCACCTT
NF-YA2_rev_qPCR384	qRT-PCR	CCATCGATCATGTCTGCCATAG
NF-YA3_for_qPCR384	qRT-PCR	GTTAGTTGCTTACGCACCGCA
NF-YA3_rev_qPCR384	qRT-PCR	GCTAATCCCATCATTTGAGGCA
NF-YA4_for1	qRT-PCR	TTGAATGGAAATATGTGCGAAC
NF-YA4_rev1	qRT-PCR	AACTCTAACTCCTGTTGCTGCTG
NF-YA5_for1	qRT-PCR	TTACCTTGGTTATCTTCTTGGCA
NF-YA5_rev1	qRT-PCR	TGATTGCTTGAGACTTCAACAGA
NF-YA6_for1	qRT-PCR	TGTGTGGTAGGGATATGTTAGGG
NF-YA6_rev1	qRT-PCR	CTCACCTCACCTACAAGGCTAGA
NF-YA7_for1	qRT-PCR	CTCCTTATTCAAACGCACAATTC
NF-YA7_rev1	qRT-PCR	CATGATGCATTTGGTATAGCTGA
NF-YA8_for1	qRT-PCR	TGGAAAGAGTACGGAAGGTATCA
NF-YA8_rev1	qRT-PCR	AGCTGCTAGTAGGCCGTTAGAGT

1.2. Bilan

1.2.1. Conclusions et perspectives

Ce travail a permis de mieux comprendre le rôle joué par les sous-unités MtNF-YA1 et MtNF-YA2 au cours des étapes précoces de la symbiose rhizobienne. Ainsi, grâce à ce travail, nous savons que la sous-unité MtNF-YA1, en plus d'être impliquée dans le développement nodulaire et l'infection rhizobienne, joue aussi un rôle lors de la signalisation NF. En plus de cette nouvelle fonction, nous avons aussi caractérisé MtNF-YA2, une autre sous-unité NF-Y de *M. truncatula* qui tient un rôle partiellement redondant à MtNF-YA1 au cours de la symbiose rhizobienne. La suppression de cette redondance permet notamment d'aggraver le phénotype symbiotique de *Mtnf-ya1-1* ce qui permet de mieux comprendre le rôle tenu par ces deux gènes au cours de la symbiose. De plus pour de futures études (notamment transcriptomiques) l'utilisation du RNAi ciblant les deux MtNF-YA permettra une analyse plus fine des réseaux de gènes contrôlés par ces facteurs de transcription. Au cours de ce travail, nous avons aussi identifié une cible directe de MtNF-YA1 lors du processus symbiotique. Ce type d'information est crucial pour mieux comprendre comment agissent ces facteurs de transcription au niveau mécanistique et fonctionnel. En effet, même si le facteur de transcription *ERN1* n'est probablement pas l'unique cible des NF-Y au cours de la symbiose rhizobienne, il explique en partie les phénotypes de signalisation NF et d'infection rhizobienne obtenus en désactivant les deux sous-unités NF-YA. De plus la caractérisation de la boîte CCAAT liée par MtNF-YA1 permet de caractériser les nucléotides flanquant qui sont favorables à ce type de liaison. Enfin, au cours de cette étude, nous nous sommes concentrés sur deux sous-unités NF-YA. Cependant, dans la littérature, la liaison du complexe NF-Y à l'ADN, nécessite la formation du trimère NF-YA, NF-YB et NF-YC. Ainsi, pour une analyse complète, il nous manque la caractérisation des protéines NF-YB et NF-YC qui s'associent avec MtNF-YA1 et MtNF-YA2 au cours des différents processus symbiotiques.

1.2.2. Implication personnelle

Cet article constitue le travail principal de la thèse de Tom Laloum qui a initié et réalisé la plus grande partie du travail présenté, mais il n'a pas pu le finaliser avant la fin de son contrat (décembre 2012). Cependant j'ai également eu une implication conséquente dans cette étude, principalement au niveau expérimental. Ainsi, j'ai réalisé la localisation

histochimique de *MtNF-YA1* après un traitement NF de 4H dans les racines de *M. truncatula* ce qui a permis de valider les données de dissection laser. De plus, j'ai généré la construction RNAi ciblant spécifiquement *MtNF-YA2* et réalisé la transformation des plantes, Tom s'est chargé de la partie moléculaire. Au niveau du phénotype d'infection, j'ai réfléchi et réalisé la majeure partie de l'expérimentation incluant la préparation du matériel biologique, les observations microscopiques et la mesure du phénotype ainsi que la partie moléculaire associée. De manière globale, j'ai effectué les répétitions biologiques manquantes, et participé aux demandes expérimentales formulées par les reviewers de l'article. (Laloum, 2013)

En ce qui concerne l'écriture de l'article, j'ai généré l'ensemble des figures principales et supplémentaires en compilant les données des différents auteurs. De plus j'ai réalisé l'ensemble des analyses statistiques associées aux données expérimentales excepté la partie sur le séquençage des ARN totaux. Enfin j'ai participé de façon plus modeste à la rédaction elle-même en intervenant sur la réflexion portant sur l'agencement des idées, le modèle final proposé, la relecture du manuscrit et en prenant en charge la bibliographie.

2. Identification et caractérisation des dimères YB/YC agissant avec MtNF-YA1 et MtNF-YA2 au cours de la symbiose fixatrice d'azote

2.1. Introduction et résumé de l'article

Le concept de complexe protéique est une composante essentielle à prendre en compte pour comprendre la fonction des facteurs de transcription. En effet, la plupart des protéines régulatrices de la transcription modulent l'expression des gènes qu'elles contrôlent via des interactions protéine/protéine avec les autres régulateurs. Cette notion de complexe protéique atteint une dimension supérieure dans le cadre des facteurs de transcription NF-Y. Ces protéines présentent en effet la particularité d'agir en hétérotrimère (Mantovani, 1999). Le complexe transcriptionnel NF-Y est ainsi composé de trois sous-unités distinctes: NF-YA, NF-YB et NF-YC qui s'assemblent avant de pouvoir fixer l'ADN au niveau de motifs "CCAAT". Cette forme trimérique est un prérequis à la liaison à l'ADN et les sous-unités NF-Y seules ne peuvent agir en tant que facteur de transcription. Par conséquent, dans le cadre de notre étude sur le rôle de MtNF-YA1 et MtNF-YA2 dans la symbiose rhizobienne, il nous manque un niveau de complexité essentiel au bon fonctionnement de ces sous-unités. Nous avons en effet précédemment décrit que MtNF-YA1 et MtNF-YA2 présentent la capacité de lier le promoteur de *MtERN1* au niveau d'une boîte CCAAT situé à -423 pb du TSS pour activer la transcription de ce gène (Laloum et al., 2014). Cependant cette activité nécessite *in vivo* la présence d'au moins une sous-unité NF-YB et une sous-unité NF-YC. Ainsi l'identification et la caractérisation de ces complexes NF-Y symbiotiques permettrait de caractériser plus finement le mode d'action et les gènes cibles de MtNF-YA1 et MtNF-YA2 au cours de la symbiose fixatrice d'azote.

Cette étude a été initiée en utilisant deux cribles en double hybride consécutifs. Le premier a été réalisé en utilisant MtNF-YA1 comme appât et a permis l'identification de deux sous-unités NF-YC appelées MtNF-YC1 et MtNF-YC2. Le second crible a quant à lui été réalisé avec la sous-unité MtNF-YC2 comme appât. Deux sous-unités NF-YB sont ressorties de ce crible : MtNF-YB13, identifié deux fois et MtNF-YB16, identifié huit fois. Nous avons ensuite cherché à définir la spécificité d'interaction qui pouvait exister entre les sous-unités NF-YC et NF-YB de *M. truncatula*. Pour cela, nous avons cloné certaines sous unités NF-YB

représentatives des sous-groupes phylogénétiques et testé leur capacité à interagir avec MtNF-YC2. De façon intéressante, seule deux des six sous-unités testées n'interagissent pas avec MtNF-YC2. Ces deux protéines, MtNF-YB3 et MtNF-YB10 appartiennent à un sous-groupe de NF-YB relativement divergent appelé LEC1 et LEC1-Like (Braybrook and Harada, 2008). Etant donné sa proximité phylogénétique avec LjNF-YB1 et son expression plus pertinente dans les tissus symbiotiques, nous avons décidé de nous concentrer sur MtNF-YB16. Par des approches de triple hybride et CoIP, nous avons démontré la formation de quatre complexes NF-Y stable dans la levure et *in planta*. Associé à ces analyses d'interaction protéine / protéine, nous avons réalisé une localisation subcellulaire des différentes sous-unités NF-Y chez *N. benthamina*. Ces observations suggèrent une relocalisation du dimère NF-YB/NF-YC dans le noyau où se trouve la sous-unité NF-YA. Ce type de relocalisation est conforme à ce qui est décrit dans la littérature végétale et nous permet de conclure à une formation des hétérotrimères NF-Y dans le noyau des cellules végétales.

Au niveau fonctionnel, nous avons bénéficié des données d'expression disponibles chez *M. truncatula* pour étudier le profil d'expression symbiotique des sous-unités identifiées. Les sous-unités *MtNF-YB16*, *MtNF-YC1* et *MtNF-YC2* sont toutes bien exprimées dans les tissus symbiotiques. Cependant, alors que *MtNF-YC2* et *MtNF-YB16* sont principalement localisés à l'apex, comme les sous-unités NF-YA, le gène *MtNF-YC1* est exprimé de façon plus homogène dans le nodule, sans zonation distinct. Ainsi, à la fois au niveau phylogénétique et au niveau expression, les sous-unités *MtNF-YB16* et *MtNF-YC2* apparaissent comme les plus pertinentes pour agir avec MtNF-YA1 MtNF-YA2 au cours de la symbiose rhizobienne. Enfin, nous avons utilisé le système d'ARN interférence (RNAi) afin de diminuer l'expression de ces gènes et d'étudier leur rôles au cours de la symbiose rhizobienne. En ce qui concerne la sous-unité *MtNF-YB16*, la diminution de son expression ne présente aucun effet sur le nombre et la morphologie des nodosités formées. En supposant que cette absence de phénotype puisse être imputée à une redondance fonctionnelle entre les NF-YB, nous avons mis au point une approche de RNAi globale, ciblant plusieurs membres de la famille. Cependant, ici encore, l'absence de phénotype ne nous permet pas de conclure quant au rôle de *MtNF-YB16* dans la symbiose rhizobienne. En ce qui concerne, les NF-YC, la diminution de l'expression de NF-YC1 et NF-YC2 entraîne un phénotype nodulaire comparable à ce qui est observé chez le mutant *nf-ya1-1* ou chez le RNAi ciblant *PvNF-YC1* (Zanetti et al., 2010; Laporte et al., 2014). Cependant, la diminution de l'expression d'uniquement *MtNF-YC1* ou *MtNF-YC2* ne produit aucun phénotype clair suggérant ici aussi une redondance entre les deux gènes.

Heterotrimeric NF-Y complexes involved in symbiotic nodulation

Maël Baudin¹, Tom Laloum¹, Agnès Lepage¹, Carolina Ripodas², Flavio Blanco², Maria Eugenia Zanetti², Senjuti Sinharoy³, Michael Udvardi³ Fernanda de Carvalho-Niebel¹ and Andreas Niebel^{1*}

¹ INRA/CNRS, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR441/2594, F-31326 Castanet-Tolosan, (France). ² Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, FCE UNLP, calle 115 y 49 s/n, CP 1900-La Plata, Argentina. ³ The Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, Oklahoma 73401

* E-mail: andreas.niebel@toulouse.inra.fr

Abstract

The endosymbiotic association between legumes and soil bacteria known as rhizobia leads to the formation of root nodules in which differentiated bacteria convert atmospheric nitrogen into a form that can be assimilated by the host plant. Successful root infection by rhizobia and nodule organogenesis require the activation of a set of symbiotic genes that are under the specific control of several early transcription factors (TFs). Among these TFs MtNF-YA1 was first shown to be a key regulator of nodule development in *Medicago truncatula* and more recently, also of rhizobial infection and early symbiotic signaling. NF-Y proteins are part of a transcriptional complex also called CBF (CCAAT-box Binding Factor) present in all eukaryotic systems. This complex is composed of three unrelated proteins (NF-YA, NF-YB and NF-YC) which assemble to bind DNA at CCAAT-boxes, a motif present in most eukaryotic promoters. In plants, NF-Y subunits are encoded by small gene families which can theoretically form a multitude of heterotrimeric NF-Y complexes. However, specificity of subunit interactions and specialized expression patterns have been reported for a number of NF-Y proteins suggesting that trimeric NF-Y complex formation involves interactions between specific subunits. In this study, we identified and characterized the NF-YB and NF-YC proteins interacting with MtNF-YA1 using a combination of protein/protein interaction approaches both in yeast and in planta coupled to detailed expression analysis. In addition, using yeast three hybrid assays and CoIP experiments we have shown the existence of at least 6 different heterotrimeric NF-Y complexes around NF-YA1. Finally functional

studies confirmed the symbiotic role of the identified NF-YCs but also revealed partial redundancy between subunits. Interestingly, the NF-YB and NF-YC subunits identified here are orthologous or closely related to NF-Y subunits shown to play symbiotic roles in other legumes such as common bean, soybean or lotus, thereby revealing the evolutionary conserved specialization for symbiotic nodulation of certain NF-Y subunits among leguminous plants.

Introduction

Under nitrogen deficiency, legume plants are able to associate with soil-borne bacteria collectively called "rhizobia" [1]. This endosymbiotic association results in the formation of a new root organ named nodule in which differentiated rhizobia will fix atmospheric nitrogen for the benefit of the host plant. Nodule formation is induced after a molecular exchange between the two organisms which recognize each other [2]. A lipo-chitooligosaccharidic signal called Nod Factor (NF) produced by the bacteria is a key component of this molecular dialogue and NF treatments induce the earliest responses of the plant [3]. The perception of NFs by host plants induce local deformation of root hair (curling) in which entrapped rhizobia form a microcolony before rhizobial infection is initiated. Beneath the infection site, in the central and inner root cortex, endodermis and pericycle tissues, cells start dividing to form a nodule primordium [4]. Concomitantly, rhizobia enter in the root via a structure called infection thread initiated in the root hair which progress through cell layers to release bacteria in the divided cortical cells [5,6]. Finally, nodule organogenesis takes place and depending on the type of legume host, leads to the formation of a determinate nodule (ball-shaped organ with a limited growth as in *Phaseolus vulgaris* or *Lotus japonicus*) or an indeterminate nodule (cylinder-shaped organ with a persistent meristem allowing indeterminate growth as in *Medicago truncatula*). The mature indeterminate nodules is composed of distinct zones characterized by specialized cell tissues and functions [7]. In the most apical part of the nodule, the Zone 1 consists in a meristematic zone which drives the nodule growth. Below this first zone, in the infection zone (Zone 2) plant cells start to differentiate and rhizobia are release from infection threads into cytoplasmic vesicles called symbiosomes. The Zone 3 is the central and biggest part of the nodule where nitrogen fixation occurs. This zone is composed by fully differentiated bacterial and plant cells and is separated from the apical part of the nodule by an interzone 2-3.

Genetic, transcriptomic and biochemical approaches lead to the identification of several genes and pathways involved in the regulation of nodulation [2]. Most of these genes are conserved in the legume family, mainly the members of the common symbiotic pathway involved both in the symbiotic interactions with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia [2]. Downstream of this early signaling cascade, transcription factors (TF) such as IPD3/CYCLOPS [8], NIN [9], NSP1 [10], NSP2 [11] and ERN1 [12] regulate the expression of genes involved in NF-signal transduction, rhizobial infection and nodule development. In addition, we recently described that MtNF-YA1 and MtNF-YA2, play partially overlapping roles during the NF signaling by directly regulating *ERN1* expression [13]. *MtNF-YA1* was previously identified as a symbiosis-specific CCAAT-box binding TF required for rhizobial infection and nodule meristem formation and maintenance in *M. truncatula* [4,15-17]. In *L. japonicus* *LjNF-YA1* (the direct orthologue of *MtNF-YA1*) was described in association with LjNF-YB1 to be directly targeted by LjNIN and involved in symbiotic cortical cells division [18]. Another symbiotic NF-Y subunit PvNF-YC1 was described in common bean (*Phaseolus vulgaris*) as required for both rhizobial infection and nodule development [19].

All these NF-Y (for Nuclear Factor Y) genes belong to the same TF family also called HAP (Heme Activator Protein) or CBF (CCAAT-box Binding Factor) and are present in all eukaryotic systems [20,21]. The particularity of this TF is to act as a heterotrimer, composed by three unrelated subunits: NF-YA, NF-YB and NF-YC. The molecular assembly of the three subunits has been well characterized in animals. While the NF-YA subunit possess nuclear localization signals (NLS) which directly import the protein in the nucleus of the cell via the importin- β , the nuclear import of NF-YB and NF-YC requires heterodimer formation [22,23]. The NF-YB and NF-YC dimer is first formed in the cytoplasm before being imported in the nucleus via importin-13 [22] and trimer formation with NF-YA which is required for binding to the CCAAT-box within promoter sequences [21]. In the NF-Y trimeric complex, the NF-YA subunit is involved in the specific recognition and binding of the CCAAT-box, while the NF-YB and NF-YC protein which contain histone fold motifs (HFM) are more involved in DNA/protein complex stabilization and the recruitment of further interacting proteins [24]. In plants, the situation is more complex. Indeed while each subunit is encoded by a single gene in mammals, in plants there is a small gene family (about 10 members) for each subunit which results in a high combinatorial potential for NF-Y complexes [25,26]. This diversification brings new questions, concerning interaction specificity and potential functional redundancy between NF-Y subunits. Two global approaches on *Arabidopsis*

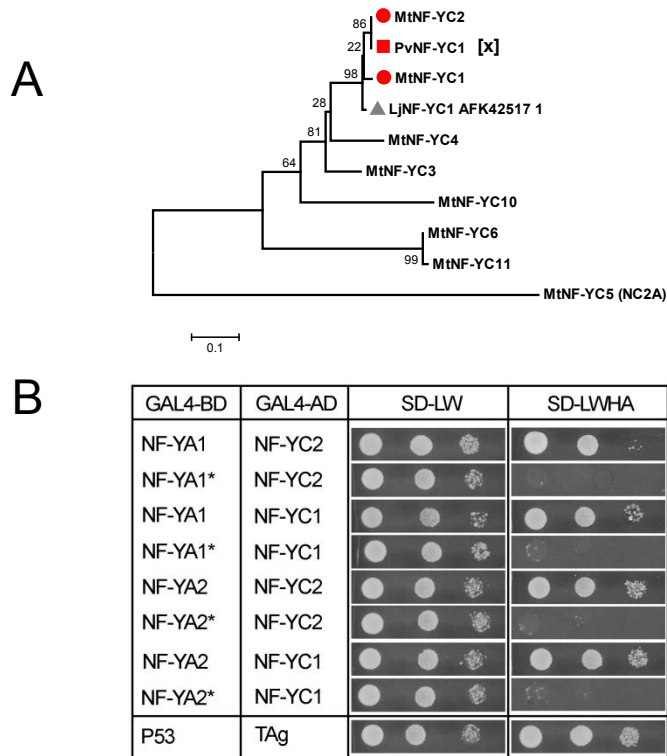


Figure 1. MtNF-YA1 and MtNF-YA2 are able to interact with MtNF-YC1 and MtNF-YC2 in yeast

(A) Phylogenetic analysis of NF-YC proteins. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the JTT matrix-based model [1]. The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates [2] is taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed [2]. MtNF-YC5, belonging to the closely related NC2A group of proteins was used as an outgroup to root the tree. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5 [3]. (B) Yeast two hybrid tests. MtNF-YA1, MtNF-YA2 or MtNF-YA1* or MtNF-YA2* (mutated in their protein binding domain) were fused to the GAL4 DNA-binding domain and tested in yeast for their interaction with fusions between MtNF-YC1 or MtNF-YC2 and the GAL4 activation (GAL4-AD) (Ref gal4 Y2H). P53 and TAg were used as positive controls and yeasts were spotted on selective media for plasmid only (SD-LW) or plasmid plus interaction (SD-LWHA)

1. Jones D.T., Taylor W.R., and Thornton J.M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* 8: 275-282.
2. Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
3. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

thaliana NF-Y proteins revealed some conservation between animal and plant systems concerning NF-Y assembly mechanisms and relatively weak interaction specificity even if the results are slightly divergent between the two studies [27,28].

Previous studies concerning NF-Y-encoding genes, particularly those shown to play a role during the rhizobial symbiosis have not considered NF-Y proteins in their heterotrimeric context. In this study, using yeast two hybrid screens, we identified and characterized the NF-YB and NF-YC subunits interacting with MtNF-YA1 and MtNF-YA2 during the symbiotic process, and showed both in yeast and *in planta* the formation of NF-Y trimers. In addition we provide functional data for the implication of these subunits during nodulation and show that there is conservation in NF-Y subunits involved in rhizobial symbiosis across legume plants.

Results

Identification of MtNF-YC1 and MtNF-YC2 using a yeast two hybrid screen

In order to start identifying elements of the multimeric protein complex inside which MtNF-YA1 and MtNF-YA2 act during early phases of the symbiotic interaction between *Medicago truncatula* (*M.t*) and *Sinorhizobium meliloti*, we performed a yeast two hybrid (Y2H) screen using MtNF-YA1 as a bait. Among the clones coding for candidate interactors, we identified two different NF-YC encoding clones and we named them *MtNF-YC1* and *MtNF-YC2*, following the nomenclature defined in [25]. A phylogenetic analysis using the seven NF-YC proteins of *M.t* shows that MtNF-YC1 and MtNF-YC2 are closely related and belong to a subgroup of NF-YC proteins also comprising PvNF-YC1, a NF-YC subunit shown in common bean to play comparable roles to MtNF-YA1 during rhizobial infection and nodule development (Figure 1A) [19]. In order to confirm the results of this screening *MtNF-YC1* and *C2* were re-cloned in the appropriate vectors and two by two yeast two hybrid experiments confirmed the interaction of MtNF-YA1 with MtNF-YC1 and MtNF-YC2 (Figure 1B). These results were also obtained with the closely related MtNF-YA2 (Figure 1B), shown recently to have partially overlapping functions with MtNF-YA1 [13]. Taking advantage of the high degree of conservation between the “protein interaction domain” of NF-YA proteins across kingdoms [25], we then created a K to E mutation in the lysine 171, an amino acid previously shown in animals to be essential for NF-Y subunit interaction [29] (Figure S1A). Indeed, using these mutated proteins called MtNF-YA1* and MtNF-YA2*, the

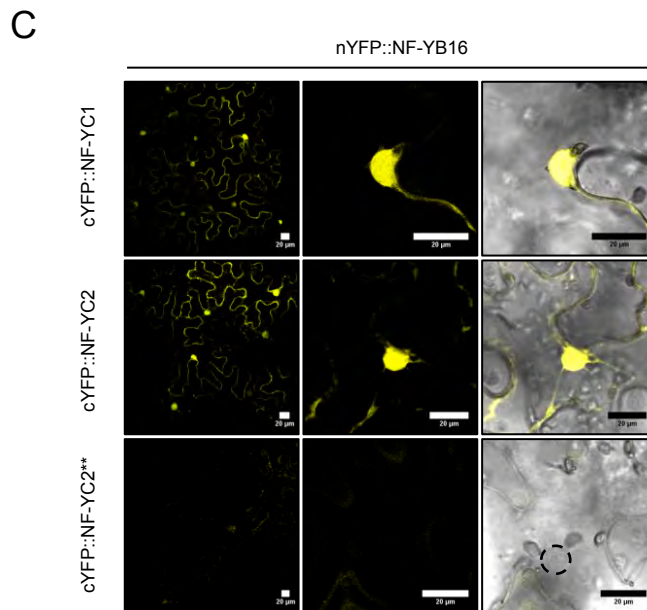
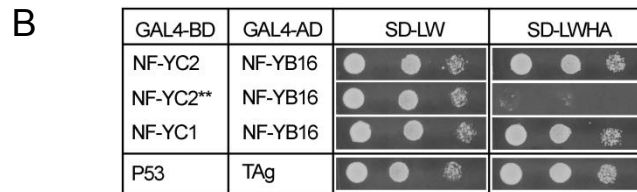
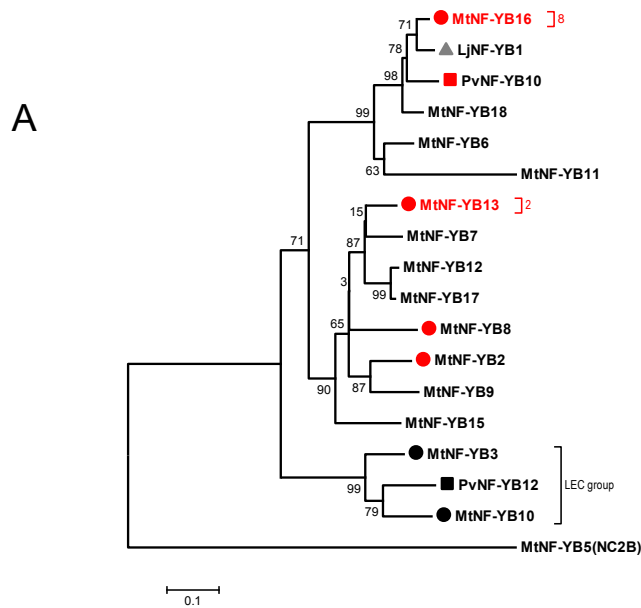


Figure 2: MtNF-YC1 and C2 interact with MtNF-YB16 in Y2H and BiFC.

(A) Phylogenetic analysis of NF-YB subunits. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the JTT matrix-based model [1]. The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates [2] is taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed [2]. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5 [3]. Red circles indicate the B subunits which interact with MtNF-YC2 in yeast. Black arrow highlight the two LEC subunit which do not interact with NF-YC2. (B) Yeast two hybrid experiments. NF-YB16 was fused to the activation domain of GAL4 (GAL4-AD) and was tested for its interaction with NF-YC2, NF-YC1 or NF-YC2 mutated on 2 key amino acids (NF-YC2**) fused to the binding domain (GAL4-BD) fused to. The interaction between P53 and TAg was used as a positive control. Yeast were spotted on selective media for plasmid only (SD-LW) or plasmid plus interaction (SD-LWHA) (C) Bi-molecular fluorescence complementation assay, *N. benthamiana* leaves were agroinfiltrated with MtNF-YB16 fused to N terminal part of YFP (nYFP) and MtNF-YC1 (top lane), MtNF-YC2 (middle lane) or the control MtNF-YC2** (bottom lane) fused to the C terminal part of YFP (cYFP). Confocal images of the YFP fluorescence (left panels), a magnification (middle panels) and a merge between YFP and bright field images (right panels) are shown. Bar = 20 μ m.

interaction with MtNF-YC1 and C2 was lost, serving as an ideal negative control for our interaction experiments and indicating that these interactions depend upon the conserved Lysine residue within the protein interaction domain of NF-YA (Figure 1B).

We then tested if we could confirm these results “*in planta*” by using the Bi-Molecular-Fluorescence Complementation approach (BiFC,[30]). In these experiments, we tested the interaction between MtNF-YA1 and MtNF-YC2 and C1 after agroinfiltration into *Nicotiana benthamiana* leaves. While the interaction between positive control proteins cYFP-NSP1 and nYFP-NSP2 [31] was clearly visible, we could not confirm the results obtained in yeast (Figure S2).

Identification of MtNF-YB16, that is able to interact with MtNF-YC1/2 with a partial specificity

After identifying two NF-YC subunits, capable of interacting with MtNF-YA1 and MtNF-YA2, and because no NF-YB subunit had been found during our first screen, we performed a new Y2H screen this time with *MtNF-YC2* as a bait. We choose *MtNF-YC2* because it is the closest ortholog of *PvNF-YC1* and its expression pattern in nodules was closer to that observed for *MtNF-YA1*, compared to *MtNF-YC1* (Figure 6). Among the clones coding for candidate interactors, we identified two different NF-YB encoding clones and named them *MtNF-YB13* (2 clones) and *MtNF-YB16* (8 clones). A phylogenetic analysis using the 14 true NF-YB proteins of *M.t.*, showed that MtNF-YB13 and MtNF-YB16, belong to two separate subgroups of NF-YB proteins, however distinct from the divergent and seed specific “LEC” group (Figure 2A). Interestingly, MtNF-YB16 is the closest *Medicago* ortholog of LjNF-YB1, a *Lotus japonicus* NF-YB subunit that, together with LjNF-YA1 was recently shown to play an important role during nodule organogenesis by promoting and/or stimulating cortical cell divisions under the direct control of the NIN TF [18].

We confirmed the interaction between MtNF-YC2 and MtNF-YB16 using two by two Y2H experiments, and could repeat these results with the closely related MtNF-YC1 protein (Figure 2B). As for MtNF-YA1 we created a MtNF-YC2 protein mutated in 2 conserved amino acids shown to be essential for interaction with NF-YB subunits in animal NF-YC proteins, [32] (Figure S1B), and called it MtNF-YC2**. Here again the interaction between the mutated protein and MtNF-YB16 was lost, reinforcing our interaction results and showing that this interaction depends upon the conserved isoleucine 136 and aspartic acid 139 residues within the protein interaction domain of NF-YC (Figure 2B, Figure S1B).

A

pVTU-102	GAL4-BD	GAL4-AD	SD-LWU	SD-LWUH + 3AT
NF-YC2	NF-YA1	NF-YB16		
NF-YC2**	NF-YA1	NF-YB16		
NF-YC1	NF-YA1	NF-YB16		
NF-YC2	NF-YA2	NF-YB16		
NF-YC2**	NF-YA2	NF-YB16		
NF-YC1	NF-YA2	NF-YB16		

B

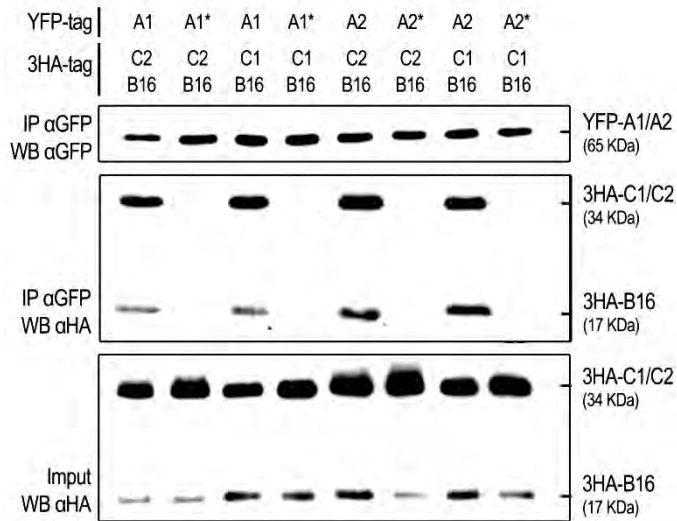


Figure 3: MtNF-YA1 and A2 are able to form a NF-Y trimer with MtNF-YB16 and MtNF-YC1 and C2.

(A) Yeast three hybrid experiment, *NF-YB16* was fused to the activation domain of GAL4 (GAL4-AD) and was tested for its interaction with *NF-YA1* or *NF-YA2* fused to the binding domain (GAL4-BD). We co-expressed *NF-YC1*, *NF-YC2* or the control *NF-YC2*** using the pVT-U102 vector. Yeast were spotted on selective media for plasmid only (SD-LWU) or plasmid plus interaction (SD-LWUH + 5mM 3AT). **(B)** Co-immunoprecipitation assay, *NF-YA1*, *NF-YA2* and their corresponding control (*NF-YA1** and *NF-YA2**) tagged with YFP were co-expressed in *N. benthamiana* with *NF-YB16* and *NF-YC1* or *NF-YC2* fused to the 3HA tag and affinity bound with GFP magnetotrap. The crude extracts (input) and immunoenriched (IP) fractions were subjected to protein blots (Western Blots). Tagged proteins were detected with anti GFP antibodies: αGFP (YFP-tagged proteins) or anti HA antibodies: αHA (3HA-tagged proteins).

As an *in planta* confirmation, we again used the BiFC system via transient transformation of *N. benthamiana* leaves. The association of cYFP-MtNF-YC1 or cYFP-MtNF-YC2 with nYFP-MtNF-YB16 leads to a strong signal, corresponding to the wavelength of YFP (Figure S3A), that was detected both in the nucleus and in the cytoplasm of *N. benthamiana* cells. Whereas, this fluorescent signal was not observed when the c-YFP-MtNF-YC2** (I136D/L142E) is associated with nYFP-MtNF-YB16 (Figure 2C). These interactions were confirmed by changing the C and N termini part of YFP for the combination (Figure S3B). Therefore, we confirmed the interaction between MtNF-YB16 and the two NF-YC proteins and the dependence of this interaction on the conserved (I136 and L139) residues, *in planta*.

There has been conflicting reports about the specificity between NF-YB and NF-YC subunits [27,28]. In order to test whether interaction specificity could be observed in the case of the “symbiotic NF-Y subunits”, we decided to test the interaction between MtNF-YC2 and a representative group of NF-YB proteins from *M.t.* Two by two Y2H experiments confirmed the interaction between MtNF-YC2 and MtNF-YB13, also identified in the Y2H screen, and showed that two other NF-YB subunits, i.e. MtNF-YB2 and B8, closely related to MtNF-YB13 interact with MtNF-YC2 in yeast (Figure S4A). Interestingly no interaction was observed between MtNF-YC2 and the more distant MtNF-YB3 and MtNF-YB10, belonging to the LEC group of seed specific NF-YB proteins. MtNF-YC2** was used as a negative control and did not interact with any of the NF-YB proteins tested (Figure S4A). All the cloned NF-YB subunits were then tested for the interaction with MtNF-YA1 in Y2H but no interaction could be detected, even for MtNF-YB2, B8, B13 and B16 which are able to interact with MtNF-YC2 (Figure S4B).

MtNF-YB16 and MtNF-YC1/MtNF-YC2 interact with MtNF-YA1 and MtNF-YA2 to form NF-Y trimers in yeast and in planta

After demonstrating two by two interactions between, MtNF-YA1 and A2, MtNF-YC1 and C2, MtNF-YB16 and B13, we wanted to prove that these subunits can actually interact as a NF-Y trimer. With this in mind, we first performed yeast three hybrid experiments (Y3H). Indeed co expressing AD-MtNF-YB16 with BD-MtNF-YA1 or BD-NF-YA2 together with MtNF-YC2 or MtNF-YC1, allowed strong yeast growth, confirming the formation of a stable NF-Y heterotrimer. In contrast when we co expressed the mutated MtNF-YC2** no yeast growth could be obtained, confirming the two by two experiment

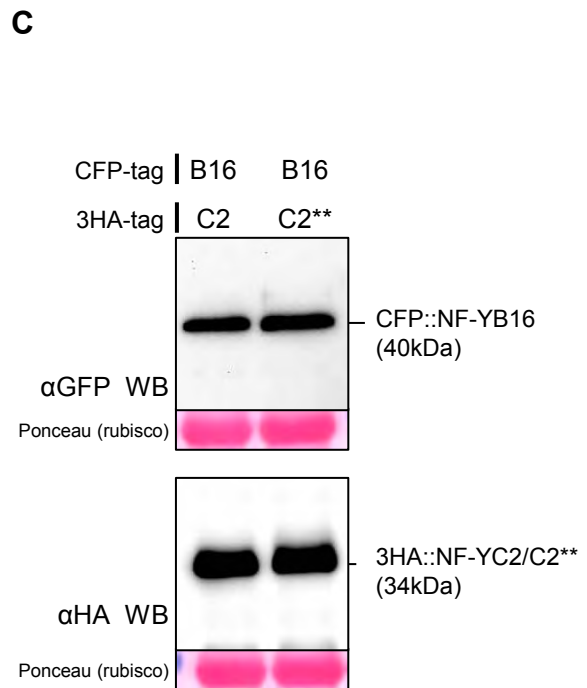
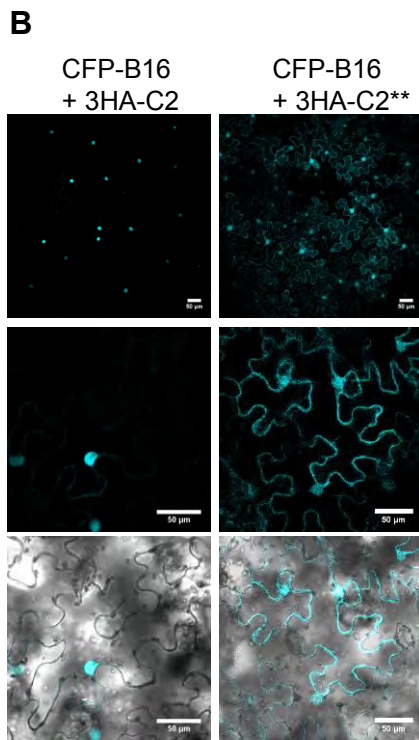
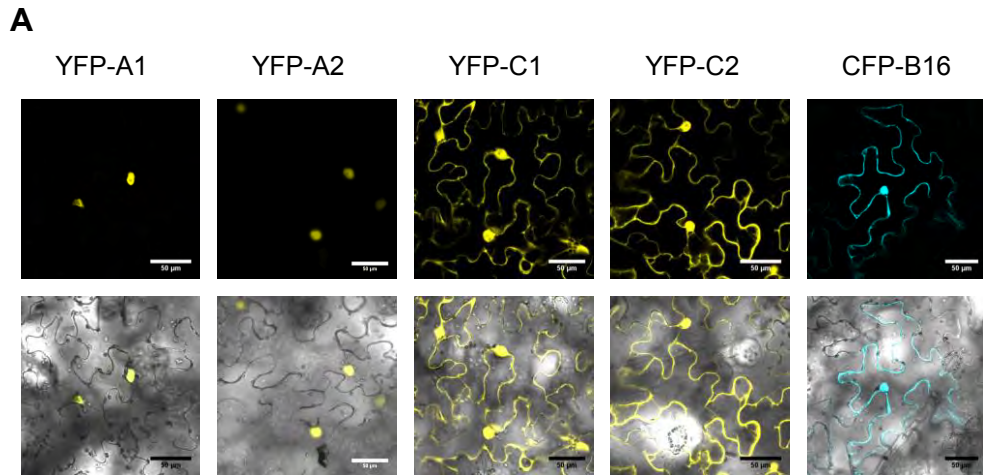


Figure 4: Subcellular localization and association dynamics of MtNF-YA1 and A2, MtNF-YB16, MtNF-YC1 and C2

A) NF-YA subunits are nuclear while NF-YB and NF-YC subunits are nucleocytoplasmic. The YFP-NF-YAs or NF-YCs and CFP-NF-YB16 fusions were introduced in *N. benthamiana* cells by agroinfiltration. The confocal images of fluorescence channel alone (upper panel) or fluorescence merge to bright field channel (lower panel) were obtained for each construct. Bar=50µm. (B) The CFP-NF-YB16 together with 3HA-NF-YC2 or 3HA-NF-YC2** were introduced in *N. benthamiana* cells by agroinfiltration. The confocal images of fluorescence channel alone (upper panel and magnification for the middle panel) or fluorescence merge to bright field channel (lower panel, magnification) were obtained for each construct. Bar=50µm. (C) Proteins were extracted from leaves agroinfiltrated with CFP-NF-YB16 + 3HA-NF-YC2 or CFP-NF-YB16 + 3HA-NF-YC2**, subjected to SDS-PAGE, and analyzed by immunoblot with αGFP and αHA antibodies, revealing the presence of a single band with the expected size for each construct.

(Figure 3A and Figure S4B). We were therefore able to validate the formation of four different NF-Y complexes involving NF-YA1 or NF-YA2, NF-YB16, NF-YC1 or NF-YC2.

To confirm the formation of these heterotrimers *in planta*, we performed co-immunoprecipitation (CoIP) experiments in *N. benthamiana*. For this purpose we co-expressed YFP-tagged MtNF-YA1, or MtNF-YA2 or the corresponding protein interacting mutants (MtNF-YA1* and MtNF-YA2*) with a 3HA-tagged MtNF-YC1 or MtNF-YC2 and MtNF-YB16. The immunoprecipitation was performed using anti-GFP antibodies (that recognize YFP) and the presence of NF-YB and NF-YC subunits, was then checked using anti-HA antibodies on western blots. While in the presence of mutated forms of NF-YA proteins no interaction with MtNF-YC1 or C2 and MtNF-YB16 could be observed, trimer formation could be demonstrated when we used the native NF-YA proteins (Figure 3B). In addition, using YFP-tagged proteins, we could show that all native or mutated NF-YA subunits localized to the nucleus, showing that the mutations didn't affect the subcellular localization of NF-YA subunits and strongly suggesting that we co-immunoprecipitated nuclear NF-Y heterotrimers (Figure S5). In summary we could show here the existence both in yeast and *in planta* of four different NF-Y complexes, involving the MtNF-YA1 and A2 subunits

Subcellular localization and relocalization of MtNF-YB16 and MtNF-YC1 and C2

We then studied further the subcellular localization and association dynamics the NF-YB / NF-YC heterodimer. Using YFP- or CFP-fusions transformed into *N. benthamiana* cells, we showed that MtNF-YA1 and MtNF-YA2 localize strictly to the nucleus as already described in [13], while MtNF-YC1 and C2 or MtNF-YB16 are found both in the nucleus and in the cytoplasm (Figure 4A). As this localization also corresponds to the localization of the fluorescent proteins CFP or YFP alone, we checked the integrity of the chimeric proteins by a western blot analysis and anti-GFP antibodies (Figure S6). For all constructions, the main band was found at the correct size corresponding to the fusion proteins (58kDa for YFP-NF-YCs and 40kDa for CFP-MtNF-YB16) thus showing that the fluorescent tag was not cleaved. In the plant literature it has been shown that NF-YB subunits are relocalized in the nucleus via its interaction with a NF-YC subunit [27,33]. Therefore, we tested the ability of a 3HA-tagged version of MtNF-YC2 or MtNF-YC2** to modify the subcellular localization of a CFP-NF-YB16 fusion. While the co-expression of 3HA-MtNF-YC2** does not affect the localization of CFP-MtNF-YB16, the co-expression of the native MtNF-YC2 leads to a strong nuclear

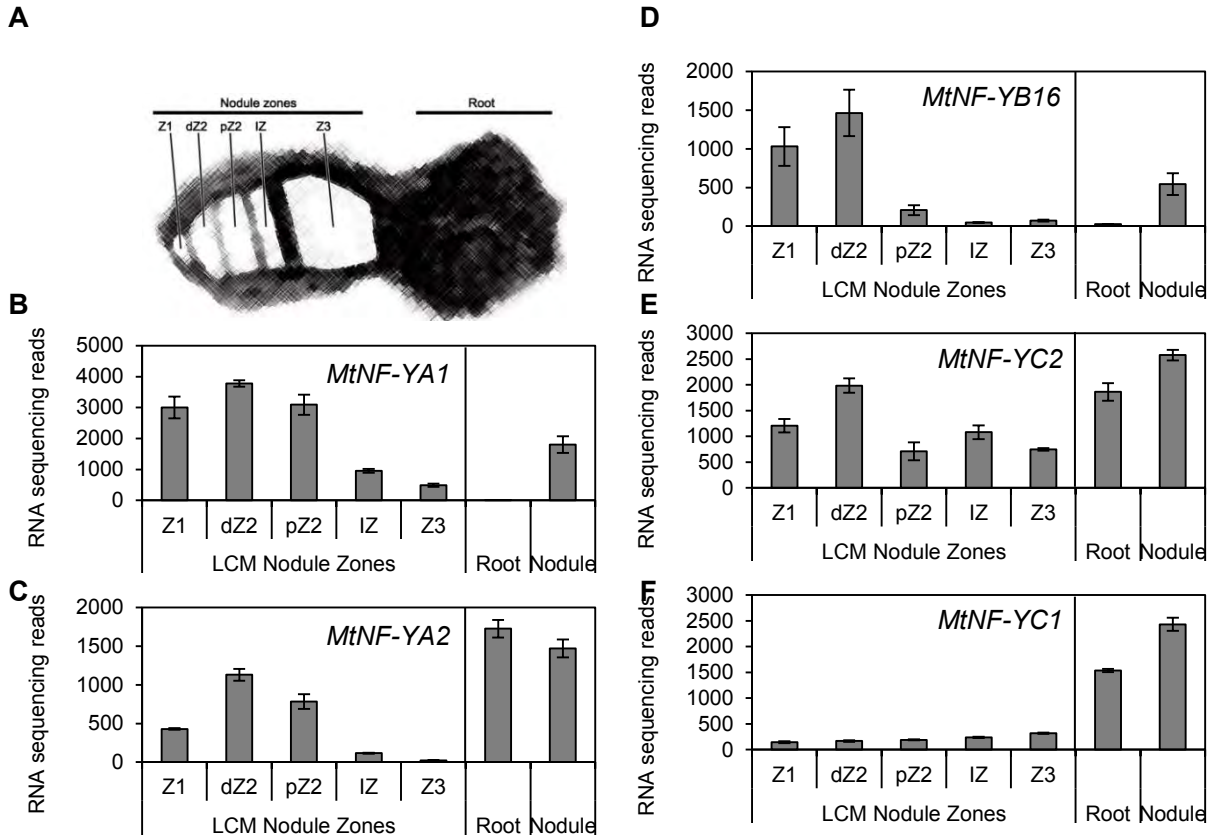


Figure 5: *MtNF-YB16* and *MtNF-YC2* have a similar expression pattern than *MtNF-YA1* and *MtNF-YA2*
 (A) Schematic representation of the five laser microdissected zones from a 15-day-old nodule. Expression analysis of *MtNF-YA1* (B), *MtNF-YA2* (C), *MtNF-YB16* (D), *MtNF-YC2* (E) and *MtNF-YC1* (F) using RNAseq in entire organs or following laser microdissection. DESEQ-normalized RNA-seq values from three biological repetitions are shown. 15 day-old laser-dissected nodule zones correspond to the meristematic zone (Z1), apical and distal infection zone (dZ2 and pZ2), nodule interzone (IZ) and the nitrogen fixing zone (Z3). Root and Nodule samples represent entire organs collected 10 dpi.

concentration of the fluorescence protein (Figure 4B). In conclusion, the heterodimer MtNF-YB16 and MtNF-YC1 or C2 is found both in the nucleus and the cytoplasm but the interaction between the two subunit leads to a concentration of the proteins into the nucleus.

The symbiotic expression patterns of the NF-Y subunits

To be able to interact with each other during nodule development in *M.t.*, the genes encoding the 5 different NF-Y subunits found to interact in yeast and Tobacco need to be expressed in the same symbiotic tissues at the same time. We thus took advantage of the public expression data available on symbiotic tissues. The Symbimics project, provided, in particular, transcriptomic data based on laser capture micro-dissection associated with deep RNA sequencing for the different nodule zones and classify genes into different clusters according to their expression profile in nodules [34]. We already published these data for *MtNF-YA1* and *MtNF-YA2* which are mainly expressed in the apical part of the nodule, and both belong to the Symbimics cluster 3 [13,34] (Figure 5). Interestingly, *MtNF-YB16* has a very similar expression pattern especially to *MtNF-YA1*, being absent in roots but highly induced in nodules with a main expression in the meristematic and distal infection zone. *MtNF-YB16* belongs to the Symbimics expression cluster 4 which is very similar to the cluster 3 to which *MtNF-YA1* and *A2* belong (Figure 5). Both NF-YC subunits are expressed in nodules but the expression pattern of *MtNF-YC2* is closer to that of *MtNF-YA1* and *A2*, and it also belongs to the same expression cluster 3 according to [34]. *MtNF-YC1* is more weakly expressed in nodules than *MtNF-YC2* and is substantially present in all nodule zones (it belongs to expression cluster 13 Figure 5, [34]). To get a more global overview of NF-Y gene expression in nodules we compared the expression of the 5 above-cited genes to that of all other *M.t.* NF-Y genes. As can be seen in Table S1, only two NF-YB encoding genes have an expression pattern in nodule tissues (apical expression and sufficient expression level), compatible with that of *MtNF-YA1* and *A2*, i.e., *MtNF-YB16* and *MtNF-YB18*. Interestingly, these two genes are very close and the encoded proteins belong to the same phylogenetic subgroup (Figure 2A). Concerning NF-YC subunits, *MtNF-YC1* and *C2* are clearly the only NF-YC encoding genes with a significant expression level in nodules (Table S1). Given these expression data, there could thus be eight different symbiotic NF-Y heterotrimers, MtNF-YA1 and A2 / MtNF-YB16 and B18 / MtNF-YC1 and C2.

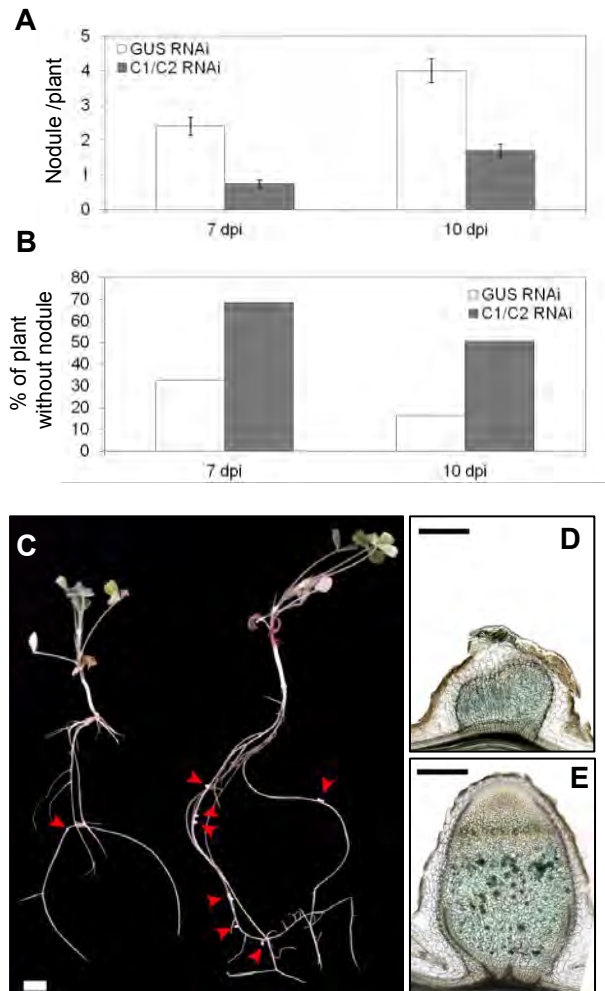


Figure 6: The down regulation of *MtNF-YC1* and *C2* affects nodule development

(A) Number of nodules were counted 7 and 10 days after *S. meliloti* inoculation in both control *GUS* RNAi (white boxes) and *NF-YC* RNAi (grey boxes) composite plants. Results shown are the average number of nodules counted per composite plants from 150 plants in two separated biological replicates. Error bars correspond to the standard deviation. (B) Graphic representation of the percentage of plants showing no nodules in the same dataset than (A). (C) Picture of entire *NF-YC*-RNAi (left) and control *GUS*-RNAi plants at 17 dpi. Red head arrows highlight the nodules (Bar=5 mm). (D-E) Agrotransformed plants *NF-YC*-RNAi (D) and control *GUS*-RNAi (E) were grown in sepiolite and harvested 30 days after *LacZ*-expressing *S. meliloti* inoculation. Nodules were isolated and after a *LacZ* revelation (blue) longitudinal sections (50µm thick) were performed. Bar = 0.2 mm

Nodule organogenesis is affected in the NF-YC1/2 RNAi

To prove that MtNF-YC1 and MtNF-YC2 indeed play a symbiotic role we designed a reverse genetic approach using RNAi. First we designed a construct that specifically silenced NF-YC2, (Figure S7A), but no clear effect, neither on timing of nodulation, nor on nodule number or nodule morphology could be observed. Because we suspected a functional redundancy between MtNF-YC1 and MtNF-YC2, we additionally designed an RNAi construct that silenced both genes but not the closely related NF-YC4 (Figure S7B) and that we called *NF-YC-RNAi*. After transformation of this construct into transgenic roots we first observed a significant (more than two-fold) reduction in the number of nodules compared to control plants both at 7 and 10 days after rhizobial inoculation (dpi) (Figure 6A). In addition approximately 50% of the NF-YC RNAi plants showed no nodules at all 10 days after inoculation while this number was down to 15% in control plants (Figure 6B). In addition to affecting nodule number, the *NF-YC-RNAi* construct also clearly affected nodule development. Indeed most nodules stayed small and did not develop the typical nodule organization into differentiated zones found in control plants [7] (Figure 6C-E).

Interestingly, these phenotypes are reminiscent of those observed using *MtNF-YAI-RNAi* constructs [16] or the *Mtnf-ya1-1* mutant [17]. In the case of *MtNF-YAI* and *A2*, we also observed effects on earlier stages of the symbiotic interaction, i.e. on rhizobial infection and Nod Factor signal transduction. When we examined infection thread morphology in *NF-YC-RNAi* roots, no significant difference with control plants could however be observed (Figure S8). We then looked at the induction of NF-induced genes like *MtENOD11*, *MtERN1* or *MtNSP1*, whose expression upon NF-treatment is clearly reduced in *NF-YA-RNAi* plants [13]. Despite the two and seven fold reduction observed in *MtNF-YC1* and *MtNF-YC2* expression, respectively, no significant reduction in *MtENOD11*, *MtERN1* or *MtNSP1* expression, following NF-treatment, was observed in NF-YC-RNAi roots compared to control roots (Figure S9).

Functional analysis of symbiotic NF-YBs

We carried out further functional analyses using RNAi strategies to investigate the symbiotic role of MtNF-YB16. A specific RNAi construct that down-regulates the expression of *MtNF-YB16* (5 fold) but not the closely related *MtNF-YB18* was used. The effect of this construct on nodule formation was analyzed both qualitatively (morphogenesis) and quantitatively (nodule number). However, no significant effect on nodulation could be

observed (Figure S10A). Furthermore, as for NF-YC1&2, we designed a more general RNAi construct, that we called *NF-YB-RNAi*, using a conserved domain of *MtNF-YB16*, and could show that all the closely related MtNF-YB subunit encoding genes, (i.e., NF-YB16, B18, B6, B11) but not the more distant NF-YB2, 8, 13 were silenced when NF-YB-RNAi was expressed in transgenic roots (Figure S10A). However after inoculation of these roots by *Sinorhizobium meliloti*, no visible effect neither on nodule number nor on nodule morphology could be observed (Figure S10B-C).

Discussion

In this manuscript, we describe the identification and characterization of the NF-YB and NF-YC subunits of *Medicago truncatula* that interact with MtNF-YA1 and MtNF-YA2 to form a NF-Y trimer acting during the symbiotic rhizobium-legume interaction.

For this purpose, we first identified MtNF-YC1 and MtNF-YC2 as interactors of MtNF-YA1 in a yeast two hybrid screen, and then MtNF-YB16 and MTNF-YB13 as interactors of NF-YC2 in a second consecutive screen. All of these interactions were confirmed in yeast using two by two Y2H assays. Subsequently, using yeast three hybrid assays, we have been able to show that four different *Medicago* NF-Y trimers, involving MtNF-YA1 and A2, MtNF-YB16 and MtNF-YC1 and C2 can associate in yeast and *in planta*. Interestingly, this heterotrimer formation is depending on key amino acids within the conserved domain of both NF-YA and NF-YC proteins. The substitution of the lysine 171 in MtNF-YA1 and 173 in MtNF-YA2 by a glutamic acid suppresses the ability of these proteins to bind to the MtNF-YB16 / MtNF-YC1 or C2 dimer. Similarly, the substitution of the Isoleucine 136 and leucine 139 into aspartic acid and glutamic acid respectively in MtNF-YC2 affect the capacity of this protein to bind both the tested NF-YB and NF-YA subunits. These mutations, that were identified and characterized in the mammal NF-Y proteins [29,32] were never studied in the plant kingdom before. Our experimentations thus suggest that the mechanisms of NF-Y subunit association are likely to be conserved between animals and *M.t.* and probably other plants too. The fact that we can see an interaction in yeast between MtNF-YA1 and A2 and MtNF-YC1 and C2 is surprising as it has been described that to be able to form a NF-Y trimer the NF-YA subunits first require the formation of a NF-YB / NF-YC dimer [21]. However other reports of NF-YA subunits interacting two-by-two with NF-YB or NF-YC subunits exist in plants. Indeed, the LjNF-YA1 is able to interact with LjNF-YB1 from *Lotus japonicus*, using BiFC [18], the *Arabidopsis thaliana* AtNF-YA3 was shown to

interact with AtNF-YC1 and C4 in yeast [27], and the *Oryza sativa* OsHAP3a (OsNF-YB2) interacts with OsHAP2f (OsNF-YA10) and OsHAP2g (OsNF-YA6) in yeast but not *in vitro* [35]. All these positive two by two interactions with NF-YA protein were found in systems that possess endogenous NF-Y subunits. Given the relatively weak interaction specificity between NF-YB and NF-YC subunits the endogenous NF-YB or NF-YC subunits are probably capable of forming dimers with the exogenous NF-YB or NF-YCs thereby allowing the exogenous NF-YA protein to interact. This hypothesis is, among other things, supported by the fact that the yeast ScHAP2 and 3 (NF-YA and B) are capable of interacting with the rat CBF-C (NF-YC) to form a stable NF-Y complex able to bind CCAAT-boxes [36].

The nuclear function of the NF-Y transcription factor logically implies that all three NF-Y subunits have to be present in that cellular compartment. The NF-YA subunit has always been found in the nucleus across kingdoms whereas in animal systems NF-YB and NF-YC are found both in the cytoplasm and the nucleus [23]. The NF-YB and NF-YC subunits dimerise in the cytoplasm and this dimer is then imported into the nucleus via a different mechanism (importin 13) than NF-YA (importin-beta pathway)[22]. We have found similar results for our Medicago NF-Y proteins. Indeed, while MtNF-YA1 and A2 clearly localize to the nucleus of tobacco cells, the NF-YB and NF-YC subunits studied here are found in both nuclei and cytoplasm. When MtNF-YB16 was infiltrated together with MtNF-YC2 but not the MtNF-YC2** mutant, a concentration of MtNF-YB16 into the nucleus was observed. Similar concentration effects have also been observed in Arabidopsis [27,33] suggesting that some aspects of NF-Y complex formation could be conserved across kingdoms.

Our interaction studies suggest that there could be at least 6 different NF-Y complexes around MtNF-YA1 and A2. Interestingly these results are in accordance with those from our gene expression analysis in different nodule tissues. Indeed if we consider those NF-YB and NF-YC encoding genes whose expression is both abundant in apical nodule tissues like MtNF-YA1 and expressed at a sufficient level to play a potentially significant role, almost the same subunit as those selected by interaction studies come up: i.e. MtNF-YB16, MtNF-YB18 and MtNF-YC1 and C2. Of course in the absence of expression studies at the protein level, we cannot be sure of the impact of these transcriptional regulations on NF-Y proteins, especially as mechanisms of posttranscriptional, translational and post-translational control of expression have been reported for NF-Ys [15,16,37].

A further proof of the involvement of different NF-YB and NF-YC subunits in the rhizobium-legume interaction comes from functional studies using RNAi strategies. Concerning the NF-YC subunits, silencing *MtNF-YC2* was not sufficient to observe any effect on nodulation, however, when we used an RNAi construct silencing both *MtNF-YC2* and its closest paralog *MtNF-YC1*, a clear effect on nodulation was observed. Indeed, silencing both these genes led to a significant reduction in the number of nodules and a two-fold increase in the number of plants not presenting any nodules. In addition, the nodules formed appeared small and clearly affected in their development. This symbiotic phenotype is reminiscent of what we observed in *M.t.* using RNAi lines against *MtNF-YA1*, or the *nf-ya1-1* KO line [16,17]. This result thus provides strong additional evidence for the functional involvement of *MtNF-YC1* and *C2* in NF-Y complexes containing *MtNF-YA1* and regulating nodule development in *M.t.* Furthermore, *MtNF-YC1* and *C2* are orthologous to *PvNF-YC1*, a NF-YC subunit of common bean belonging to a relatively distant family of legumes [38] with determinate type of nodules, whose development differs significantly from that of indeterminate nodules. However, despite this phylogenetic distance, the symbiotic phenotypes described upon silencing of *PvNF-YC1* are similar to what we describe here for *MtNF-YC-RNAi* or published for *Mtnf-ya1-1* [19]. Our results thus suggest the existence of an evolutionary conserved group of NF-YA and NF-YC encoding genes that interact within NF-Y complexes regulating nodulation across the legume family.

No effect of the *NF-YC-RNAi* construct on infection, preinfection or early NF-induced signal transduction was observed as is the case for the *NF-YA-RNAi* construct (Laloum&Baudin, 2014). This difference could be due to the RNAi strategy that may in this case not silence the expression of NF-YC1&2 sufficiently.

Concerning the NF-YB members of the complex no effect on nodule development could be observed with the NF-YB-RNAi constructs used. This might be due to functional redundancy. Indeed, contrary to NF-YA1&2 and NF-YC1&2, for which both expression analysis and phylogenetic analysis suggest the existence of "symbiosis-specialized" NF-Y genes, the situation is less clear for the NF-YB family, with the existence of many more genes (14), the absence of a clear symbiotic subgroup and generally more ubiquitous expression patterns.

In addition our interaction tests have, with the exception of the lec-subgroup of genes, not revealed much interaction specificity, potentially allowing many NF-YB subunits to interact with NF-YA1&2/NF-YC1&2. It remains however interesting to note that NF-YB16,

our best candidate as a NF-YB interactor of NF-YA1&2/NF-YC1&2 is the ortholog of LjNF-YB1, that has been shown recently in Lotus to play an important role during nodule organogenesis by promoting and/or stimulating cortical cell divisions under the direct control of the NIN TF (Soyano et al., 2013). As a whole our results indicate the existence of at least four different NF-Y complexes regulating nodulation, involving NF-YA1 and NF-YA2, NF-YC1 and NF-YC2, NF-YB16 and most probably several other NF-YB subunits. Given the homology of these NF-YB&C-encoding genes with NF-Y genes shown in other legumes to play important symbiotic roles we propose that these four different trimeric NF-Y complexes have specialized during evolution to control nodulation in leguminous plants.

Materials and Methods

Plasmid construction

All the DNA fragment used were first introduced in the pK207 vector (modified pDONR207 allowing the insertion of DNA fragments by an AscI / PmeI enzymatic digestion, L. Deslandes, Laboratory of Plant-Microbe Interactions), and then recombined into the appropriate destination vectors, according to the Gateway manufacturer's protocol. For the yeast two hybrid experimentations, we used modified pBD and pAD vectors for Gateway recombination (Deslandes, Laboratory of Plant-Microbe Interactions). The yeast three hybrid assays were performed with the pVT-U102 (Nemo Peeters, [39]). RNAi RNAi fragments were cloned into the pFRN destination vector (derived from pFGC5941; NCBI accession number AY310901 [40]). For subcellular and CoIP approaches, ORFs were recombined into the PAM-PAT p35S:YFP:Gw or p35S:3HA:Gw destination vectors (L. Deslandes, Laboratory of Plant Microbe Interactions). Finally, for BiFC assay, ORFs were recombined into the pGPTVII.Bar.YN-GW and pGPTVII.Bar.YC-GW for the fusion of the N- and C-terminus fragments of split YFP respectively [31]

Plant Material and transformation

The *Medicago truncatula* "Jemalong A17" line was used for all hairy root transformations. Plant seeds were scarified and surface sterilized prior to germination on inverted agar plates and used for *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation as described in (<http://www.noble.org/medicagohandbook>). pFRN constructs were electroporated in *A. rhizogenes* ARquA1 [41] Composite plants harboring RNAi constructs

were selected in Fahraeus medium supplemented with 25 mg/mL kanamycin and transferred after 3 weeks. Kan⁺ plant were transferred to pouch paper/agar plates (nitrogen and antibiotic free) as described by [42] or in sepiolite medium-containing pots as described by [17]. After 5 to 7 d, root systems of individual composite plants were inoculated with *Sinorhizobium meliloti* strain. For *N. benthamiana* agroinfiltration, the *Agrobacterium tumefaciens* strains GV3101 (for BiFC vectors) or GV3103 (for PAM-PAT vector) were electroporated with the corresponding plasmids. Overnight cultures of the strains carrying each construct or the p19 silencing suppressor plasmid [43] were centrifuged and pellets resuspended in 5 mL of Agromix (10mM MgCl₂, 10mM MES/KOH, pH 5.6, and 150mM acetosyringone) and incubated at room temperature for 3 h. Suspensions were brought to an optical density at 600 nm of 1 with Agromix. Different construct combinations were prepared by mixing equal volumes of each culture, diluted to obtain a final optical density at 600 nm of 0.25. The *Agrobacterium tumefaciens* mixture) were co-infiltrated into 3-week-old *N. benthamiana* leaves using a 1-mL syringe. Infiltrated plants were kept at 21°C in a growth chamber (16-h photoperiod, 70 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ light intensity). Samples are treated from 50 to 70 hours after agroinfiltration.

Yeast two and three hybrid (Y2H, Y3H)

The sequences coding the pENTRY vector containing MtNF-YA1 or MtNF-YC2 were recombined in pBD vector (Clontech) using the Gateway technology. The baits were then transformed into the yeast strain AH109 using the LiAc-mediated yeast transformation protocol as described in the Yeast Protocols Handbook (Clontech). The resulting yeast strains were then transformed by the respective cDNA library. The yeast-two-hybrid cDNA library from NF-treated root hairs are as described in [44]. The nodule yeast-two-hybrid cDNA library was made by the Dualsystems company (<http://www.dualsystems.com/>) from cDNAs coming from 4 and 19 days-old nodules. Approximately 4×10^6 and 1.6×10^6 clones were screened for respectively MtNF-YA1 and MtNF-YC2 on minimal medium lacking His, Tryp and Leu and supplemented with 5mM 3-amino-triazol. The HIS³⁺ yeast colonies were recovered after 3 or 4 d of growth at 28°C and retested for growth on selective medium. The cDNA inserts of positive clones were amplified by PCR from yeast cell extracts and sequenced after a PCR product purification step. Plasmid rescue of non-redundant candidates was then performed. Two by two targeted Y2H approaches were performed by a double transformation of AH109 yeast with pBD and pAD vectors. The drop test for the interaction

test were performed using 4µl of yeast resuspended in water and spotted on selective media. The -Leu, -Tryp, -His, -Ade, -Ura AH111 yeast strain were generated using a 5FOA selection. A rich-media liquid culture of AH109 was plate on 5FOA containing YPDA plates and ura minus colonies were selected. The phenotype of these strains was verified and used as recipient strain for the URA pVT-U102 plasmids [39]. The AH111 was first transformed with pAD-MtNF-YB16 using the LiAc-mediated yeast transformation. The resulting yeast strains were then double transformed by the pBD and pVTU-102 constructions and the interaction were tested on minimal medium lacking His, Tryp, Leu and Ura and supplemented with 5mM 3-amino-triazol.

Quantitative RT-PCR Analysis

The gene expression analyses were performed as described in [13]. Primers sequences used are shown in Table S1.

Co-immunoprecipitation

100mg of infiltrated *N. benthamina* leaves were fixed in 0.1% (v/v) formaldehyde for 5min under vacuum. Cross-linked protein complexes were then extracted using the NEB buffer (25mM Tris pH 7.5, 500mM NaCl, 1mM DTT, 10% glycerol, 0.2% Triton, 5mM CaCl₂) supplemented with 0.2g of polyvinylpolypyrrolidone and 165 µL of protease inhibitors (Sigma-Aldrich cocktail) per 10mL of NEB. After 30min of shaking at 4°C the crude extract was then centrifuged at 5000rpm for 15 minutes in a refrigerated centrifuge. 40µL of µMACS anti GFP microbeads (Miltenyi Biotec) were then added to the slurry. The immunopurification of YFP-tagged NF-Y proteins was performed as described in the user protocol of µMACS epitope tag protein isolation kit (Miltenyi Biotec). The purified proteins complexes in the elution buffer were then decross-linked in the NEB buffer lacking polyvinylpolypyrrolidone (v/v) first 2 hours at 55°C and then overnight at room temperature. A part of the crude extract was processed in parallel for use as the input control. Samples were finally run in SDS-PAGE and subjected to immunoblots with the corresponding antibodies. For the immunoblots, the monoclonal α-GFP from mouse (Roche) was used with the mouse horseradish peroxidase secondary antibody and the monoclonal α-HA peroxidase high-affinity (3F10, Roche). Immobilon chemiluminescent reagent (Millipore) was used to detect the proteins.

Microscopy and Imaging

For BIFC assay and subcellular localization, *N. benthamiana* leaf disks were infiltrated with water and mounted in microscope slides. Samples were imaged using a Leica TCS SP2 AOBS confocal laser-scanning microscope equipped with a long-distance 40x water-immersion objective (HCX Apo L 0.80). The 458- and 514-nm argon laser lines were used to excite CFP and YFP, respectively. Specific emission windows of 460 to 500 nm and 530 to 560 nm were used for CFP and YFP respectively. Images were processed using the Leica confocal and ImageJ softwares. The images shown are maximal projections of selected planes of a Z-stack or three-dimensional reconstructions of confocal image stacks. Nodule tissues were sliced into 50- to 100- μ m-thick sections using a vibrating-blade microtome (Leica VT1000 S). Nodule sections (50–100 μ m thick) were fixed in 2% glutaraldehyde/0.1 M potassium phosphate buffer and stained for β -galactosidase activities for 1 hour. Microscopic observations were performed using a light microscope (Axioplan 2 Imaging; Carl Zeiss), and a CCD camera (AxioCam MRc; Carl Zeiss).

Acknowledgments

We would like to thank Nemo Peeters for his kind gift of AH111 yeast strain and the pVT-U102 vector; Laurent Deslandes for most of Gateway vectors and precious technical advices and Giles Oldroyd for the BiFC vectors. This work was funded by the ANR-09-BLAN-0033-01 HAPIHUB and supported by the French Laboratory of Excellence project “TULIP” (ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02). T.L. was funded by a grant from the French Ministry of Education and Research, M.B. by an INRA CJS (Contrat Jeune Scientifique)

References

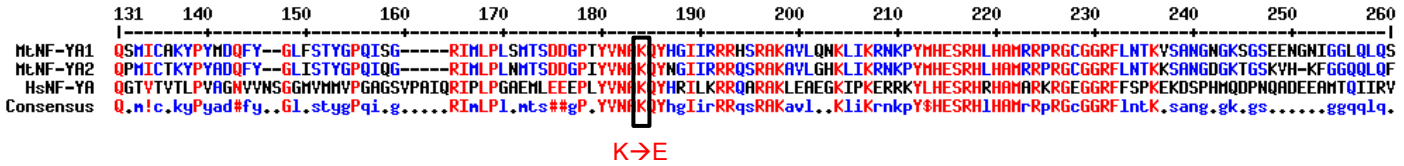
1. Oldroyd G, Murray J, Poole P, Downie J (2011) The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *Annual Review Genetics*, Vol 45 45: 119-144.
2. Oldroyd GED (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology* 11: 252-263.
3. Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, et al. (1990) Symbiotic host-specificity of *rhizobium-meliloti* is determined by a sulfated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344: 781-784.

4. Xiao TT, Schilderink S, Moling S, Deinum EE, **Kondorosi E**, et al. (2014) Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. Development accepted.
5. Fournier J, Timmers ACJ, Sieberer BJ, Jauneau A, Chabaud M, et al. (2008) Mechanism of Infection Thread Elongation in Root Hairs of *Medicago truncatula* and Dynamic Interplay with Associated Rhizobial Colonization. *Plant Physiology* 148: 1985-1995.
6. Oldroyd GED, Downie JA (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* 59: 519-546.
7. Vasse J, de Billy F, Camut S, Truchet G (1990) Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J Bacteriol* 172: 4295-4306.
8. Singh S, Katzer K, Lambert J, Cerri M, Parniske M (2014) CYCLOPS, a DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development. *Cell Host Microbe* 15: 139-152.
9. Schauser L, Roussis A, Stiller J, Stougaard J (1999) A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* 402: 191-195.
10. Smit P, Raedts J, Portyanko V, Debelle F, Gough C, et al. (2005) NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* 308: 1789-1791.
11. Kalo P, Gleason C, Edwards A, Marsh J, Mitra R, et al. (2005) Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* 308: 1786-1789.
12. Middleton P, Jakab J, Penmetsa R, Starker C, Doll J, et al. (2007) An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for nod factor signal transduction. *Plant Cell* 19: 1221-1234.
13. Laloum T, Baudin M, Frances L, Lepage A, Billault-Penneteau B, et al. (2014) Two CCAAT box-binding transcription factors redundantly regulate early steps of the legume-rhizobia endosymbiosis. *Plant J*.
14. El Yahyaoui F, Kuster H, Ben Amor B, Hohnjec N, Puhler A, et al. (2004) Expression profiling in *Medicago truncatula* identifies more than 750 genes differentially expressed during nodulation, including many potential regulators of the symbiotic program(1 w). *Plant Physiology* 136: 3159-3176.
15. Combier JP, de Billy F, Gamas P, Niebel A, 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.
16. Combier JP, Frugier F, de Billy F, Boualem A, El-Yahyaoui F, et al. (2006) MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes & Development* 20: 3084-3088.
17. Laporte P, Lepage A, Fournier J, Catrice O, Moreau S, et al. (2014) The CCAAT box-binding transcription factor NF-YA1 controls rhizobial infection. *J Exp Bot* 65: 481-494.
18. Soyano T, Kouchi H, Hirota A, Hayashi M (2013) NODULE INCEPTION Directly Targets NF-Y Subunit Genes to Regulate Essential Processes of Root Nodule Development in *Lotus japonicus*. *Plos Genetics* 9.
19. Zanetti ME, Blanco FA, Beker MP, Battaglia M, Aguilar OM (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.
20. Dolfini D, Gatta R, Mantovani R (2012) NF-Y and the transcriptional activation of CCAAT promoters. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 47: 29-49.

21. Mantovani R (1999) The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* 239: 15-27.
22. Kahle J, Baake M, Doenecke D, Albig W (2005) Subunits of the heterotrimeric transcription factor NF-Y are imported into the nucleus by distinct pathways involving importin beta and importin 13. *Molecular and Cellular Biology* 25: 5339-5354.
23. Frontini M, Imbriano C, Manni I, Mantovani R (2004) Cell cycle regulation of NF-YC nuclear localization. *Cell Cycle* 3: 217-222.
24. Nardini M, Gnesutta N, Donati G, Gatta R, Forni C, et al. (2013) Sequence-Specific Transcription Factor NF-Y Displays Histone-like DNA Binding and H2B-like Ubiquitination. *Cell* 152: 132-143.
25. Laloum T, De Mita S, Gamas P, Baudin M, Niebel A (2013) CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many? *Trends in Plant Science* 18: 157-166.
26. Petroni K, Kumimoto RW, Gnesutta N, Calvenzani V, Fornari M, et al. (2012) The Promiscuous Life of Plant NUCLEAR FACTOR Y Transcription Factors. *Plant Cell* 24: 4777-4792.
27. Hackenberg D, Wu YF, Voigt A, Adams R, Schramm P, et al. (2012) Studies on Differential Nuclear Translocation Mechanism and Assembly of the Three Subunits of the Arabidopsis thaliana Transcription Factor NF-Y. *Molecular Plant* 5: 876-888.
28. Calvenzani V, Testoni B, Gusmaroli G, Lorenzo M, Gnesutta N, et al. (2012) Interactions and CCAAT-Binding of Arabidopsis thaliana NF-Y Subunits. *Plos One* 7.
29. Mantovani R, Lio X, Pessara U, Vanhuisjduijnen R, Benoist C, et al. (1994) Dominant-negative analogs of NF-YA. *Journal of Biological Chemistry* 269: 20340-20346.
30. Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* 9: 789-798.
31. Hirsch S, Kim J, Munoz A, Heckmann AB, Downie JA, et al. (2009) GRAS Proteins Form a DNA Binding Complex to Induce Gene Expression during Nodulation Signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 21.
32. Kim I, Sinha S, deCrombrugge B, 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.
33. Liu J-X, Howell SH (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.
34. Roux B, Rodde N, Jardinaud MF, Timmers T, Sauviac L, et al. (2014) An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *Plant J* 77: 817-837.
35. Thirumurugan T, Ito Y, Kubo T, Serizawa A, Kurata N (2008) Identification, characterization and interaction of HAP family genes in rice. *Molecular Genetics and Genomics* 279: 279-289.
36. Sinha S, Maity SN, Lu J, de Crombrugge B (1995) Recombinant rat CBF-C, the third subunit of CBF/NFY, allows formation of a protein-DNA complex with CBF-A and CBF-B and with yeast HAP2 and HAP3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 1624-1628.
37. Reynoso MA, Blanco FA, Bailey-Serres J, Crespi M, Zanetti ME (2012) Selective recruitment of mRNAs and miRNAs to polyribosomes in response to rhizobia infection in *Medicago truncatula*. *Plant J*.

38. Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in microbiology* 17: 458-466.
39. Pazhouhandeh M, Dieterle M, Marrocco K, Lechner E, Berry B, et al. (2006) F-box-like domain in the poliovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1994-1999.
40. de Zélicourt A, Diet A, Marion J, Laffont C, Ariel F, et al. (2012) Dual involvement of a *Medicago truncatula* NAC transcription factor in root abiotic stress response and symbiotic nodule senescence. *Plant J* 70: 220-230.
41. Quandt HJ, Puhler A, 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.
42. Cerri MR, Frances L, Laloum T, Auriac MC, Niebel A, et al. (2012) *Medicago truncatula* ERN Transcription Factors: Regulatory Interplay with NSP1/NSP2 GRAS Factors and Expression Dynamics throughout Rhizobial Infection. *Plant Physiology* 160: 2155-2172.
43. Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant Journal* 33: 949-956.
44. Andriankaja A, Boisson-Demier A, Frances L, Sauviac L, Jauneau A, et al. (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.

A



B

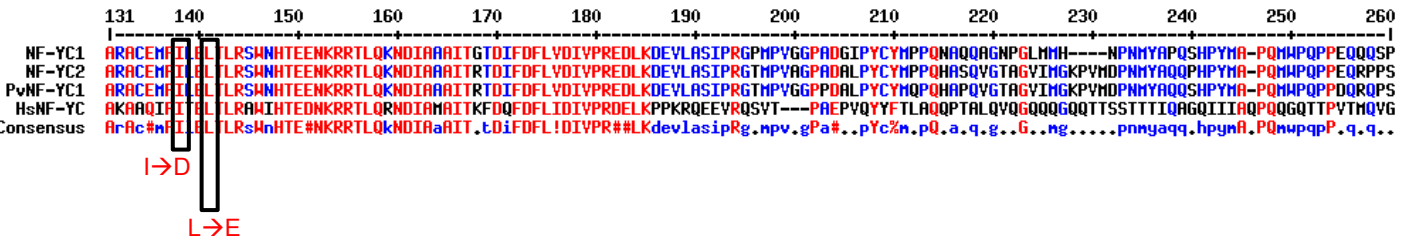


Figure S1 : Protein binding mutants of MtNF-YA1, MtNF-YA2 and MtNF-YC2

(A) Protein alignment of MtNF-YA1 and A2 with the human HsNF-YA using multalin. Black box highlight the mutated lysine 171 (MtNF-YA1*) or 173 (MtNF-YA2*). (B) Protein alignment of MtNF-YC1 and C2 with the phaseolus PvNF-YC1 and the human HsNF-YC using multalin. Black boxes highlight the mutated isoleucine 136 and leucine 139 in MtNF-YC2**.

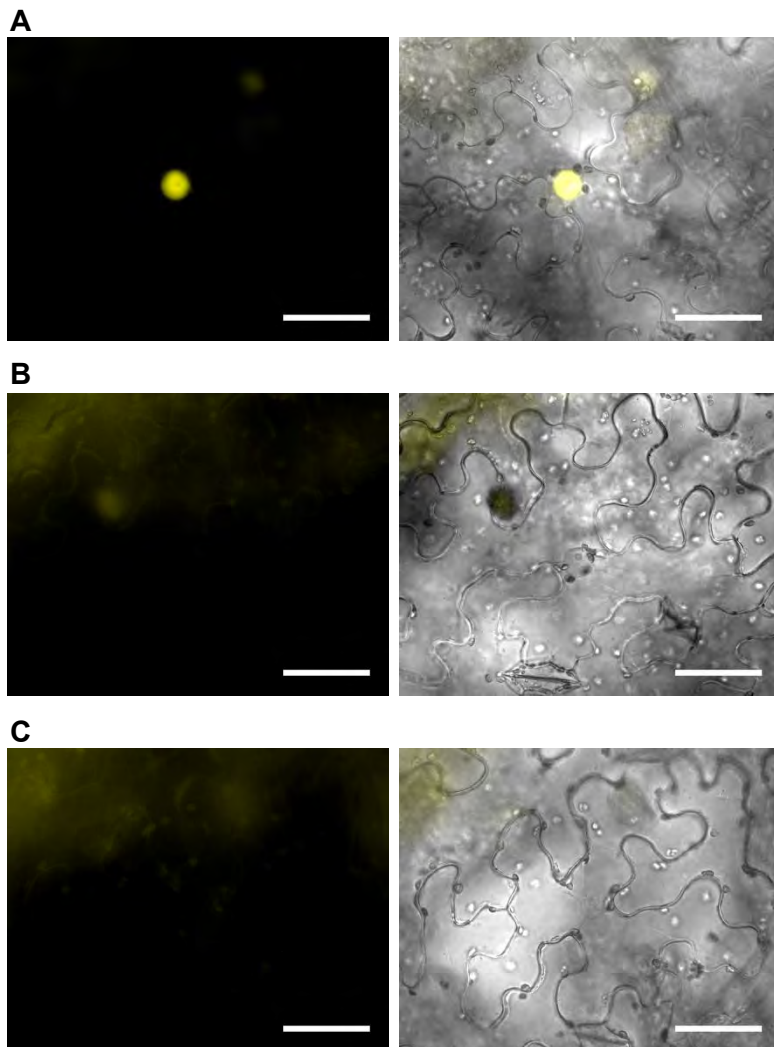


Figure S2 : MtNF-YC2 does not interact with MtNF-YA1 *in planta*
Bi-molecular fluorescence complementation assay in *N. benthamiana* leaves were agroinfiltrated with nYFP-NSP1/cYFP-NSP2 (A, positive control [x]), nYFP-NF-YA1/cYFP-NF-YC2 (B) or nYFP-NF-YC2/cYFP-NF-YA1 (C). Images of the YFP fluorescence (left panels), and a merge between YFP and bright field images (right panels) are shown. Bar = 50 μ m.

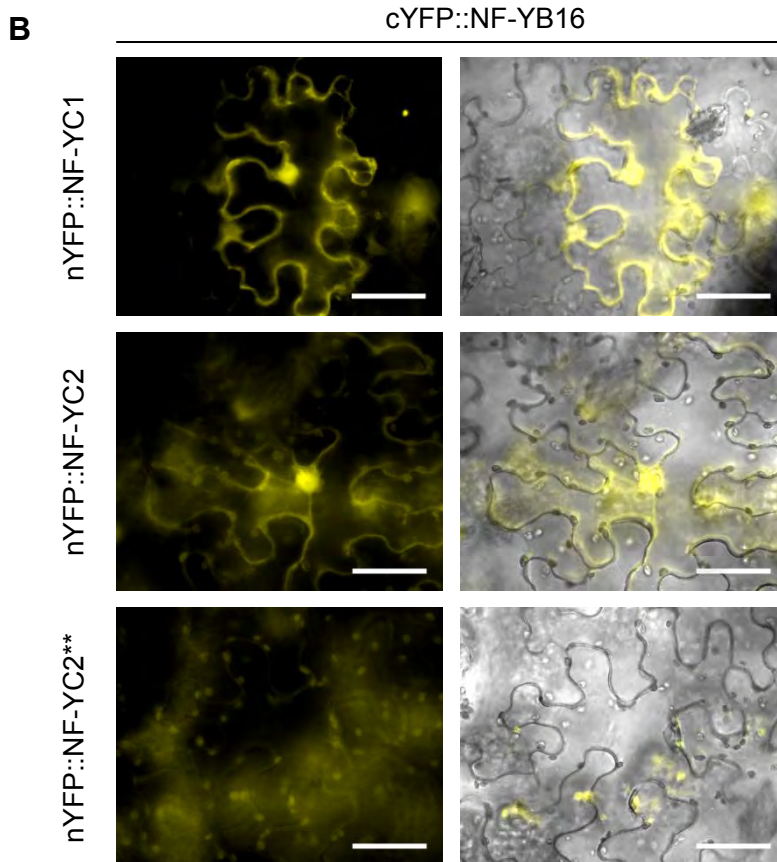
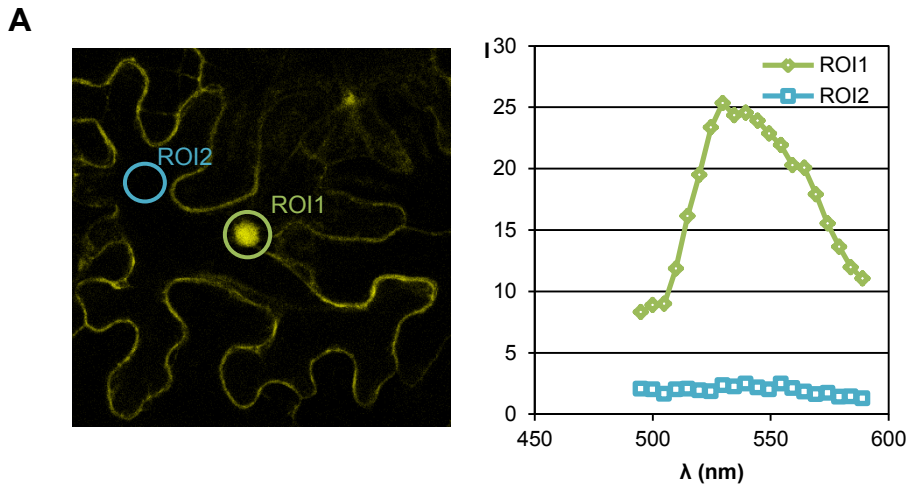


Figure S3 : MtNF-YB16 interact with MtNF-YC1 and C2 in planta

Bi-molecular fluorescence complementation assay. (A) lambda scan of the fluorescence provide by the interaction between cYFP-NF-YC2 and nYFP-NF-YB16. The fluorescence intensity of two region of interest (ROI, left panel) after an excitation at 458nm was plotted in function the wave length observed (right panel). (B) *N. benthamiana* leaves were agroinfiltrated with MtNF-YB16 fused to C terminal part of YFP (cYFP) and MtNF-YC1 (top lane), MtNF-YC2 (middle lane) or the control MtNF-YC2** (bottom lane) fused to the N terminal part of YFP (nYFP). Images of the YFP fluorescence (left panels), and a merge between YFP and bright field images (right panels) are shown. Bar = 50µm.

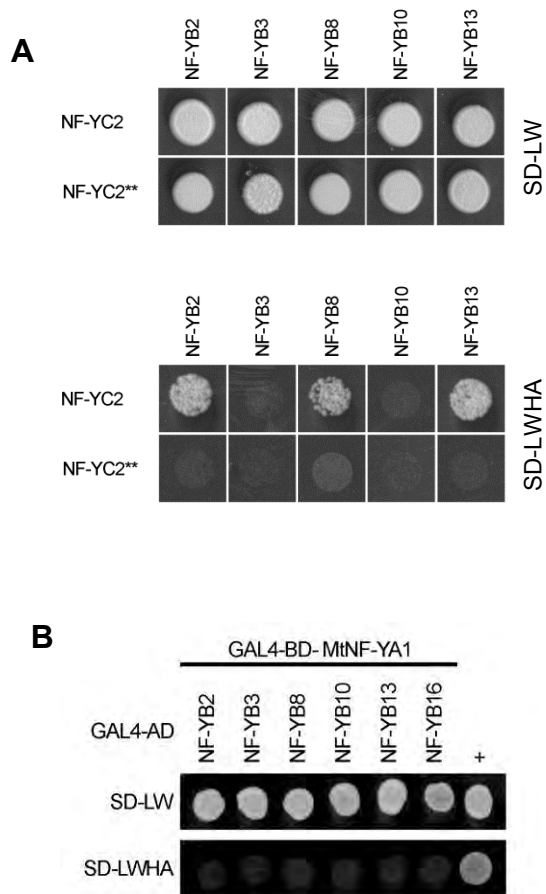


Figure S4 : Interaction specificity of NF-YB subunits

Yeast two hybrid experiments. MtNF-YC2 or MtNF-YC2** were fused to the binding domain of GAL4 (GAL4-BD) and was tested for its interaction with MtNF-YB2, MtNF-YB3, MtNF-YB8, MtNF-YB10 and MtNF-YB13 fused to the activation domain of GAL4 (GAL4-AD). Yeast were spotted on selective media for plasmid only (SD-LW) or plasmid plus interaction (SD-LWHA). MtNF-YA1 was fused to the binding domain of GAL4 (GAL4-BD) and was tested for its interaction with MtNF-YB2, MtNF-YB3, MtNF-YB8, MtNF-YB10, MtNF-YB13 and MtNF-YB16 fused to the activation domain of GAL4 (GAL4-AD). The interaction between P53 and Tag was used as a positive control (+).

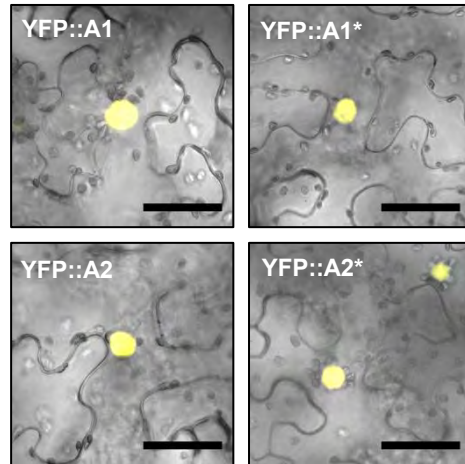


Figure S5: Localization of the YFP-tagged proteins used for the Co-immunoprecipitation assay

Images of the YFP fluorescence merge to the bright field images are shown. Bar = 50 μ m.

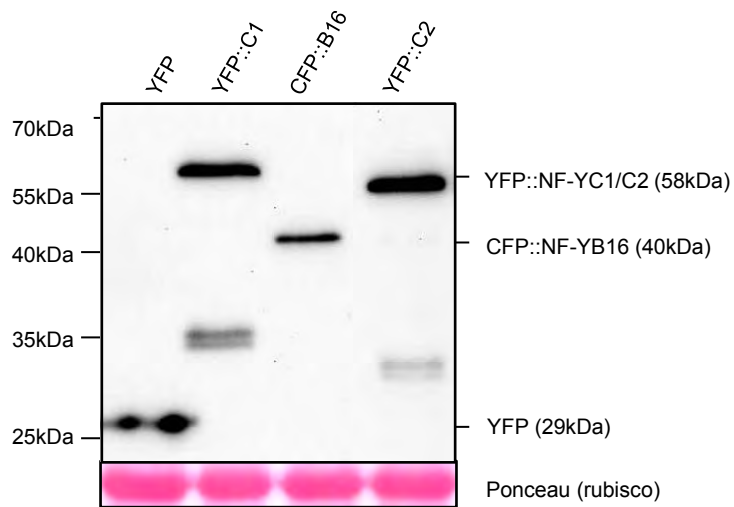


Figure S6 : The fluorescent NF-YB16, NF-YC1 and NF-YC2 chimeric protein are not cleaved in *N. benthamiana*

Proteins were extracted from leaves agroinfiltrated with YFP, YFP-MtNF-YC1, CFP-MtNF-YB16 and YFP-MtNF-YC2, subjected to SDS-PAGE, and analyzed by immunoblot with α GFP revealing the absence of cleaved YFP for each chimeric proteins.

Table S1 : Symbiotic expression profile of *M. truncatula* NF-Y subunits

	NF-Y Subunit	ratio Nod / Root	RNA sequencing reads per nodule zones					Y2H Interaction				
			Z1	dZ2	pZ2	IZ	Z3	A1	A2	C1	C2	B16
NF-YA	MtNF-YA1	265,75	8999	11348	9279	2861	1463	NA	NA	YES	YES	NO
	MtNF-YA2	0,85	1286	3391	2352	351	70	NA	NA	YES	YES	NO
	MtNF-YA3	2,06	847	2511	1869	1515	3538	NA	NA	NA	NA	NA
	MtNF-YA4	1,57	71	41	40	99	152	NA	NA	NA	NA	NA
	MtNF-YA5	1,73	518	548	504	309	385	NA	NA	NA	NA	NA
	MtNF-YA6	0,78	328	315	228	262	238	NA	NA	NA	NA	NA
	MtNF-YA7	13,30	103	119	95	250	1279	NA	NA	NA	NA	NA
	MtNF-YA8	3,51	236	197	72	23	45	NA	NA	NA	NA	NA
NF-YB	MtNF-YB2	0,65	500	398	861	791	526	NO	NA	NA	YES	NA
	MtNF-YB3	NA	0	0	0	0	0	NO	NA	NA	NO	NA
	MtNF-YB6	0,43	18	11	1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA
	MtNF-YB7	0,26	1	4	110	1	0	NA	NA	NA	NA	NA
	MtNF-YB8	0,63	5	0	0	0	0	NO	NA	NA	YES	NA
	MtNF-YB9	0,30	660	87	22	41	54	NA	NA	NA	NA	NA
	MtNF-YB10	NA	0	0	0	0	0	NO	NA	NA	NO	NA
	MtNF-YB11	0,05	0	0	0	0	0	NA	NA	NA	NA	NA
	MtNF-YB12	1,32	50	100	43	81	156	NA	NA	NA	NA	NA
	MtNF-YB13	2,69	187	365	110	142	448	NO	NA	NA	YES	NA
	MtNF-YB15	NA	0	1	0	0	0	NA	NA	NA	NA	NA
	MtNF-YB16	21,73	3091	4389	621	143	213	NO	NA	YES	YES	NA
	MtNF-YB17	5,34	1	5	1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA
	MtNF-YB18	4,74	3226	4660	670	80	23	NA	NA	NA	NA	NA
NF-YC	MtNF-YC1	1,58	438	501	570	717	957	YES	YES	NA	NA	YES
	MtNF-YC2	1,38	3613	5955	2127	3243	2237	YES	YES	NA	NA	YES
	MtNF-YC3	Root	24	7	2	0	6	NA	NA	NA	NA	NA
	MtNF-YC4	2,00	101	198	212	513	125	NA	NA	NA	NA	NA
	MtNF-YC6	NA	1	1	1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA
	MtNF-YC10	NA	0	0	0	0	0	NA	NA	NA	NA	NA
	MtNF-YC11	Nodule	38	18	6	0	0	NA	NA	NA	NA	NA

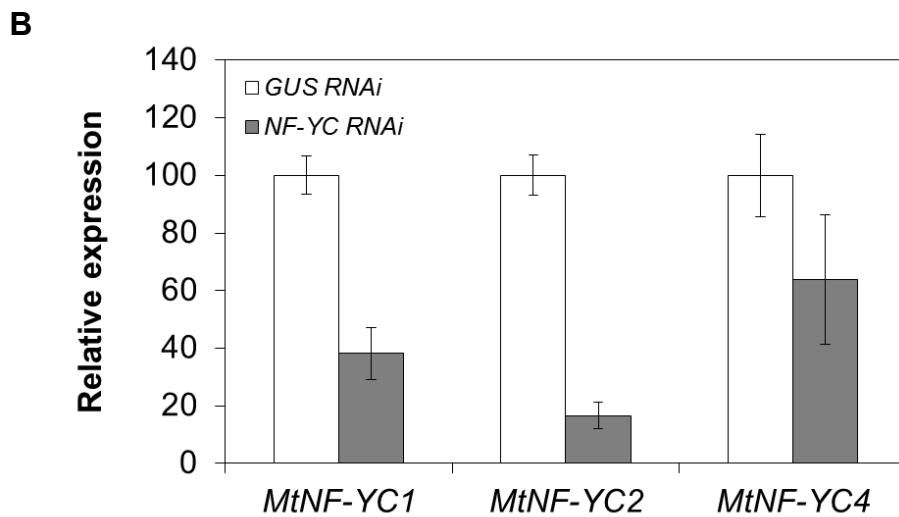
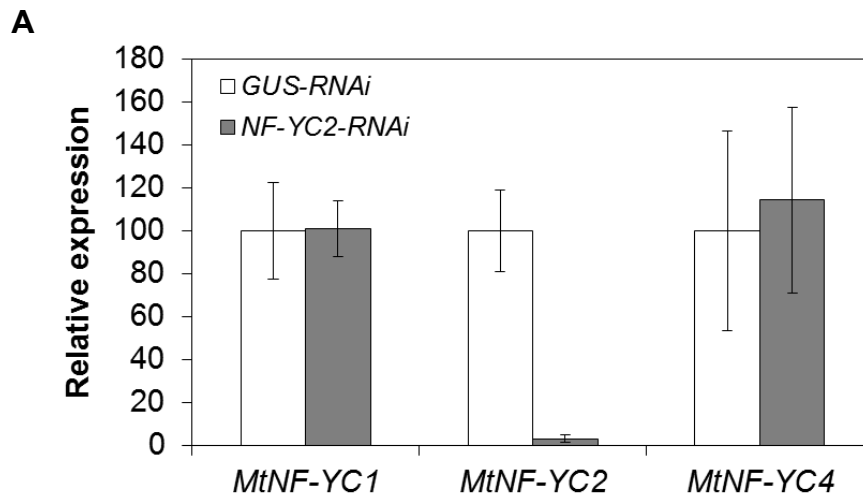


Figure S7: Specificity of NF-YC2 RNAi and NF-YC RNAi construct

(A) Relative expression of *MtNF-Y C1*, *C2* and *C4* genes, measured by qRT-PCR, in *NF-YC2* RNAi roots (grey bars) compared to *GUS* control RNAi roots (white bars). (B) Relative expression of *MtNF-Y C1*, *C2* and *C4* genes, measured by qRT-PCR, in *NF-YC* RNAi roots (grey bars) compared to *GUS* RNAi roots (white bars). (A-B) Error bars correspond to the SE from the average of 10 individual roots.

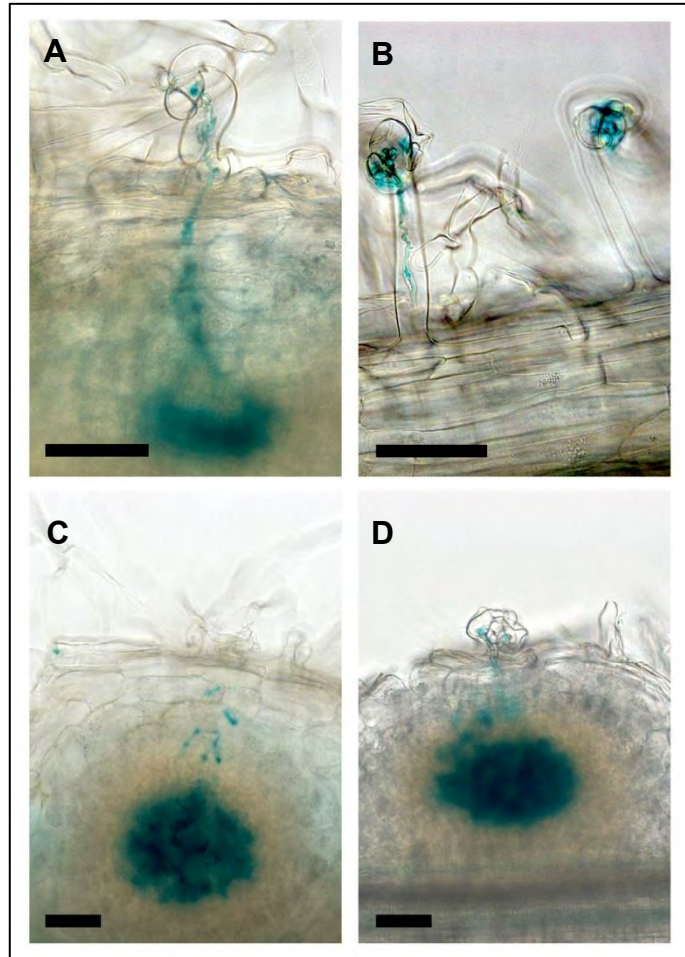


Figure S8: Rizobial infection is not affected in the *NF-YC* RNAi

representative image of growing IT phenotype in control *GUS* RNAi (A-C), and in *NF-YC* RNAi roots (B-D), 4 (A-B) or 8 (C-D) days after inoculation (dpi) with a *LacZ* - expressing *S. meliloti* strain (blue). Bars = 50 μ m,

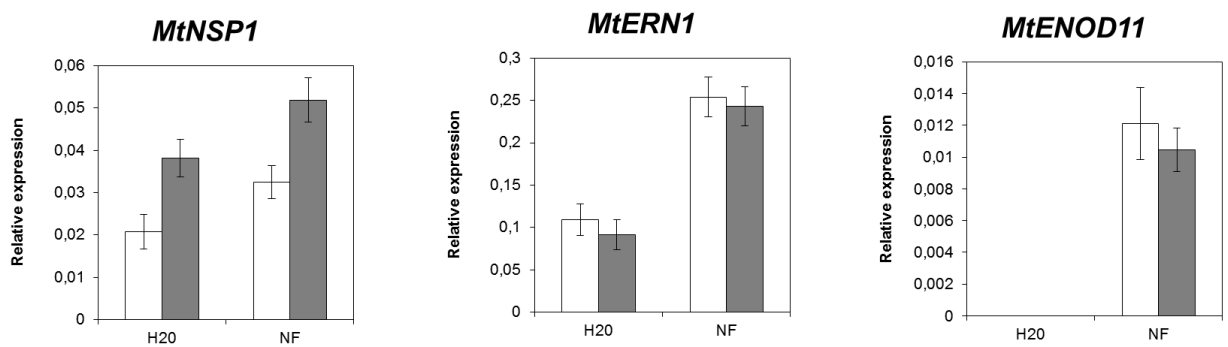


Figure S9: The down regulation of NF-YC1 and C2 does not affect the NF induction of NSP1, ERN1 and ENOD11

(A) Relative expression of *MtNSP1*, *MtERN1* and *MtENOD11* genes, measured by qRT-PCR, in *NF-YC2* RNAi roots (grey bars) compared to *GUS* control RNAi roots (white bars) treated with with H₂O or NF 6 hours. Error bars correspond to the SE from the average of 10 individual roots.

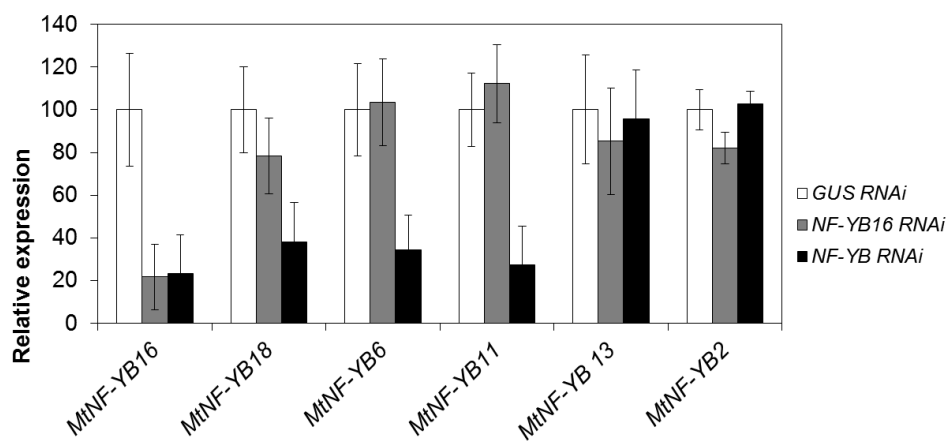
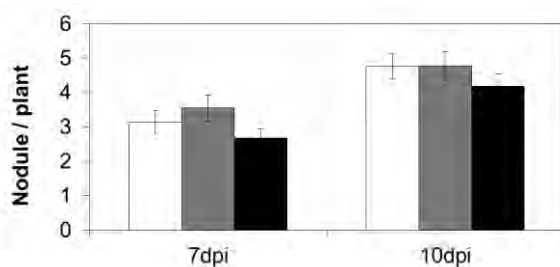
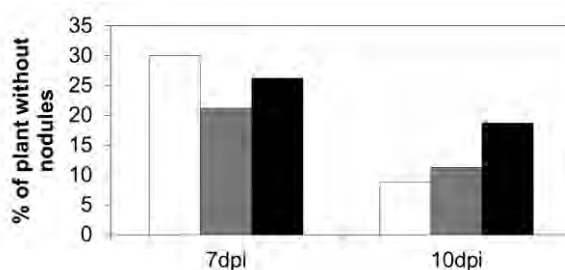
A**B****C**

Figure S10: Functional analysis of NF-YB genes during nodulation

(A) Relative expression of *MtNF-YB16*, *MtNF-YB18*, *MtNF-YB6*, *MtNF-YB11*, *MtNF-YB13* and *MtNF-YB2* genes, measured by qRT-PCR, in *NF-YB16* RNAi roots (grey bars) and *NF-YB* RNAi roots (black bars) compared to *GUS* control RNAi roots (white bars). Error bars correspond to the SE from the average of 10 individual roots. (B) Number of nodules were counted 7 and 10 days after *S. meliloti* inoculation in both control *GUS* RNAi (white boxes), *NF-YB16* RNAi (grey boxes) and *NF-YB* RNAi (black boxes) composite plants. Results shown are the average number of nodules counted per composite plants from 80 plants. Error bars correspond to the standard deviation. (C) Graphic representation of the percentage of plants showing no nodules in the same dataset than (B)

2.2. Bilan

2.2.1. Conclusions et perspectives

Cette étude a permis d'identifier et de caractériser les complexes NF-Y qui se forment autour de MtNF-YA1 et MtNF-YA2 au cours de la symbiose rhizobienne. Ce travail déchiffre un mécanisme important dans la fonction et la régulation des complexes NF-Y symbiotiques. De plus, grâce à des approches sans *a priori*, nous avons identifié des orthologues de gènes déjà caractérisés chez d'autres légumineuses, révélant une certaine conservation des complexes NF-Y symbiotiques. Ce type d'approche par recherche de protéines interagissant se révèle payante puisque les protéines identifiées au cours de cette étude auraient difficilement pu être mises en évidence par une approche de génétique classique. En effet, la redondance fonctionnelle au sein des familles rend les cribles basés sur la génétique directe inefficaces. Au niveau mécanistique, ce travail conforte ce qui a déjà pu être décrit chez les complexes NF-Y de plante en révélant une relative spécificité d'interaction et une relocalisation des dimères NF-YB/NF-YC. Enfin, l'identification des dimères NF-YB / NF-YC symbiotiques ouvre la porte à de nouvelles études en vue de mieux comprendre le mode d'action de ces complexes NF-Y au cours de la symbiose. En effet, pour la recherche de cibles nous possédons maintenant des trimères complets et capables (en théorie) de lier l'ADN ce qui est un prérequis pour les expérimentations de gels retards par exemple. De plus, ces dimères NF-YB / NF-YC nous autorisent à rechercher d'autres partenaires protéiques au-delà de l'hétérotrimère NF-Y. En effet, l'ensemble des protéines interagissant avec des complexes NF-Y chez les plantes ont été caractérisés via les sous-unités NF-YB / NF-YC dont le rôle semble être de stabiliser les complexes ADN/NF-Y en modifiant localement la structure de la chromatine et de permettre ainsi la liaison aux boîtes CCAAT et le recrutement de co-régulateurs.

De façon complémentaire à ce travail, nous avons réalisé des expressions ectopiques de *MtNF-YA1* et *MtNF-YB16* dans des racines de *M. truncatula*. Cette expérimentation a été réalisée suite à la publication de Soyano et ses collaborateurs (Soyano et al., 2013). Dans cet article, la surexpression de *LjNF-YA1* et *LjNF-YB1* entraîne la formation de divisions cellulaires corticales apparentées à la formation de nodule, en absence de rhizobia. Nous avons donc utilisé des plantes de *M. truncatula* sur-exprimant de façon stable *MtNF-YA1* sous le contrôle du promoteur CaMV 35S. Nous avons ensuite transformé les racines de ces plantes

de façon transitoire avec une construction exprimant *MtNF-YB16* sous le contrôle du CaMV 35S ou du promoteur de l'ubiquitine. Cependant, aucune des expérimentations réalisées n'a permis l'observation de divisions corticales comme cela l'a été décrit chez *L. japonicus*. Ce résultat négatif, suggère une mise au point supplémentaire afin de déterminer le meilleur système d'expression et cinétique d'observation de ces structures. Il est aussi probable que les deux plantes réagissent différemment le lotier semblant plus permissif pour l'organogenèse spontanée que *M. truncatula* (Gleason et al., 2006; Tirichine et al., 2006) et que la surexpression de deux membres du complexe NF-Y ne soit pas suffisante chez *M. truncatula*.

2.2.2. *Mon implication dans ce travail*

Ce travail constitue la majeure partie de ma thèse, et c'est dans cet article que je me suis le plus investi. Cependant, la caractérisation des complexes NF-Y symbiotiques a été initiée avant mon arrivée dans l'équipe, par Tom Laloum au début de sa thèse (Laloum, 2013). Ainsi, Tom a réalisé le premier crible double hybride en utilisant MtNF-YA1 comme appât. Il a aussi généré les mutants ponctuels d'interactions pour les sous-unités NF-YA et initié les expérimentations de localisation subcellulaire. Pour ma part, j'ai réalisé le deuxième crible double hybride, et confirmé l'ensemble des interactions en double hybride et/ou BiFC. De plus, j'ai démontré la formation des complexes trimériques par triple hybride et CoIP. En ce qui concerne la localisation, j'ai répété et confirmé les données de Tom et réalisé les expérimentations de relocalisation. Enfin, j'ai réalisé l'ensemble des études fonctionnelles par RNAi et analysé les mutants identifiés et nettoyés par Senjuti Sinharoy et Mickael Udvardi à la Noble Foundation (Oklahoma, USA). La majeure partie des stratégies et expérimentations ont été réfléchies par Andreas, Tom et moi-même.

Je me suis aussi investi dans l'écriture de l'article, en organisant les idées et en proposant un plan détaillé. Même si la majeure partie du travail d'écriture a été prise en charge par Andreas, j'ai moi-même écrit le matériel et méthode et organisé la bibliographie. Enfin, j'ai réalisé l'ensemble des figures et écrit leur description. Dans cet article, je me suis investi plus fortement et j'ai par conséquent pu me former pleinement au processus d'écriture.

3. Identification des protéines interagissant avec les complexes NF-Y au cours de la symbiose fixatrice d'azote.

3.1. Le crible double hybride: Recherche de candidats sans *a priori*

3.1.1. Introduction

La recherche de protéines interagissant avec les régulateurs transcriptionnels, permet de mieux comprendre leurs fonctions et leurs régulations. En effet, de nombreux facteurs de transcription sont activés ou désactivés de manière post-traductionnelle (Filtz et al., 2014). Ces modifications nécessitent le plus souvent une interaction avec la protéine qui va induire ce changement. De plus dans le cadre de l'activation de la transcription, le recrutement de co-activateurs est souvent nécessaire. Identifier des facteurs de transcription qui co-régulent les mêmes cibles peut permettre de mieux caractériser la liaison à l'ADN de ce complexe transcriptionnel. La caractérisation des cibles de ces co-activateurs au sein du même complexe peut également permettre une meilleure connaissance des réseaux de régulation. Par conséquent, pour aborder pleinement le rôle d'un facteur de transcription, il est important de caractériser le contexte protéique dans lequel il se trouve.

L'identification et la caractérisation des protéines NF-YB et NF-YC interagissant avec NF-YA1 et MtNF-YA2 a été décrite en détails dans le chapitre précédent. Nous allons à présent nous intéresser aux autres protéines identifiées par criblage double hybride en utilisant NF-YC2 comme appât, et notamment à deux régulateurs transcriptionnels de la famille des TIFY.

3.1.2. Mise au point du criblage

Pour ce criblage double hybride, nous avons utilisé le système GAL4 dans la levure (Fields and Song, 1989) d'après le "yeast protocols handbook" de clontech®. Ce système est basé sur la reconstitution d'un facteur de transcription dans la levure ce qui autorise l'activation d'un gène rapporteur. Ainsi, dans le cadre d'un crible, la protéine appât est fusionnée au DBD du facteur de transcription GAL4 alors que la banque de cDNA est intégrée dans des plasmides portants l'AD de GAL4.

Milieu	SD-LW		SD-LWH			
3-AT (mM)	0	0	2,5	5	10	15
BD-NF-YC2 AD-TAg						
BD-NF-YC2 AD-NF-YA1						
BD-P53 AD-TAg						

Figure 37: Une concentration de 5mM de 3-AT est suffisante pour supprimer l'auto-activation induite par BD-NF-YC2 dans la levure

NF-YC2 fusionné au domaine BD de GAL4 (BD-NF-YC2) a été co-transformé par TAg (témoin négatif, Clontech®) ou NF-YA1 (témoin positif) fusionnés au domaine AD de GAL4. BD-P53 co-exprimé avec AD-Tag a été utilisé comme second témoin positif d'interaction (Clontech®). Une goutte de 4µL à DO=1 de levures transformées a été déposée sur milieu minimal SD sans leucine et tryptophane (SD-LW, sélection pour les plasmides) ou SD sans leucine, tryptophane et histidine (SD-LWH, sélection pour les plasmide et l'interaction). Pour le milieu SD-LTH une concentration croissante (0 à 15 mM) de 3-AT a été ajoutée.



Figure 38: Efficacité de transformation de la levure AH109, BD-NF-YC2

50µL de cellules compétentes de AH109 BD-NF-YC2 ont été transformées par 1µg de la banque double hybride. Une dilution au 1/200 a ensuite été étalée sur milieu SD-LW ce qui permet d'établir que le taux de transformation de la banque est $8 \cdot 10^4$ clones/µg de banque

L'une des limites de cette technique est l'auto-activation, principalement dans le cas de l'étude de facteurs de transcription. En effet, si la protéine fusionnée au domaine BD de GAL4 dispose de domaine activateur de la transcription, elle peut alors induire la transcription des gènes rapporteurs sans recruter l'AD de GAL4 et par conséquent induire l'apparition de faux positifs. Ainsi, l'une des premières étapes du crible double hybride est la suppression de l'auto-activation par ajout d'inhibiteur. Dans notre cas, nous avons utilisé le gène rapporteur *HIS3* chez la levure *S. cerevisiae* AH109 ce qui confère à la levure une prototrophie vis-à-vis de l'histidine. Pour limiter les effets de l'auto-activation, nous ajoutons donc du 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT), un inhibiteur compétitif de l'enzyme HIS3 lors de la biosynthèse d'histidine (Klopotowski and Hulanicka, 1963) (**Figure 37**). Ainsi le niveau de *HIS3* requis pour la croissance de la levure est supérieur ce qui supprime l'auto-activation induite par la protéine appât. Dans le cadre d'une levure transformée par BD-MtNF-YC2 avec AD-Tag (témoin négatif d'interaction, Clontech®), nous avons constaté une croissance identique aux témoins positifs d'interaction: BD-MtNF-YC2/AD-MtNF-YA1 (Laloum, 2013) et BD-P53/AD-TAg (Clontech®) (**Figure 37**). Ainsi, la protéine MtNF-YC2 est suffisante pour induire un niveau basal d'expression de *HIS3*. Cette observation est en accord avec la présence d'un domaine d'activation de la transcription décrit chez les sous-unités MtNF-YC (Mantovani, 1999; Dolfini et al., 2012). Cependant nous pouvons observer qu'une concentration de 5mM de 3-AT est suffisante pour inhiber fortement la croissance de la levure BD-MtNF-YC2/AD-TAg alors que dans le cas d'une interaction positive (BD-MtNF-YC2/AD-MtNF-YA1) la croissance de la levure n'est pas affectée. Ainsi, la concentration de 5mM de 3-AT est un minimum nécessaire pour réaliser le criblage de la banque. Utiliser une concentration supérieure en 3-AT, permettrait d'augmenter la spécificité du criblage mais cela risque aussi d'inhiber les interactions plus labiles mais néanmoins intéressantes. Par conséquent, nous avons fait le choix de cribler la banque double hybride sur milieu SD-TWH + 5 mM de 3-AT.

Dans le cadre de criblage double hybride, une autre limitation importante est l'efficacité de transformation que l'on arrive à obtenir. En effet, l'idéal est d'obtenir une profondeur de criblage suffisante pour être le plus exhaustif possible. Particulièrement, dans notre cas, nous avons utilisé une banque de double hybride issue de nodules de *M. truncatula* qui n'est pas normalisée. Ainsi, les gènes qui sont faiblement exprimés ne seront que peu représentés dans la banque et donc la probabilité de tester ce type d'interaction lors du crible est faible. Dans notre étude, nous avons utilisé le protocole de transformation de levure à

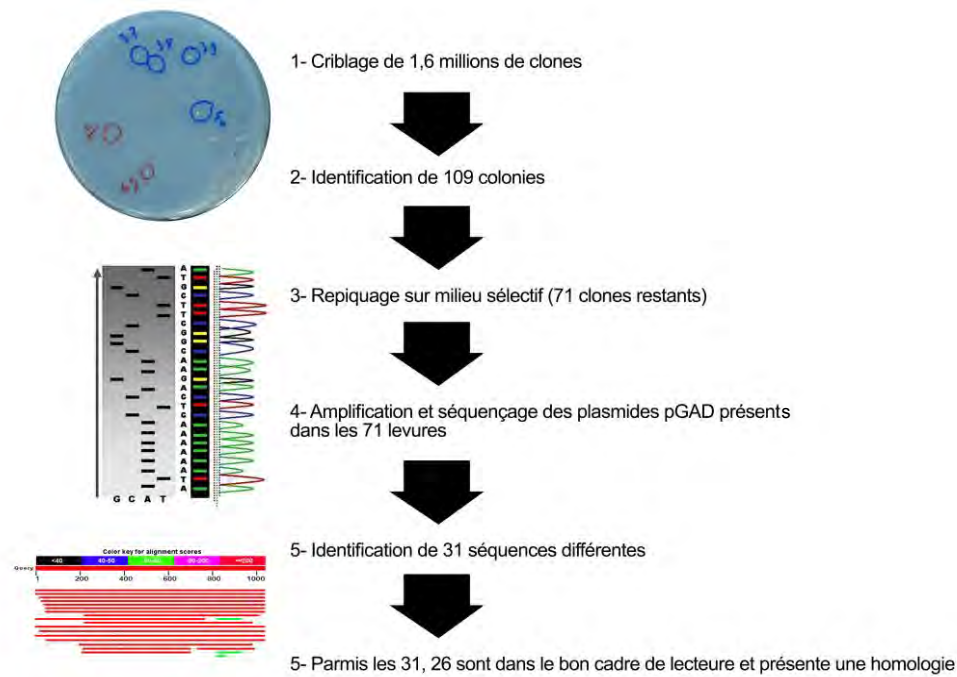


Figure 39: Schéma du processus utilisé pour le criblage de la banque de cDNA de nodule en utilisant NF-YC2 comme appât.

Tableau 3: Synthèse des résultats du crible double hybride avec BD-NF-YC2.

Les 26 séquences sont classées par nombre de clones identifiés, leur ratio d'induction nodule/racine et leur localisation dans le nodule (d'après Roux et al.,2014). Figure aussi la prédiction bioinformatique et l'identifiant génomique.

N	nombre de clones	prédiction	Mt4.0v1-JCVI	ratio R/N	cluster (Symbimics)
1	8	NF-YB16	Medtr4g119500	21,73	4
2	3	JAZ1 like	Medtr5g013530	190,76	3
3	3	Calmodulin-like protein 2	Medtr3g055585	1792,55	9
4	2	Class-10 pathogenesis-related protein 1	Medtr2g035100	0,77	6
5	2	Development and Cell Death Protein	Medtr7g029130	1,12	11
6	2	Ubiquitin	Medtr8g018230	1,47	12
7	2	NF-YB13	Medtr2g026710	2,69	13
8	2	pseudo-response regulator 7	Medtr1g067110	2,07	13
9	2	JAZ1 like	Medtr5g013520	91,42	NA
10	2	Proteasome subunit beta type	Medtr2g098010	1,16	NA
11	2	GATA transcription factor	Medtr5g066510	0,68	NA
12	1	2OG and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	Medtr3g117420	3,03	2
13	1	Small nuclear ribonucleoprotein family protein	Medtr7g065100	1,02	4
14	1	Ribosomal protein S27	Medtr2g015680	0,75	5
15	1	Ribonuclease III domain	Medtr3g080020	25,78	6
16	1	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	Medtr2g007210	318,96	9
17	1	NCR AJ388787	Medtr3g020920	206,42	9
18	1	Embryo spécifique 3	Medtr2g103310	4301,82	11
19	1	EXL2 exordium like 2	Medtr4g094240	3,65	11
20	1	Fructose-bisphosphate aldolase	Medtr5g069050	0,52	11
21	1	BTB/POZ domain-containing protein	Medtr5g066730	14,88	12
22	1	Kunitz-type trypsin inhibitor alpha chain	Medtr6g078070	1,42	13
23	1	Phosphoric diester hydrolase	Medtr7g083410	6,24	NA
24	1	RCI2B	Medtr7g111350	2,84	NA
25	1	Auxin response factor 2	Medtr8g100050	1,66	NA
26	1	Membrane protein,Tapt1/CMV receptor	Medtr3g076570	0,79	NA

l'acétate de lithium (LiAc) (Ito et al., 1983; Gietz et al., 1992) comme décrit dans le "yeast protocol handbook" (Clontech®, voir Chapitre IV partie 2.1.). Grâce à cette technique, nous avons atteint le taux de 8.10^4 clones/ μg de banque (**Figure 38**). Ainsi, en criblant $20\mu\text{g}$ de banque, nous avons estimé le nombre de clones criblés à 1,6 millions.

3.1.3. Les protéines identifiées

Sur les 1,6 millions de clones criblés, nous avons récupéré 109 colonies qui se sont développées sur milieu SD-LWH + 5mM de 3-AT entre trois et six jours après transformation (**Figure 39**). Les 109 colonies ont ensuite été repiquées à la fois sur milieu SD-LW et SD-LWH + 5mM de 3-AT, 38 ne se sont pas développées, il restait donc 71 clones. Grâce à des amorces universelles présentes sur le plasmide pGAD nous avons amplifié le ou les cDNA présents chez les levures isolés (**Figure 39**). Les produits PCR ont ensuite été séquencés ce qui a permis l'identification de 31 séquences différentes. Ces séquences ont ensuite fait l'objet de recherche d'homologie, à la fois dans la base de données de *M. truncatula* Legoo (<https://www.legoo.org/>) et par blastn et blastx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Parmi ces 31 séquences, 26 étaient dans le bon cadre de lecture et présentaient une homologie de séquence claire (**Figure 39 et Tableau 3**).

Les séquences identifiées ont ensuite été classées en fonction du nombre de fois qu'elles ont été identifiées dans le criblage, de 1 à 8 clones par séquence (**Tableau 3**). Un autre critère pris en compte pour évaluer la pertinence des candidats a été le profil d'expression dans les tissus symbiotiques. Pour cela nous avons utilisé les bases de données publiques telles que Symbimics (<https://iant.toulouse.inra.fr/symbimics/>, (Roux et al., 2014)) ou le GEA (Gene Expression Atlas, <http://mtgea.noble.org/>). Symbimics nous permet d'obtenir le ratio d'expression entre le nodule et la racine pour chacun des gènes ainsi que le profil d'expression nodulaire, classé en 13 clusters, du plus apical au plus basal (Roux et al., 2014). *MtNF-YA1*, *MtNF-YA2* et *MtNF-YC2* étant dans le même cluster (le numéro 3), les gènes présents dans les clusters 1 à 5 (expression principalement apicale) ont été favorisés (**Tableau 3**).

Dans cette liste, nous observons la présence de deux sous-unités NF-YB (*MtNF-YB13* et *MtNF-YB16*) qui ont été pleinement étudiées et intégrées dans la précédente partie des résultats. Parmi les autres protéines identifiées, il y a des régulateurs de réponses hormonales représentés par les JAZ (n°2 et 9), l'ARF (Auxin Response Factor, n° 25) et

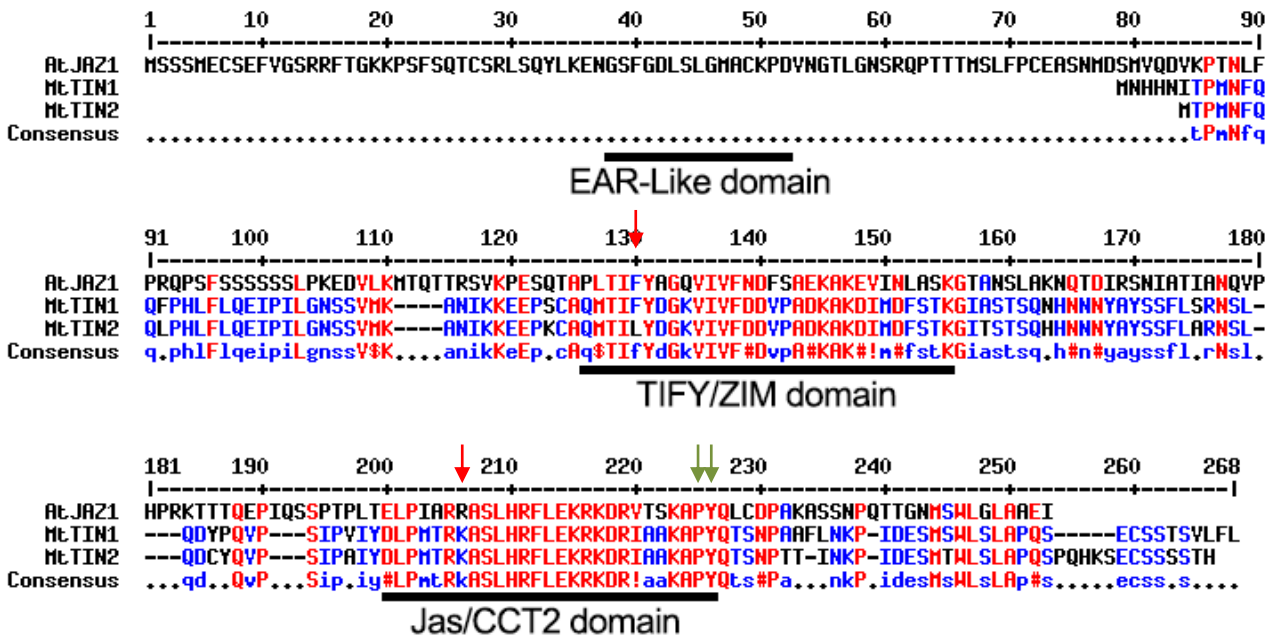


Figure 40: Alignement protéique de AtJAZ1 et des TINs

Alignement des protéines avec multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/>). Les domaines protéiques sont établis en fonction de AtJAZ1 et d'après Pauwels and Goossens, 2011. Les flèches rouges indiquent les mutations sur les acides aminés clés. Les flèches vertes indiquent le signal de localisation nucléaire PY-NLS (Grunewald et al., 2009).

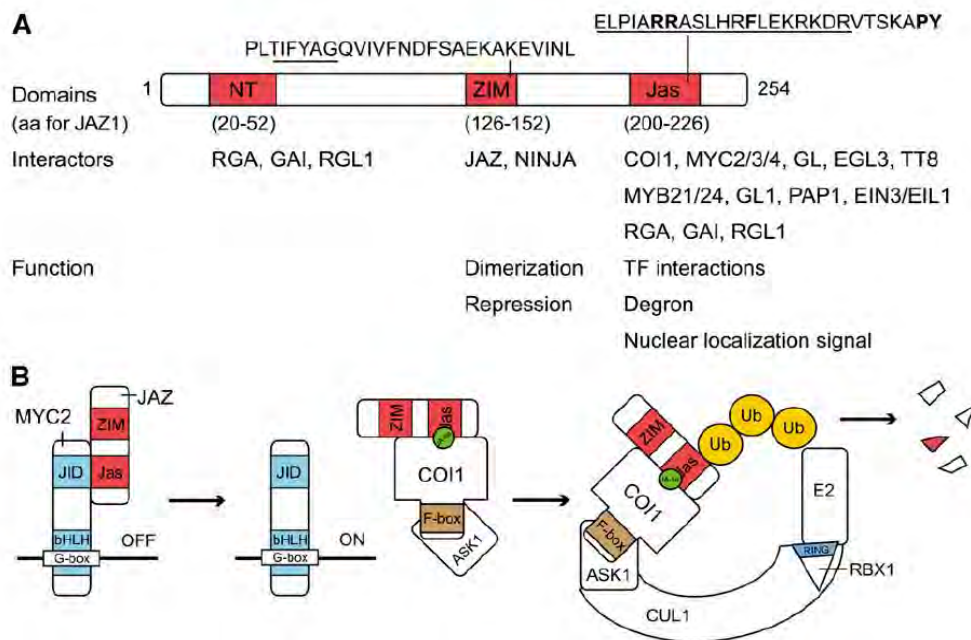


Figure 41: Structure et fonctions des protéines JAZ

(A) Représentation schématique de la protéine JAZ 1 et de ses domaines conservés. Les protéines interagissant avec les différents domaines ainsi que leurs fonctions sont indiquées. Dans le domaine Jas, les acides aminés importants sont en gras. NT= N-terminal (B) En l'absence de JA, JAZ se fixe à MYC2 et inhibe l'expression des gènes. En présence de JA, COI1 interagit avec le domaine Jas des JAZ et entraîne leur dégradation via le protéasome.

EXL2 (n° 19) (**Tableau 3**). De plus, plusieurs protéines associées au processus de traduction des ARNm sont aussi ressorties de ce crible avec les clones n°13, et 14 ainsi qu'une ribonuclease de type III prédite comme intervenant sur les ARN interférents (n°15). Les clones n°5, 8, 18 et 24 présentent des homologies avec des gènes impliqués dans le développement des plantes ce qui peut être intéressant dans la mesure où l'organogénèse nodulaire peut être considérée comme un processus développemental. Vis-à-vis de la régulation de la transcription, trois clones sont prédits comme codant pour des facteurs de transcription, deux des régulateurs sont de type GATA (n°11) et un de type BTP/POZ (n°21). Enfin, une Calmoduline-like est ressortie 3 fois du crible et est fortement induite dans les nodules (n°3) ce qui en fait un candidat intéressant.

Parmi l'ensemble de ces interacteurs potentiels, nous avons dû choisir le ou les candidats les plus pertinents pour une étude plus approfondie dans le cadre de cette thèse. Notre choix s'est porté sur les deux protéines présentant une homologie avec JAZ1. En effet, les protéines JAZ sont caractérisées comme des co-régulateurs de la transcription (Staswick, 2008). De plus, encore peu de choses sont décrites quant au rôle probable de l'acide jasmonique dans la nodulation, et les deux candidats que nous avons identifiés présentent une expression symbiotique pertinente.

3.2. Rôle des protéines TIFY dans la symbiose rhizobienne

3.2.1. *TIN1 et TIN2 sont deux protéines JAZ*

Suite au criblage double hybride, nous avons fait le choix d'étudier les deux clones homologue à "JAZ1". Nous avons nommé ces protéines TIN1 (Medtr5g013530) et TIN2 (Medtr5g013520) pour "TIFY protein Involved in Nodulation". Les protéines TIFY sont caractérisées par la présence d'au moins deux domaines protéiques, le domaine ZIM/TIFY qui est constant et un second domaine plus variable (Vanholme et al., 2007; Cuéllar Pérez et al., 2014). Chez les JAZ (Jasmonate Zim Domain) qui sont une sous famille des TIFY, le second domaine est appelé Jas et est nécessaire à l'activité des protéines (Pauwels and Goossens, 2011). Les protéines TIN1 et TIN2 ont été soumises à une recherche de domaines protéiques sur la base de donnée pfam (<http://pfam.xfam.org/>) ce qui a permis d'identifier les deux domaines conservés des JAZ (**Figure 40**).

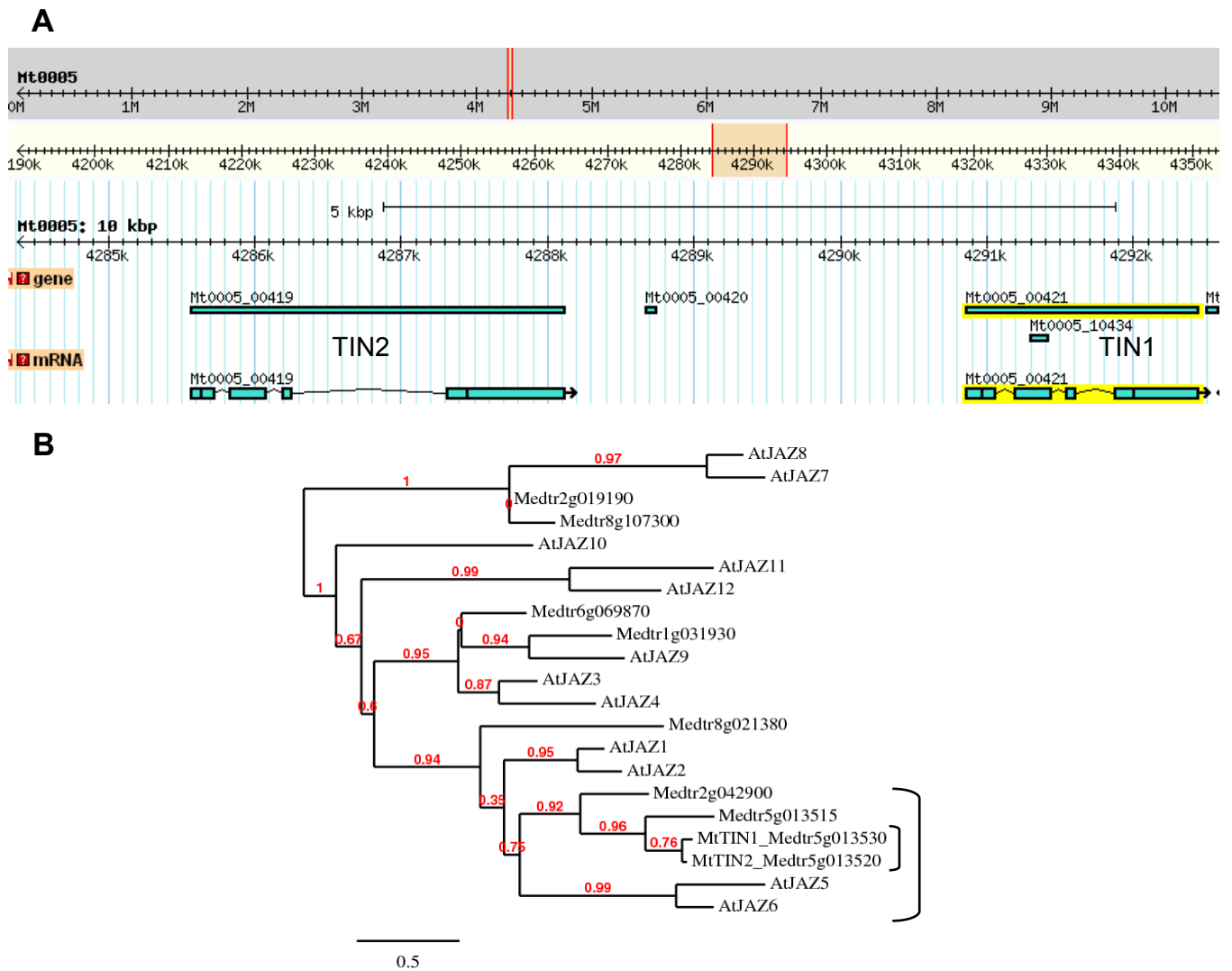


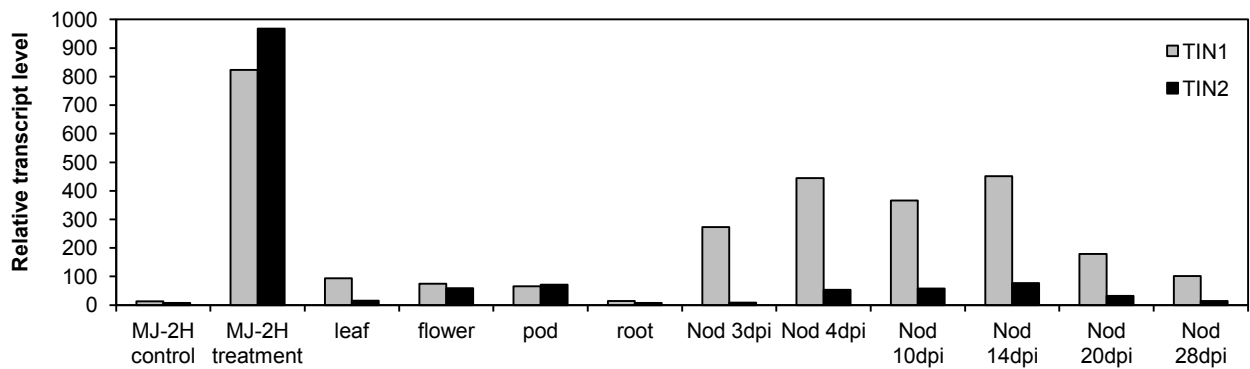
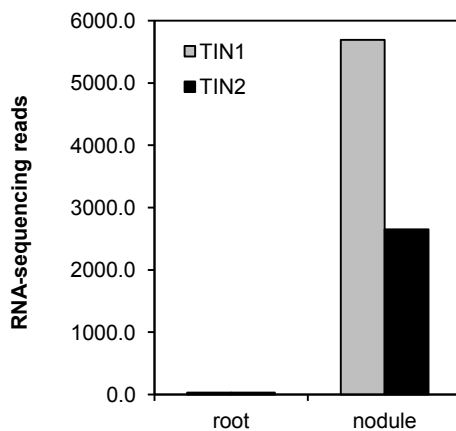
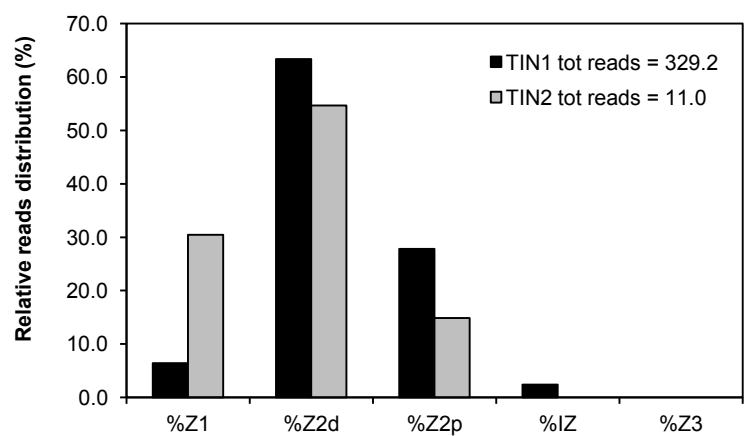
Figure 42: *TIN1* et *TIN2* sont proches génétiquement et phylogénétiquement

(A) Représentation schématique de la région génomique de *M. truncatula* codant pour les gènes *TIN1* (surligné en jaune) et *TIN2*. La structure introns/exons est représentée sur la ligne mRNA, rectangles vert = exons, trait fins noirs = introns. D'après: <http://lipm-gbrowse.toulouse.inra.fr/gb2/>. (B) Arbre phylogénétique avec les 12 protéines JAZ d'*A. thaliana* et 9 JAZ de *M. truncatula*. Arbre réalisé avec le logiciel en ligne phylogeny (<http://www.phylogeny.fr/>), analyse du type Maximum Likelihood (PhyML).

Les protéines JAZ ont été identifiées comme une composante essentielle de la réponse à l'acide jasmonique (JA). Ces protéines ont été découvertes en 2007 de manière simultanée dans plusieurs groupes de recherche (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007; Yan et al., 2007). Le mode d'action des JAZ a été depuis très bien caractérisé et est résumé dans la **figure 41** (Pauwels and Goossens, 2011). Via leur domaine Jas, les protéines JAZ se fixent aux facteurs de transcription de la signalisation JA tel que MYC2. En l'absence de l'hormone, les JAZ ont un effet de répression de la transcription des gènes en aval. Cette répression se fait par le recrutement du corépresseur général TOPLESS via l'intermédiaire NINJA qui interagit avec le domaine TIFY (Pauwels et al., 2010) (**Figure 41A**). Certains JAZ qui possèdent un domaine EAR-like ont aussi la capacité d'interagir avec TOPLESS directement, sans recruter NINJA (Causier et al., 2012). En présence de JA, COI1 (une protéine à domaine F-box) interagit avec les JAZ via le domaine Jas et entraîne la dégradation des JAZ (Thines et al., 2007). En l'absence des répresseurs JAZ, les facteurs de transcription vont ainsi activer les gènes de réponse au JA (Staswick, 2008). L'ensemble de ce processus, orchestré par les JAZ permet le contrôle fin de la réponse au JA. Sur les protéines JAZ, un certain nombre d'acides aminés ont été identifiés comme essentiels pour la fonction de ces régulateurs (Wager and Browse, 2012). Dans le domaine TIFY/ZIM, l'isoleucine 129 et la glycine 133 sont par exemple absolument requis pour la dimérisation des JAZ (Chini et al., 2009; Wager and Browse, 2012). Le motif TIFY est lui-même très bien conservé parmi les JAZ (Vanholme et al., 2007). De façon intéressante, dans le domaine TIFY de TIN2, le résidu aromatique phénylalanine 130 est remplacé par un résidu leucine aliphatique (**Figure 40**). Bien que ces deux acides aminés aient des propriétés hydrophobes, nous pouvons formuler l'hypothèse que cette mutation perturbe la fonction du domaine TIFY surtout que ce résidu est adjacent à l'isoleucine 129 qui est fondamentale.

3.2.2. TIN1 et TIN2 sont issus d'une duplication récente et sont exprimés en conditions symbiotiques

Comme l'alignement de la **figure 40** nous démontre, les protéines TIN1 et TIN2 sont extrêmement proches (87% d'identité). Ceci se reflète au niveau nucléotidique avec 91% de conservation, une position génomique très proche et une structure intron/exon quasi identique (**Figure 42A**). En effet, les deux gènes ne sont séparés que par 3kpb au sommet du chromosome 5 et nous observons dans les deux cas la présence de quatre exons avec des tailles similaires (**Figure 42A**). Une analyse phylogénétique avec les douze protéines JAZ

A**B****C****Figure 43: Profils d'expression de *TIN1* et *TIN2***

(A) Expression de *TIN1* (gris) et *TIN2* (noir) dans différents organes et traitement de *M. truncatula*, d'après des analyses d'expression par des puces à ADN affymetrix synthétisé sur <http://mtgea.noble.org/>. (B) Nombres de lecture de *TIN1* (gris) et *TIN2* (noir) dans des racines ou des nodules de *M. truncatula*. Répartition en pourcentage de lectures de *TIN1* (gris) et *TIN2* (noir) dans les différentes zones d'un nodule de *M. truncatula*. D'après <https://iant.toulouse.inra.fr/symbimics/>.

d'*A. thaliana* et les neuf JAZ de *M. truncatula* classe les deux protéines TIN dans le même sous-groupe phylogénétique que AtJAZ5 et AtJAZ6 et deux autres protéine JAZ de *M. truncatula* (**Figure 42B**). Cette observation confirme le fait que TIN1 et TIN2 soit bien des protéines JAZ, on peut donc supposer qu'elles agissent en tant que répresseur transcriptionnel et peut-être dans le cadre de la signalisation JA. D'autre part, on constate qu'il existe deux autres protéines de *M. truncatula* proche de TIN1 et TIN2, ce qui suggère une potentielle redondance fonctionnelle.

En ce qui concerne l'expression de *TIN1* et *TIN2*, la base de données GEA nous révèle une quasi superposition du profil de ces deux gènes, bien que *TIN1* ait une expression légèrement plus forte (**Figure 43A**). Les deux gènes TIN sont très peu présents dans la racine et une forte induction dans les nodules dès 4 jours après inoculation est observée. Le pic d'expression dans les nodules est observé dans un nodule mature, à 14 dpi pour les deux gènes. Dans les autres organes, l'expression des TINs est relativement discrète avec un niveau basal très faible. Nous pouvons cependant noter la forte induction de ces deux gènes suite à un traitement au méthyl-jasmonate dans des suspensions cellulaires (**Figure 43A**). Cette expression est en accord avec la fonction des JAZ qui sont induits par le JA et créent une boucle de régulation négative. L'approche RNA-seq avec le projet Symbimics confirme l'expression très faible dans les racines et la forte induction dans les nodules (**Figure 43B**). En ce qui concerne la localisation tissulaire de *TIN1* et *TIN2* dans un nodule de dix jours, on remarque une expression principalement apicale, dans les zones méristématiques et d'infection (**Figure 39C**). Ce profil d'expression est comparable à ce que nous avons décrit pour les complexes NF-Y symbiotiques. L'expression de *TIN1* et *TIN2* est donc en accord avec une interaction avec MtNF-YC2 au cours du processus symbiotique. Cependant, on note que l'expression de *TIN1* est plus forte que *TIN2* dans les tissus symbiotiques. Cela reflète également notre crible double hybride où trois clones codaient pour TIN1 et seulement deux pour TIN2.

3.2.3. *TIN1* et *TIN2* interagissent avec les complexes NF-Y symbiotiques

Les protéines TINs ont été identifiées au cours d'un crible double hybride dans la levure. Ce type d'expérimentation induit de nombreux faux positifs, il convient donc de répéter et valider les interactions obtenues dans d'autres systèmes. Ces expérimentations ont été effectuées pendant le stage de master 1 de Justine Piqueras que j'ai co-encadré. Au cours

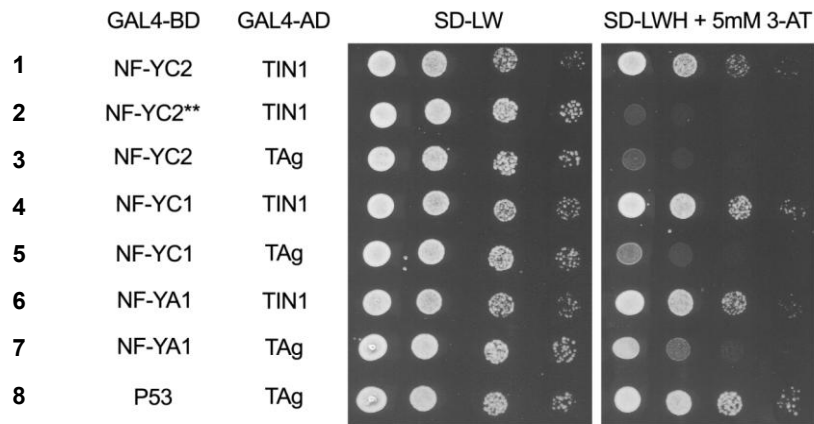


Figure 44: TIN1 interagit avec NF-YC2, NF-YC1 et NF-YA1 dans la levure

La levure AH109 a été transformée par TIN1 ou TAg (Témoin négatif, Clontech®) fusionnés au domaine GAL4-AD et par les sous-unités NF-Y fusionnées au domaine GAL4-BD. L'association P53/TAg est le Témoin positif d'interaction (Clontech®). Des dilutions en série (DO=1 à 0,001) d'une suspension de levures ont été déposées sur milieu sélectif pour les plasmides (SD-LW) ou sélectif pour les plasmides et l'interaction (SD-LWH + 5mM de 3-AT).

de ce stage, nous avons décidé de nous concentrer sur *TIN1* qui présente un profil d'expression plus pertinent que *TIN2* (**Figure 43**). Nous avons cloné l'ORF de *TIN1* à partir d'ARNm de nodules et réalisé des constructions pour des expérimentations de double hybride et de BiFC.

Pour ce qui est du double hybride, nous avons testé l'interaction entre TIN1 fusionné au domaine AD de GAL4 et les membres des complexes NF-Y symbiotiques (**Figure 44**). La levure contenant AD-TIN1 et BD-MtNF-YC2 présente une bonne croissance sur milieu sélectif SD-LWH + 5mM de 3-AT, comme le témoin positif P53/TAg (**Figure 44 lignes 1 et 8**). De façon intéressante, nous constatons que cette interaction est dépendante de l'isoleucine 136 et de la leucine 139 présentes dans le domaine HFM de MtNF-YC2. En effet, la mutation I136D / L139E (MtNF-YC2**) entraîne une absence totale de croissance de la levure, de la même façon que l'utilisation du témoin négatif AD-TAg (**Figure 44 lignes 2 et 3**). Dans une étude précédente, nous avons démontré que MtNF-YC2 et MtNF-YC1 jouent des rôles partiellement redondants, à la fois fonctionnellement au cours de la symbiose rhizobienne mais aussi structurellement dans les complexes NF-Y (Chapitre II, partie 2; Baudin et al., in preparation). Ainsi, nous avons testé l'interaction de TIN1 avec MtNF-YC1 dans la levure. Comme on peut le constater MtNF-YC1, interagit avec TIN1 aussi efficacement que MtNF-YC2 ou que le témoin positif (P53/TAg) (**Figure 44 ligne 4**). Nous avons enfin testé l'interaction entre TIN1 et les autres sous-unités du complexe NF-Y: MtNF-YA1 et MtNF-YB16. De façon intéressante, alors que MtNF-YB16 n'interagit pas avec TIN1 (données non montrées), MtNF-YA1 est capable d'interagir avec cette protéine JAZ. Cependant ce résultat est moins clair pour les sous-unités MtNF-YC due à la forte auto-activation présente pour MtNF-YA1. Ainsi le différentiel entre le témoin négatif AD-TAg et AD-TIN1 est moins prononcé (**Figure 44 lignes 6 et 7**). Les validations d'interaction pour la protéine TIN2 en levure sont en cours et font l'objet d'une partie du stage de master 1 de Sophie Faude que je co-encadre également.

Nous avons par la suite initié la validation de ces interactions *in planta* en utilisant le système BiFC chez *N. benthamiana*. Nous avons fusionné les protéines TIN1 et TIN2 aux extrémités N et C terminales de la YFP et exprimé ces constructions dans des feuilles de *N. benthamiana* par agroinfiltration. Une première expérimentation pilote a été réalisée pour TIN1 tout d'abord et TIN2 ensuite. Les résultats de ces premières expérimentations sont encourageants bien que faibles et difficilement interprétables. Pour l'ensemble des interactions

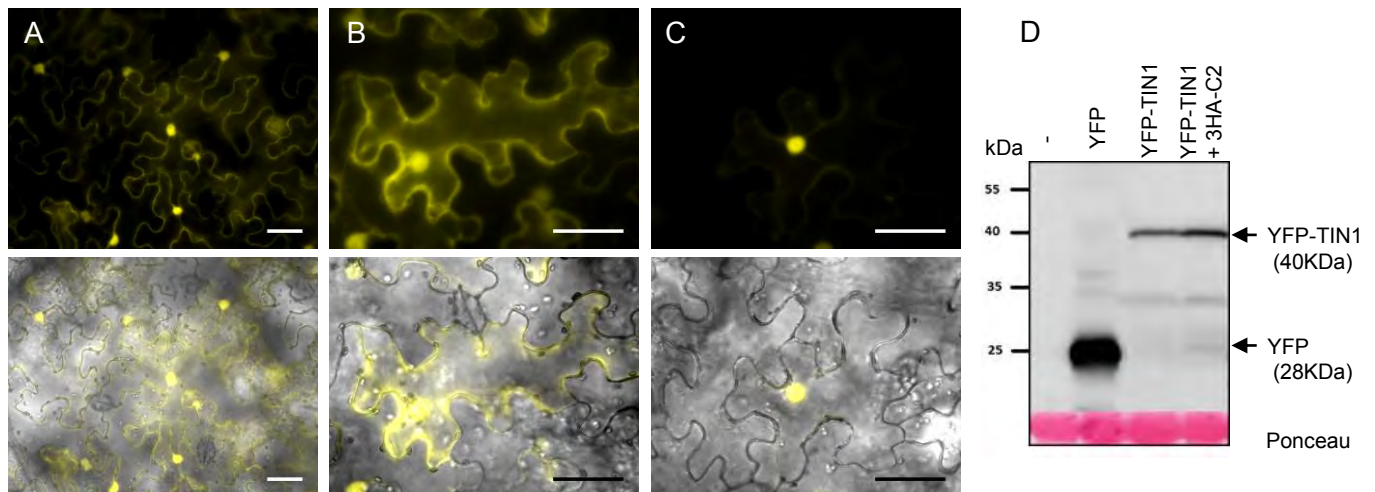


Figure 45: TIN1 est localisé dans le noyau et le cytoplasme des cellules végétales

(A-C) Visualisation de la localisation des protéines chimériques dans l'épiderme foliaire de *N. benthamiana*. A = YFP, B = YFP-TIN1, C = YFP-TIN1 + 3HA-NF-YC2. Visualisation avec le filtre YFP (image du haut) ou une fusion YFP et fond clair (image du bas). Barres = 50 μ m. (D) Analyse en western-blot d'extraits des protéines totales des feuilles de *N. benthamiana* exprimant les constructions fluorescentes. Hybridation de la membrane avec des anticorps α GFP (Roche)

positives dans la levure avec TIN1, nous avons détecté un signal en BiFC ce qui tend à confirmer les interactions observées dans la levure *in planta*. Cependant, ce signal est apparu six jours après agroinfiltration et de manière diffuse dans quelques cellules de l'épiderme foliaire. En raison du manque de répétitions et de contrôles adéquats, nous ne discuterons pas plus ici de ces validations *in planta*.

3.2.4. TIN1 et TIN2 sont localisées dans le noyau et le cytoplasme

TIN1 et TIN2 appartiennent à la famille des JAZ qui sont des régulateurs de la transcription. Le domaine CCT/Jas a été caractérisé dans de nombreuses études comme possédant des signaux de localisation nucléaires de type PY-NLS (Grunewald et al., 2009; Bai et al., 2011; Pauwels and Goossens, 2011). La substitution de ces deux acides aminés (Proline 225 et Tyrosine 226 sur AtJAZ1) entraîne ainsi la perte de la localisation nucléaire (Grunewald et al., 2009). L'alignement protéique (**Figure 40**) nous indique que ces deux acides aminés sont conservés chez TIN1 et TIN2. Nous pouvons donc supposer que la localisation des TINs est nucléaire.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons exprimé de façon transitoire TIN1 fusionné à la protéine fluorescente YFP dans des feuilles de *N. benthamiana* (**Figure 45**). La protéine chimérique est retrouvée à la fois dans le noyau et le cytoplasme des cellules végétales (**Figure 45B**) de la même façon que la YFP seule (**Figure 45A**). Cette localisation n'étant pas cohérente avec la littérature, nous avons vérifié si cette diffusion du signal fluorescent n'était pas due au clivage de la protéine fluorescente. Cependant l'analyse en Western-Blot des extraits protéiques des feuilles infiltrées ne présente que très peu de clivage et la majorité du signal se trouve bien à la taille attendue pour la protéine chimérique (40KDa, **Figure 45D**). Dans le cadre des interactions impliquant les sous-unités NF-Y, nous avons déjà observé des relocalisations subcellulaires (cf Chapitre II, partie 2), aussi, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle la protéine TIN1 serait relocalisée dans le noyau par la sous-unité MtNF-YC2. La co-expression d'une version étiquetée 3HA (non fluorescent) de MtNF-YC2 avec la protéine fluorescente YFP-TIN1 produit en effet un signal principalement nucléaire (**Figure 45C**). De la même façon, nous n'observons pas de clivage de la protéine fluorescente par l'analyse western-blot (**Figure 45D**). Nous avons de la même façon réalisé cette expérience avec 3HA-MtNF-YA1 qui a donné des résultats comparables (données non montrées). Cependant, ces images sont issues d'une unique expérience qui n'a à ce jour pas encore été répétée. De plus il nous manque ici des contrôles afin de déterminer si cette

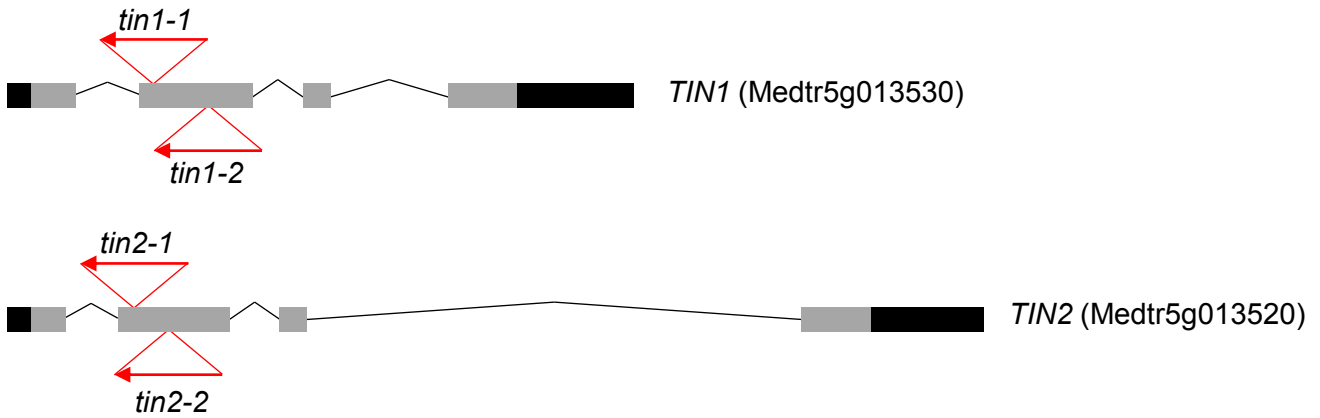


Figure 46: Représentations schématiques des mutants insertionnels dans *TIN1* et *TIN2*.

Les deux gènes sont représentés du 5' au 3', les rectangles gris et noir représentent respectivement les régions traduites et non traduites des exons. Les traits fin noirs représentent les introns. Les insertions identifiées dans chacune des lignées sont symbolisées par les triangles rouges, la flèche indique le sens du transposon *tnt1*.

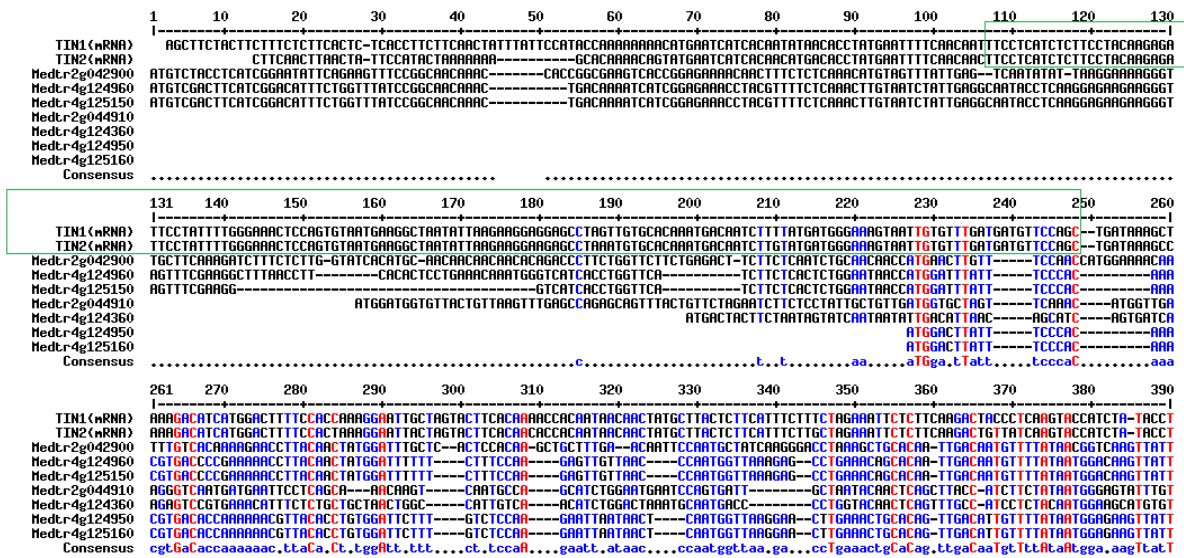


Figure 47: Alignement des ARNm des JAZ de *M. truncatula*

Alignement nucléotidique avec multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/>). Le rectangle vert délimite la région clonée chez *TIN1* pour réaliser le RNAi ciblant les deux gènes *TIN*.

relocalisation est bien spécifique à l'interaction entre TIN1 et les sous-unités NF-Y et non un artéfact expérimental. Enfin, la construction YFP-TIN2 récemment obtenue n'a pas encore pu être testée.

3.2.5. Vers une caractérisation fonctionnelle de TIN1 et TIN2

Nous avons validé l'interaction entre le complexe NF-Y et les TINs dans la levure et en partie *in planta*. De plus nous avons aussi démontré que la localisation tissulaire et subcellulaire des TINs rendait cette interaction possible au cours du processus symbiotique. Afin d'identifier si TIN1 et TIN2 jouent un rôle au cours de la symbiose rhizobienne, nous avons entrepris des études fonctionnelles. Etant donné la nature des TINs nous pouvons supposer qu'ils agissent en tant que répresseur de l'activité transcriptionnelle des complexes NF-Y symbiotiques. De plus *TIN1* et *TIN2* sont très proches et possèdent des profils d'expression similaire si bien qu'une redondance fonctionnelle entre ces deux gènes est fortement probable. Nous avons donc élaboré nos stratégies d'études fonctionnelles en tenant compte de ces caractéristiques. L'ensemble de ces études est poursuivi en parallèle à la rédaction du manuscrit de thèse. Nous discuterons donc de l'approche réalisée, mais pas des résultats en cours d'obtention.

3.2.5.1. Analyse de mutants

En collaboration avec Michael Udvardi et Senjuti Sinharoy travaillant à "The Noble Foundation" basée aux Etats-Unis, nous avons identifié des insertions du type *tnt1* dans les gènes *TIN1* et *TIN2* (**Figure 46**). Ces lignées ont été identifiées au sein d'une collection de mutants insertionnels dans le fond génétique R108 de *Medicago*. Nous disposons de quatre lignées mutantes: *tin1-1*, *tin1-2* pour le gène *TIN1* et *tin2-1*, *tin2-2* pour le gène *TIN2*. L'ensemble de ces insertions sont présentes dans le deuxième exon des gènes concernés, dans une région proche du domaine TIFY (**Figure 46**). Nos collaborateurs à la Noble Foundation ont réalisé un premier rétrocroisement (backcross) entre les différents mutants et la lignée sauvage afin de nettoyer les insertions non désirées des lignées mutantes. Nous avons sélectionné des mutants homozygotes pour chacune des accessions ainsi que les lignées "sauvages" correspondantes (lignées ayant perdu la mutation d'intérêt). L'ensemble de ces lignées ont subi un premier phénotypage symbiotique dans les laboratoires de la Noble Foundation mais aucun effet des mutations n'a pu être repéré. Même s'il est possible que les TINs aient un rôle mineur qui nécessiterait un phénotypage approfondi, cette absence de phénotype peut aussi être la conséquence d'une redondance fonctionnelle entre les deux

gènes. Ainsi, l'obtention de double mutants permettrait probablement de s'affranchir de cette redondance. Cependant, étant donné la proximité génétique entre les deux gènes (**Figure 42A**) l'obtention de double mutants par croisement des lignées est très peu probable. Ce type de croisement nécessite en effet un événement d'enjambement (crossing-over) dans la région inter-génique entre *TIN2* et *TIN1*. Comme alternative, nous envisageons le criblage d'une banque de mutants de délétions (fast neutrons) dans l'objectif d'identifier une lignée avec une délétion affectant à la fois *TIN1* et *TIN2*.

3.2.5.2. RNAi et expression ectopique

En parallèle à la recherche de mutants, nous avons élaboré deux autres stratégies permettant de comprendre le rôle des TINs au cours de la symbiose. Dans l'objectif de s'affranchir de la redondance fonctionnelle probable entre *TIN1* et *TIN2*, nous avons généré une construction RNAi ciblant un domaine conservé entre les deux gènes (**Figure 47**). Cette construction cible spécifiquement *TIN1* et *TIN2* sans *a priori* affecter les autres gènes JAZ de *M. truncatula*. Les premières expérimentations sont actuellement en cours afin de déterminer la spécificité et l'efficacité réelle de la construction. Dans un contexte de redondance fonctionnelle, une autre stratégie consiste à surexprimer les gènes candidats. En effet, une expression ectopique peut entraîner l'apparition de phénotypes et ceci de façon indépendante des autres copies du gène. Notamment, dans le cadre de notre étude, une surexpression des TINs peut être pertinente dans le cas où ils aient un effet négatif sur l'activité des NF-Y. En effet, les protéines JAZ sont caractérisées comme inhibant l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription avec lesquels elles interagissent. Ainsi, nous avons formulé l'hypothèse qu'une expression constitutive de *TIN1* ou *TIN2* permettrait de mimer le phénotype du RNAi ciblant *MtNF-YC2* et *MtNF-YC1* (voir partie 2 des résultats). Pour cela, nous avons exprimé *TIN1* et *TIN2* sous le contrôle du promoteur de l'ubiquitine de *L. japonicus*. De manière complémentaire, nous avons aussi surexprimé des versions tronquées de *TIN1* et *TIN2*. En effet, dans de nombreuses études il a été reporté que la surexpression de protéine JAZ sans leur domaine Jas/CCT entraîne la formation de JAZ dominants négatifs qui sont insensibles à l'acide jasmonique (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007; Chung and Howe, 2009). L'ensemble de ces constructions ont été introduites de façon transitoire chez *M. truncatula* afin de vérifier leur stabilité et leur habilité à induire des phénotypes symbiotiques.

GAL4-AD	DMI3	IPD3	NIN	NSP1	NSP2	RPG	ERN1	ERN3	TAg	TAg
SD-LW										
SD-LWH + 5mM 3-AT										
GAL4-BD	NF-YC2									P53

Figure 48 : MtNF-YC2 n'interagit pas avec plusieurs protéines symbiotiques testés.

La levure AH109 a été transformée par MtNF-YC2 fusionné au domaine GAL4-BD et par les protéines symbiotiques fusionnées au domaine GAL4-AD. L'association P53/TAg constitue le Témoin positif d'interaction (Clontech®). 4µL d'une suspension de levures à DO= 0,1 ont été déposés sur milieu sélectif pour les plasmides (SD-LW) ou sélectif pour les plasmides et l'interaction (SD-LWH + 5mM de 3-AT).

Tableau 4 : Synthèse des expérimentations de BiFC entre les NF-Y et les NSP.

N	c-YFP	N-YFP	3HA	pLp100	interaction
1	MtNF-YB2	MtNSP1	-	-	No
2	MtNF-YB2	MtNSP2	-	-	No
3	MtNF-YB8	MtNSP1	-	-	No
4	MtNF-YB8	MtNSP2	-	-	No
5	MtNSP1	MtNF-YA1	MtNSP2	-	No
6	MtNSP2	MtNF-YA1	MtNSP1	-	No
7	MtNF-YA1	MtNSP1	MtNSP2	-	No
8	MtNF-YA1	MtNSP2	MtNSP1	-	No
9	MtNSP1	MtNF-YC2	MtNSP2	-	No
10	MtNSP2	MtNF-YC2	MtNSP1	-	No
11	MtNF-YC2	MtNSP1	MtNSP2	-	No
12	MtNF-YC2	MtNSP2	MtNSP1	-	No
13	MtNSP1	MtNF-YB16	MtNSP2	-	No
14	MtNSP2	MtNF-YB16	MtNSP1	-	No
15	MtNF-YB16	MtNSP1	MtNSP2	-	No
16	MtNF-YB16	MtNSP2	MtNSP1	-	No
17	MtNSP1	MtNF-YB16	MtNSP2 / MtNF-YC2	-	No
18	MtNSP2	MtNF-YB16	MtNSP1/ MtNF-YC2	-	No
19	MtNF-YB16	MtNSP1	MtNSP2/ MtNF-YC2	-	No
20	MtNF-YB16	MtNSP2	MtNSP1 / MtNF-YC2	-	No
21	MtNSP1	MtNF-YA1	MtNSP2	<i>pMtERN1</i>	No
22	MtNSP2	MtNF-YA1	MtNSP1	<i>pMtERN1</i>	No
23	MtNF-YA1	MtNSP1	MtNSP2	<i>pMtERN1</i>	No
24	MtNF-YA1	MtNSP2	MtNSP1	<i>pMtERN1</i>	No
25	MtNF-YA1	MtNSP1	-	<i>pMtERN1</i>	No
26	MtNF-YA1	MtNSP2	-	<i>pMtERN1</i>	No

3.2.6. Conclusions

Ce projet a été initié à la fin de ma thèse et beaucoup de travail reste à effectuer. Cependant de par leur nature, TIN1 et TIN2 sont des protéines intéressantes à mettre en perspective avec le complexe NF-Y. Cela permettrait de décrire des protéines de type JAZ dans un nouveau contexte biologique et un nouveau mode de régulation des complexes NF-Y. Une collaboration avec Alain Goossens du laboratoire VIB a été initiée en vue de mieux caractériser l'aspect mécanistique des TINs. Afin de déterminer si TIN1 et TIN2 peuvent exercer une répression de l'activité transcriptionnelle du complexe NF-Y sur une cible, des expériences de transactivation vont être réalisées par l'équipe d'Alain Goossens. Ces caractérisations complétées par les études fonctionnelles actuellement en cours devraient permettre une valorisation de cette étude prochainement.

3.3. Recherche de partenaires protéiques avec *a priori*

3.3.1. NF-Y versus protéines symbiotiques

En parallèle à la recherche de protéines interagissant avec MtNF-YA1 sans *a priori* par criblage double hybride, nous avons réalisé une approche avec *a priori* en tenant compte du contexte symbiotique dans lequel se trouve le complexe NF-Y. Ainsi, au cours de sa thèse, Tom Laloum avait testé l'interaction entre MtNF-YA1 et les nodulines DMI3, IPD3, NSP1, NSP2, ERN1, ERN3, NIN et RPG par double hybride (Laloum, 2013). Aucune interaction entre ces protéines et MtNF-YA1 n'a pu être mise en évidence. Cependant, comme nous l'avons déjà évoqué, il est possible que cette interaction se fasse par l'intermédiaire d'un autre membre du complexe NF-Y. Ainsi nous avons testé les mêmes candidats par double hybride dans la levure et BiFC chez *N. benthamiana*.

Dans un premier temps, dans la levure, nous avons testé l'interaction entre MtNF-YC2 et l'ensemble des protéines symbiotiques précitées (**Figure 48**). La protéine MtNF-YC2 a été fusionnée au BD de GAL4 et co-transformée avec les protéines symbiotiques fusionnées à l'AD de GAL4 dans la levure AH109. L'ensemble des levures se développent positivement sur milieu SD-LW, sélectif pour les plasmides AD et BD. Cependant lorsque les levures sont déposées sur le milieu sélectif pour l'interaction, aucune d'entre elles n'est capable de se développer contrairement au témoin positif P53/TAg. Ainsi, la protéine MtNF-YC2 est

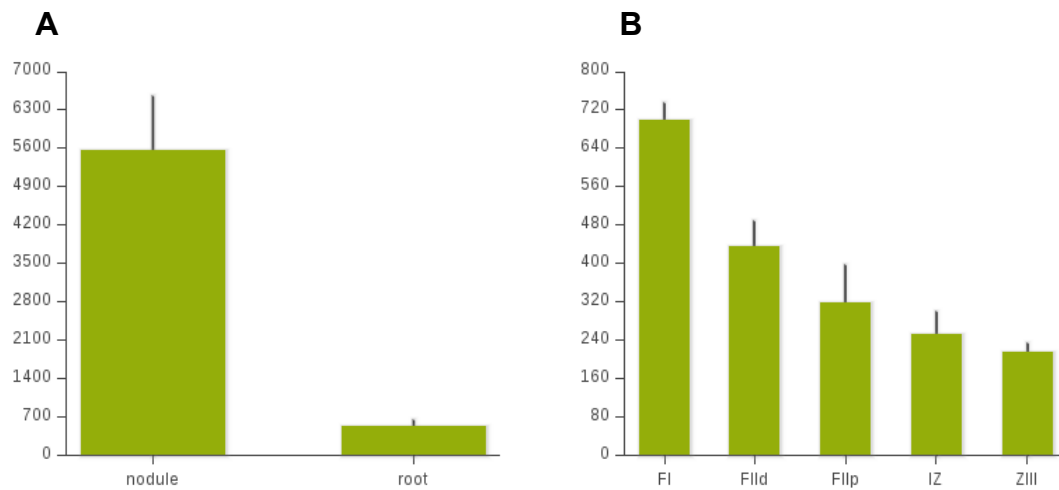


Figure 49: *MtSIN1* est principalement exprimé à l'apex des nodules

(A) Nombre de lectures par séquençage d'ARN total de *MtSIN1* dans des racines ou des nodules de *M. truncatula*. (B) Nombre de lectures par séquençage d'ARN total de *MtSIN1* dans les différentes zones d'un nodule de *M. truncatula*.

D'après <https://iant.toulouse.inra.fr/symbimics/>.

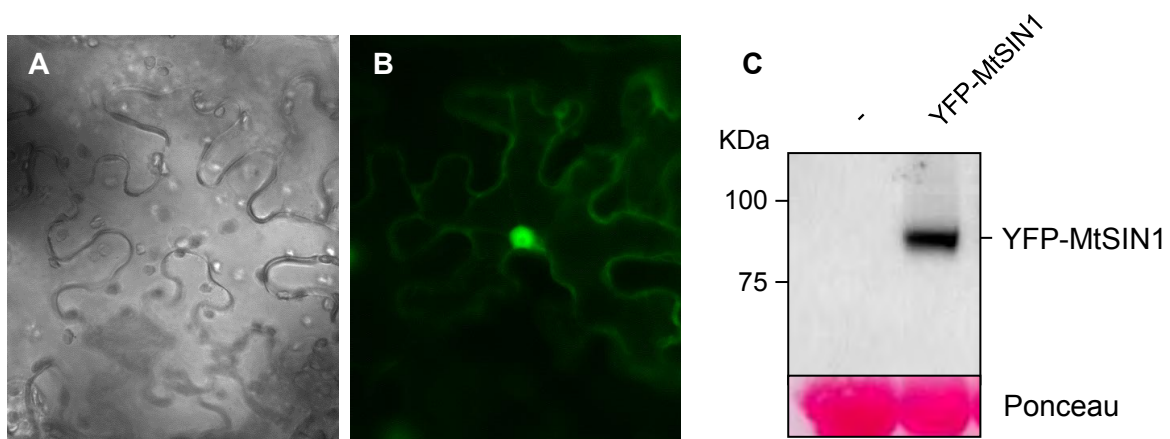


Figure 50: *MtSIN1* est localisé dans le noyau et le cytoplasme des cellules végétales

(A-B) Visualisation de la protéine chimérique YFP-SIN1 dans l'épiderme foliaire de *N. benthamiana*. Image en fond clair (A) ou en fluorescence (B). Grossissement x400. (C) Analyse en western-blot d'extraits protéiques des feuilles agroinfiltrées, hybridation de la membrane avec des anticorps α GFP (Roche).

incapable d'interagir avec DMI3, IPD3, NSP1, NSP2, ERN1, ERN3, NIN ou RPG dans la levure (**Figure 48**).

Dans un deuxième temps, afin d'étudier plus en détail l'interaction entre le dimère NSP et les complexes NF-Y, nous avons utilisé le système BiFC. Nous avons fait le choix de ce système car contrairement à la levure, il permet d'exprimer facilement plusieurs constructions dans une même cellule. L'étude présentée dans la première partie des résultats sur le rôle de MtNF-YA1 et MtNF-YA2 au cours des étapes précoces de la symbiose, laisse supposer une possible interaction entre les NSP et les NF-Y. Ainsi nous avons essayé de mettre en lumière cette interaction via la sous-unité MtNF-YA1 mais aussi via MtNF-YC2 et plusieurs NF-YB. Afin de s'approcher le plus possible des conditions physiologiques, nous avons exprimé jusqu'à quatre constructions dans l'objectif de recréer une partie des complexes. De plus, nous avons aussi associé le promoteur d'*ERN1*, pensant que ce type d'interaction pouvait se faire par l'intermédiaire du fragment d'ADN. L'ensemble des expérimentations réalisées sont synthétisées dans le **tableau 4**. Malheureusement, aucune des conditions testées n'a permis d'obtenir la visualisation d'une possible interaction entre les sous-unités NF-Y et NSP1 ou NSP2. En conclusion, aucune interaction entre les sous-unités NF-Y et les protéines symbiotiques n'a pu être mise en évidence. Par conséquent, soit ces interactions n'existent pas soit les systèmes ou conditions utilisées ne sont pas appropriées.

3.3.2. *MtNF-YCs versus MtSINI*

Le gène *SINI* a été identifié chez *P. vulgaris* par criblage double hybride d'une banque de cDNA symbiotiques en utilisant PvNF-YC1 comme appât (Battaglia et al., 2014; Rípodas et al., 2014). *SINI* code pour un facteur de transcription putatif de la famille des GRAS. Cette étude, à laquelle j'ai participé, a récemment été publiée (cf annexes 1 et 2). Ainsi, dans le cadre de cette collaboration franco-argentine, nous avons testé si cette interaction était conservée chez notre légumineuse d'étude, *M. truncatula*.

Dans un premier temps, nous avons cloné le gène de *M. truncatula* le plus proche de *PvSINI* qui est Medtr4g133660 (Battaglia et al., 2014). Une étude partielle du profil d'expression de ce gène dans les tissus symbiotiques de *M. truncatula* est déjà présente dans la publication (Battaglia et al., 2014). Les données Symbimics, publiées depuis (Roux et al., 2014), confirment la forte induction de *MtSINI* dans les nodules (**Figure 49A**). Aussi, l'analyse par dissection laser révèle une expression plutôt apicale de *MtSINI*, même si le gène

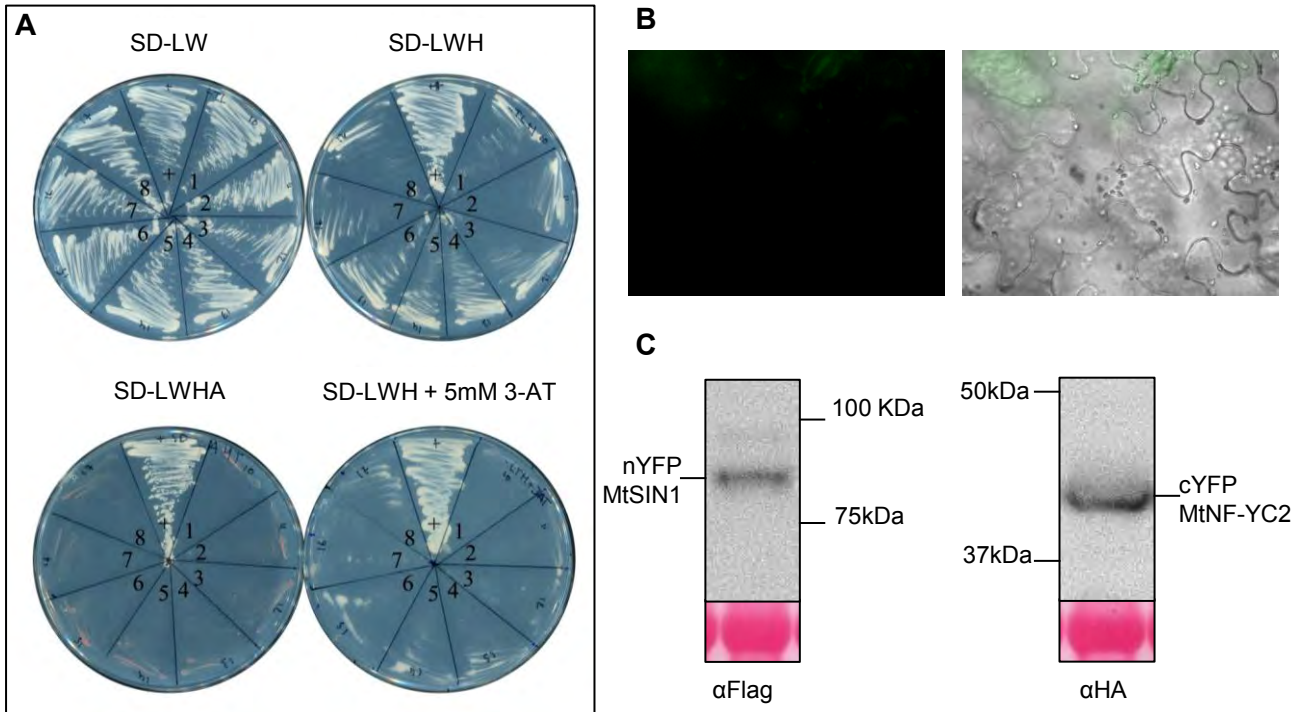


Figure 51: MtSIN1 n'interagit pas avec MtNF-YC1 et MtNF-YC2

(A) La levure AH109 a été double-transformée par les constructions suivantes += BD-P53/AD-TAg; 1 et 2 = BD-MtSIN1/AD-MtNF-YC1; 3 et 4= BD-MtSIN1/AD-MtNF-YC2 ; 5 et 6= BD-MtNF-YC2/AD-MtSIN1; 7 et 8= BD-MtNF-YC1/AD-MtSIN1. 2 clones de chaque combinaison ont été striés sur milieu sélectif pour les plasmides (SD-LW) ou sélectif pour les plasmides et l'interaction avec une stringence accrue (SD-LWH , SD-LWHA et SD-LWH + 5mM de 3-AT). (B) Des feuilles de *N. benthamiana* ont été transformées avec les constructions BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) nYFP-MtSIN1 et cYFP-MtNF-YC2. l'image de gauche représente une observation de l'épiderme foliaire avec le filtre fluorescent. L'image de droite est une fusion entre le fond clair et l'image en fluorescence. Grossissement x400. (C) Analyse en western-blot d'extraits protéiques des feuilles agroinfiltrées, hybridation de la membrane avec des anticorps αFlag (étiquette spécifique a la fusion nYFP) et αHA (étiquette spécifique a la fusion cYFP).

est retrouvé dans l'ensemble des zones du nodule (**Figure 49B**). Ainsi, le profil d'expression de ce gène est parfaitement compatible avec un rôle en interaction avec MtNF-YC2 ou MtNF-YC1. Chez le haricot, la protéine PvSIN1 fusionnée à la GFP est localisée à la fois dans le noyau et le cytoplasme des cellules de *N. benthamiana* (Battaglia et al., 2014). Afin de déterminer si la protéine MtSIN1 possède une localisation similaire, nous avons fusionné MtSIN1 à la protéine fluorescente YFP et exprimé la protéine chimérique dans l'épiderme foliaire de *N. benthamiana* (**Figure 50**). De la même façon que la protéine de *P. vulgaris*, YFP-MtSIN1 est localisée à la fois dans le noyau et le cytoplasme des cellules végétales (**Figure 50A-B**). De plus, cette localisation n'est pas due à un clivage de la protéine fluorescente car l'analyse en western-blot ne révèle qu'une bande à la taille attendue (**Figure 50C**). En conclusion, la protéine MtSIN1 possède une localisation subcellulaire compatible avec MtNF-YC2 qui est lui aussi localisé à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules.

Nous avons ensuite testé l'interaction entre MtSIN1 et MtNF-YC2 qui est le plus proche orthologue de PvNF-YC1. Pour cela, nous avons utilisé le système double hybride dans la levure et BiFC chez *N. benthamiana* (**Figure 51**). La protéine MtSIN1 fusionnée au BD ou AD de GAL4 a été co-transformée avec les protéines MtNF-YC1 et MtNF-YC2 fusionnées au BD ou à l'AD de GAL4 dans la levure AH109. Deux clones issus de ces co-transformations ont ensuite été striés sur différents milieux sélectifs. L'ensemble des levures se développent convenablement sur milieu SD-LW, sélectif pour les plasmides AD et BD. Cependant lorsque les levures sont déposées sur les milieux sélectifs pour l'interaction (SD-LWH, SD-LWHA et SD-LWH + 5mM de 3-AT), aucune d'entre elles n'est capable de se développer contrairement au témoin positif P53/TA_g (**Figure 51A**). Nous constatons une légère croissance sur SD-LWH mais comme nous l'avons déjà évoqué, il s'agit d'un milieu très peu stringent, et l'auto-activation entraînée par nos protéines appât est probablement suffisante pour induire la légère croissance observée (**Figure 51A**). Nous avons en parallèle utilisé le système BiFC pour tester cette interaction dans un système plante. Ainsi, nous avons co-exprimé dans l'épiderme foliaire de *N. benthamiana* MtSIN1 fusionnée au domaine C-terminal de la YFP (nYFP-MtSIN1) et MtNF-YC2 fusionnée au domaine N-terminal de la YFP (cYFP-MtNF-YC2). Les feuilles ont ensuite été observées au microscope à fluorescence 2 à 5 jours après agroinfiltration. Alors que le témoin positif cYFP-NSP1 / nYFP-NSP2 présente une forte fluorescence nucléaire (données non montrées, (Hirsch et al., 2009)), l'association de nYFP-MtSIN1 et cYFP-MtNF-YC2 ne présente aucune fluorescence (**Figure**

51B). Nous avons, par conséquent, cherché à déterminer si ce résultat négatif n'était pas dû à un défaut de production des protéines testées. Pour cela un extrait des protéines totales des feuilles infiltrées a été soumis à une analyse western blot (**Figure 51C**). Les membranes ont été hybridées avec des anticorps α Flag spécifiques de l'étiquette nYFP qui possède un épitope Flag et des anticorps α HA spécifiques de l'étiquette cYFP qui possède un épitope HA. Sur les deux membranes, une bande à la bonne taille est détectée, les deux protéines sont donc correctement produites (**Figure 51C**).

En conclusion, malgré la forte conservation entre les protéines de *P. vulgaris* et de *M. truncatula*, nous n'avons pas été en capacité de répéter les expérimentations publiées dans (Battaglia et al., 2014). Cependant, des résultats négatifs sont toujours difficilement interprétables et il est possible que cette absence d'interaction soit due à des problèmes techniques et non pas à un réel défaut de liaison entre MtSIN1 et MtNF-YC2/MtNF-YC1.

**CHAPITRE III : DISCUSSION GENERALE ET
PERSPECTIVES**

Les travaux présentés dans ce manuscrit se concentrent sur l'étude des facteurs de transcription NF-Y et de leurs protéines partenaires au cours de la symbiose rhizobienne. Les deux premiers chapitres des résultats sont présentés sous forme d'articles scientifiques et synthétisent donc le travail de toute une équipe. Cela est particulièrement vrai pour l'étude de la redondance fonctionnelle entre MtNF-YA1 et MtNF-YA2 au cours de la signalisation NF qui constitue le travail principal de la thèse de Tom Laloum (Laloum, 2013). Ces résultats ont donc déjà largement été discutés au cours de sa thèse (Laloum, 2013) et dans les deux articles présentés dans ce manuscrit. Ainsi, au cours de cette discussion, je m'efforcerai d'avoir une réflexion globale, sur l'ensemble des résultats présentés et de proposer de nouvelles pistes de travail afin d'approfondir notre compréhension du rôle des facteurs de transcription NF-Y au cours de la symbiose rhizobienne. Dans un premier temps j'aborderai la place des complexes NF-Y dans le processus symbiotique et je discuterai la probable conservation de ces protéines entre légumineuses. Dans un deuxième temps, je réfléchirai aux rôles des protéines interagissant avec ces complexes NF-Y et comment elles influencent la fonction de ces facteurs de transcription dans la symbiose rhizobienne. Enfin, je commenterai les expérimentations d'interaction et de localisation dans un contexte plus général des facteurs de transcription NF-Y.

1. Les complexes NF-Y, acteurs de toutes les étapes symbiotiques chez *M. truncatula* ?

La symbiose rhizobienne est un processus complexe qui peut être divisé en trois grandes étapes : la signalisation NF, l'infection rhizobienne et l'organogénèse nodulaire. Elle est régulée par de nombreux facteurs de transcription qui induisent les gènes nécessaires à la mise en place d'un nodule fixateur. Parmi ces facteurs de transcription, certains tel que IPD3, NIN, NSP1, NSP2 ou ERN1 sont requis pour l'ensemble des étapes symbiotiques de la signalisation NF au développement nodulaire (Schauser et al., 1999; Kalo et al., 2005; Smit et al., 2005; Middleton et al., 2007; Singh et al., 2014). Leur mutation entraîne des altérations dans chacune des trois étapes du processus symbiotique. Cependant, il est difficile d'exclure la possibilité d'effet en cascade c'est à dire un blocage sur l'étape pré-symbiotique qui se répercuterait sur l'ensemble des étapes en aval.

Le facteur de transcription MtNF-YA1 a d'abord été décrit comme nécessaire pour les étapes d'infection rhizobienne et d'organogénèse nodulaire (Combiér et al., 2006; Laporte et al., 2014). Au cours de ce travail, nous avons caractérisé un nouveau rôle de MtNF-YA1, au cours de l'étape pré-symbiotique. Il rejoint ainsi le petit groupe de facteurs de transcription (cités plus haut) requis pour l'intégralité du processus symbiotique. Si une redondance fonctionnelle a été mise en évidence entre *MtNF-YA1* et *MtNF-YA2*, son efficacité est variable suivant les étapes du processus symbiotique. Alors que MtNF-YA2 peut pallier l'absence de MtNF-YA1 pour l'activation du promoteur de *ERN1*, MtNF-YA1 est absolument requis pour le bon déroulement des étapes ultérieures. Cependant, les phénotypes de développement nodulaire et d'infection du mutant *Mtnf-ya1-1* sont aggravés en diminuant l'expression de *MtNF-YA2* ce qui suggère aussi une redondance partielle lors de ces étapes tardives. Les études réalisées sur les sous-unités NF-YB et NF-YC au cours des étapes précoces de la symbiose rhizobienne ne nous ont pas renseignés sur leurs éventuelles fonctions pré-symbiotiques. Bien que nous ayons identifié *MtNF-YC1* et *MtNF-YC2* dans une banque symbiotique précoce (poils absorbants racinaires traités au NF), la diminution de leur expression ne génère pas de phénotypes comparables à ceux observés avec le RNAi ciblant *MtNF-YA1* et *MtNF-YA2*. Nous pouvons faire l'hypothèse que d'autres sous-unités NF-YC racinaires soient capables de pallier la diminution de l'expression de *MtNF-YC1* et *MtNF-YC2* lors des étapes de signalisation et d'infection. En ce qui concerne les sous-unités NF-YB, aucun phénotype symbiotique n'a pu être observé. Ceci reflète probablement une situation plus complexe où la diversité des sous-unités est telle qu'il est difficile de toutes les éteindre par RNAi pour observer un phénotype. Ainsi, on suppose l'existence d'au moins un dimère NF-YB / NF-YC qui interagit avec MtNF-YA1 et MtNF-YA2 pour l'activation du promoteur de *ERN1* mais nous ne pouvons pas affirmer qu'il soit composé de MtNF-YB16 et MtNF-YC1 ou MtNF-YC2.

Les expérimentations présentées dans ce manuscrit nous ont permis d'identifier et d'étudier quatre nouvelles sous-unités NF-Y impliquées dans la symbiose rhizobienne. Cependant, les études fonctionnelles nous indiquent que ce ne sont probablement pas les seules sous-unités et que d'autres agissent en parallèle. De plus, cette redondance fonctionnelle nous empêche de définir clairement le rôle de ces protéines dans le processus symbiotique. Dans l'objectif d'étudier le ou les rôles précoces des sous-unités NF-YB / NF-YC, nous pouvons envisager des approches de gel retard sur le promoteur de *ERN1* et démontrer que les hétérotrimères NF-Y identifiés sont capables de lier la boîte CCAAT cible.

Une autre alternative consiste à refaire l'expérimentation de CHIP en utilisant cette fois les sous unités NF-YB ou NF-YC pour précipiter les complexes protéines/ADN. Ces approches biochimiques ne sont pas des preuves fonctionnelles mais fournissent une indication sur la capacité de ces sous-unités à lier une boîte CCAAT particulière déjà montrée comme cible de MtNF-YA1. En ce qui concerne MtNF-YA2 il semblerait qu'il ne possède qu'une fonction redondante avec MtNF-YA1, du moins au cours de la symbiose rhizobienne. En effet, la diminution de son expression par RNAi ne semble pas affecter ni la signalisation, ni l'infection ou le développement nodulaire. Cette absence de phénotype peut aussi s'expliquer par l'expression résiduelle de *MtNF-YA2* dans le RNAi. Un mutant d'insertion récemment identifié est en cours de validation et permettra de définir plus précisément les rôles symbiotiques de MtNF-YA2. Nous avons déjà évoqué que de nombreux gènes impliqués dans la symbiose rhizobienne le sont aussi dans la symbiose AM (Oldroyd, 2013). Le profil d'expression de *MtNF-YA2* laisse penser à un rôle probable dans la symbiose AM. Ce gène est en effet exprimé dans les racines de façon constitutive et une étude récente fait état de deux sous-unités NF-YA orthologues de MtNF-YA2 et impliquées dans la symbiose AM chez le soja (Schaarschmidt et al., 2013). La récente obtention de lignées de *M. truncatula* exprimant de façon stable le RNAi ciblant à la fois *MtNF-YA1* et *MtNF-YA2* constituera un bon outil pour étudier le rôle de ces sous-unités dans la symbiose AM.

MtNF-YA1 est la sous-unité NF-Y de *M. truncatula* la mieux caractérisée à ce jour. Il semble que ce facteur de transcription joue au moins deux rôles distincts dans la symbiose rhizobienne. Le premier dans la signalisation NF (Laloum et al., 2014) et dans l'infection rhizobienne (Laporte et al., 2014), le second dans l'organogénèse nodulaire (Combiér et al., 2006). MtNF-YA1 apparaît en effet comme un régulateur de la mise en place du méristème nodulaire, comme cela l'a été démontré dans l'analyse "fate map" récemment publiée où seule la couche cellulaire donnant naissance au méristème (C3) est touchée (Xiao et al., 2014). Cette fonction passe probablement par un contrôle particulier du cycle cellulaire comme cela a aussi été décrit pour PvNF-YC1 (Zanetti et al., 2010). Nous pouvons faire l'hypothèse que ces phénotypes de développement nodulaire de *Mtnfy1-1* ne sont pas uniquement la conséquence de la mauvaise progression des cordons d'infections observés chez ce mutant. En effet ces deux processus, bien qu'ils soient tous les deux requis pour la formation du nodule, ils présentent des caractéristiques partiellement différentes. Afin de préciser et de dissocier les fonctions de MtNF-YA1, plusieurs expérimentations sont envisageables:

- Nous savons que les processus de signalisation NF et d'infection sont tous les deux initiés dans l'épiderme racinaire alors que l'organogénèse est initiée dans le cortex. Ainsi, il serait intéressant d'utiliser des promoteurs avec des expressions spécifiques pour exprimer la construction RNAi-*NF-YA*. Cela nous permettrait de supprimer l'expression de *MtNF-YA1* et *MtNF-YA2* uniquement dans le cortex par l'utilisation du promoteur pCO2 décrit comme spécifique au cortex (Rival et al., 2012). Si le phénotype de *Mtnf-ya1-1* dans l'initiation du méristème nodulaire est indépendant de son rôle épidermique au cours de la signalisation et de l'infection, nous devrions observer la formation de nodule sauvage. De façon complémentaire nous pouvons compléter de façon partielle le mutant *Mtnf-ya1-1* avec *MtNF-YA1* sous le contrôle du promoteur spécifique à l'épiderme pLeEXT, (Rival et al., 2012) ou encore de pCO2, spécifique au cortex. Ces expérimentations présentent cependant quelques limites. Nous savons en effet que l'expression de *MtNF-YA1* est très fortement contrôlée (Combiér et al., 2006; Combiér et al., 2008). Ce contrôle très fin à des raisons biologiques, par exemple: l'utilisation de *MtNF-YA1* insensible au miR169a forme des nodules au développement aberrant (Combiér et al., 2006) et *MtNF-YA1* exprimé sous le contrôle du promoteur constitutif *p35S* ne complète pas le mutant *Mtnf-ya1-1* (Laporte, unpublished data). Ainsi, l'utilisation de promoteurs non endogènes risque de former des artéfacts qui nuiront à lisibilité des phénotypes.
- La surexpression de *LjNF-YA1* entraîne, des divisions cellulaires dans le cortex chez *L. japonicus* (Soyano et al., 2013). Cette pseudo organogénèse nodulaire n'est pas aussi complète que celle observée par les formes auto-actives de DIM3 ou IPD3 (Singh et al., 2014), probablement parce-que ce gène est plus en aval dans la voie de signalisation. Néanmoins, ceci reste un bon outil pour étudier le rôle de *MtNF-YA1* dans l'induction de l'organogénèse nodulaire. Nous pourrions en effet évaluer chez *M. truncatula* si cette organogène nécessite la présence de ERN1 en réalisant ces expériences dans un fond génétique *ern1*. Cela nous permettrait de décrire un rôle de *MtNF-YA1* indépendant de ERN1 au cours de l'organogénèse nodulaire contrairement à son rôle pré-symbiotique sur *ENOD11* (Laloum et al., 2014), discriminant ainsi les deux processus. Ici aussi, il existe quelques limitations à cette expérience, en effet, les données préliminaires réalisées en ce sens (voir chapitre II, partie 2) n'ont pas permis d'obtenir cette pseudo

organogénèse spontanée chez *M. truncatula*. Par conséquent, soit cette expérimentation requiert encore une mise au point soit cette capacité de LjNF-YA1 n'est pas conservée chez *M. truncatula*.

- Enfin, de manière plus mécanistique, l'utilisation de CHIP associée au séquençage haut débit (CHIP-seq) en parallèle à des études transcriptomiques permettra d'étudier les cibles directes de MtNF-YA1. Ainsi, si on observe que certaines cibles de ce facteur de transcription sont spécifiques des processus d'organogénèse ou d'infection (telle que la pectate lyase (Xie et al., 2012)), cela nous permettra de préciser les rôles de MtNF-YA1 au cours de ces différents processus. De façon complémentaire, nous pourrions utiliser les promoteurs spécifiques à l'épiderme et au cortex pour exprimer les versions étiquetées (CHIP) de MtNF-YA1 afin d'avoir une analyse sélective des cibles de ce facteur de transcription.

L'ensemble de ces expérimentations nous permettra de mieux comprendre le rôle joué par les complexes NF-Y au cours des endosymbioses racinaires chez *M. truncatula*. Les pistes que nous avons soulevées jusqu'à maintenant sont prometteuses mais suggèrent un réseau complexe formé par les gènes NF-Y chez *M. truncatula*. Il est probable que les complexes NF-Y symbiotiques ne possèdent pas que des fonctions redondantes entre-eux. Nous pouvons faire l'hypothèse que cette diversité structurelle apporte aussi une certaine modularité à ces complexes leur permettant d'intervenir dans des processus différents.

2. Conservation des complexes NF-Y symbiotiques entre les légumineuses

Des sous-unités NF-Y impliquées dans la symbiose rhizobienne ont été identifiées et étudiées dans plusieurs légumineuses, LjNF-YA1 et LjNF-YB1 chez *L. japonicus*, PvNF-YC1 chez *P. vulgaris* et MtNF-YA1 chez *M. truncatula*. Nous pouvons constater que les trois types de sous-unités sont représentés, NF-YA, NF-YB et NF-YC. Mais ces sous-unités ont été étudiées seules, aucun hétérotrimère NF-Y complet n'a été décrit dans la symbiose rhizobienne. Au cours de ce travail de thèse, nous avons défini plusieurs complexes hétérotrimériques symbiotiques. De façon frappante, les sous-unités MtNF-YB et MtNF-YC

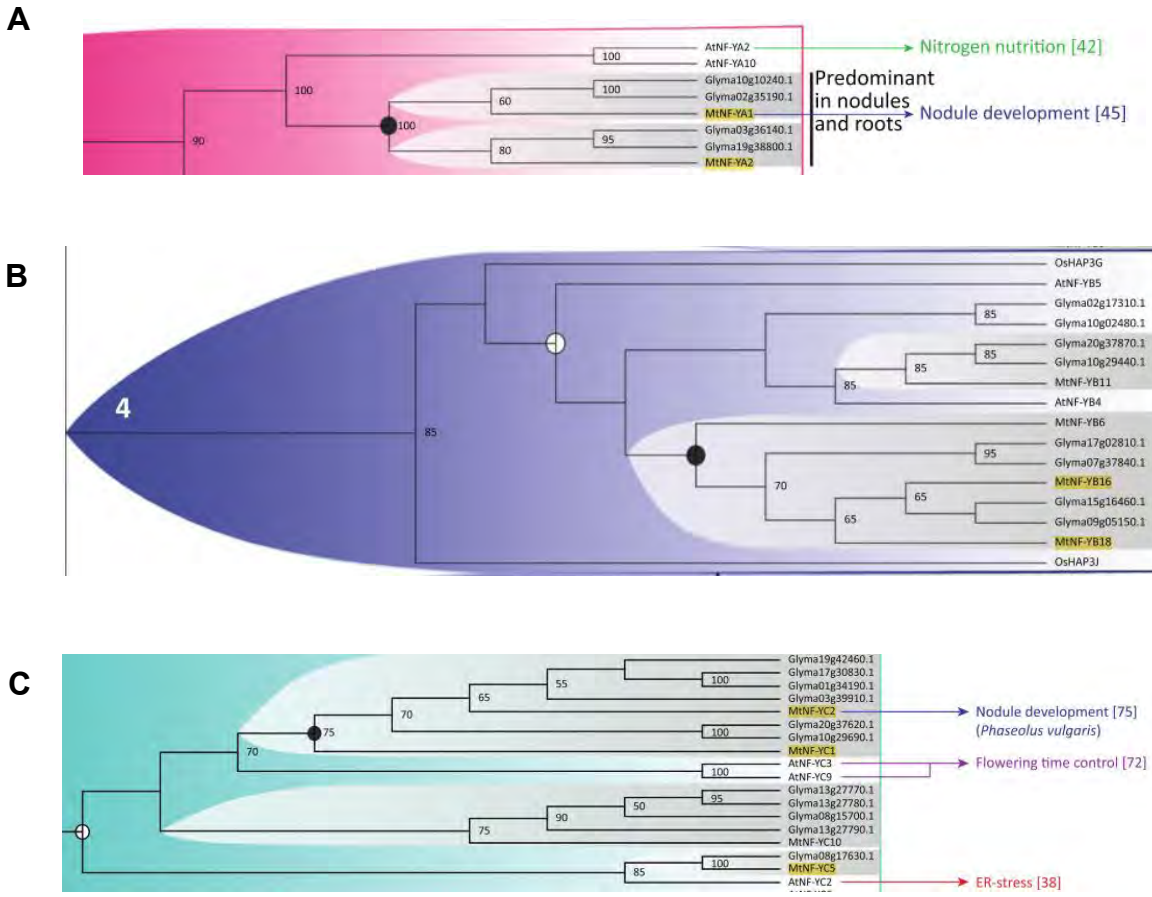


Figure 52: Sous-groupes phylogénétiques incluant les sous-unités NF-Y étudiées.

(A) Partie de l'arbre phylogénétique des NF-YA incluant NF-YA1 et NF-YA2 (surlignés en jaune). (B) Partie de l'arbre phylogénétique des NF-YB incluant NF-YB16 (surligné en jaune). (C) Partie de l'arbre phylogénétique des NF-YC incluant NF-YC1 et NF-YC2 (surlignés en jaune). Les duplications spécifiques aux légumineuses sont symbolisées par un point noir et visualisées en dégradé de gris.

Sources: Laloum et al., 2013

identifiées par des approches sans *a priori* sont les plus proches orthologues de LjNF-YB1 et PvNF-YC1, pour lesquelles un rôle symbiotique a été démontré dans d'autres légumineuses. Ainsi, on observe une conservation des complexes NF-Y symbiotiques entre les légumineuses. Une analyse phylogénétique réalisée dans la revue bibliographique présentée en introduction montre que les cinq sous-unités MtNF-YA1, MtNF-YA2, MtNF-YB16, MtNF-YC1 et MtNF-YC2 sont toutes dans des sous-groupes présentant des duplications spécifiques aux légumineuses (Laloum et al., 2013) (**Figure 52**). Ainsi, il est tentant de faire l'hypothèse que ces sous-unités NF-Y sont issues de duplication récente (Young et al., 2011) et spécifiquement recrutées pour la symbiose rhizobienne. Dans la famille des légumineuses, il a en effet été décrit une duplication de l'ensemble du génome, il y a 58 millions d'années. Ce processus de spécialisation, qui peut être associé à une modification du profil d'expression, a déjà été décrit pour *NFP* et *LYRI* ou encore *ERN1* et *ERN2* (Young et al., 2011; Cerri et al., 2012; Laloum, 2013).

Cette hypothèse de conservation est basée sur les études phylogénétiques de la composition en acides aminés des sous-unités NF-YB et NF-YC. Or, les analyses de la spécificité d'interaction chez *A. thaliana* (Calvenzani et al., 2012; Hackenberg et al., 2012) et nos propres expérimentations tendent à démontrer que cette spécificité d'interaction, qui dépend de la composition en acides aminés, est partielle voire faible. Par conséquent, en théorie, n'importe quelle sous-unité NF-Y pourrait jouer un rôle dans la symbiose pour peu qu'elle y est exprimée, et la conservation que nous avons observée n'aurait pas de sens biologique. Cependant, au-delà du complexe NF-Y, la capacité des sous-unités à interagir avec les co-régulateurs est importante pour le processus concerné. Même si les protéines sont interchangeables, au sein du complexe NF-Y, leur capacité à recruter des partenaires peut varier d'une protéine NF-Y à une autre. Cette capacité n'interfère pas *a priori* avec la spécificité d'interaction au sein du complexe NF-Y et elle est de plus dépendante de la composition en acides aminés. Ainsi, nous pouvons faire l'hypothèse que les sous-unités que nous avons identifiées sont conservées entre les légumineuses car elles présentent une affinité plus forte d'interaction au sein du complexe NF-Y et elles possèdent la capacité de recruter des partenaires symbiotiques spécifiques. Même si en cas d'absence, d'autres sous-unités NF-Y présentes arrivent à prendre le relais, comme montré par nos analyses fonctionnelles. Il est aussi possible que ce remplacement diminue l'efficacité des complexe NF-Y de façon subtile et nécessitant un phénotype fin pour être mesurée.

Au-delà de cette apparente conservation des complexes NF-Y symbiotiques, nous pouvons noter quelques différences entre les légumineuses étudiées. Par exemple, alors que l'extinction spécifique d'une seule sous-unité *PvNF-YC1* entraîne un phénotype symbiotique fort au niveau de l'infection rhizobienne et de l'organogénèse nodulaire, il est nécessaire d'éteindre les deux gènes orthologues : *MtNF-YC1* et *MtNF-YC2* pour obtenir un phénotype chez *M. truncatula*. De la même façon, les profils d'expression des sous-unités semblent varier d'une plante à l'autre : alors que *PvNF-YC1* est fortement induit par la symbiose, les orthologues *MtNF-YC1* et *MtNF-YC2* ne sont pas induits dans les nodules. Enfin, nos expérimentations d'interaction avec MtSIN1 semblent indiquer que les orthologues des protéines *PvNF-YC1* et *PvSIN1* n'interagissent pas chez *M. truncatula*. Bien sûr ces expérimentations ne sont pas complètes et dans le cadre d'un résultat négatif, il est toujours délicat de conclure. Afin d'avoir une idée plus précise de la question, il serait intéressant d'initier des tests d'interaction croisée entre les protéines de *M. truncatula* et celles de *P. vulgaris*. Si les sous-unités MtNF-YC2 et MtNF-YC1 sont en effet capables d'interagir avec *PvSIN1* mais pas avec MtSIN1, cela démontrerait que cette absence d'interaction est due à une évolution de la protéine GRAS et non des sous-unités NF-Y. De façon similaire, lorsque nous avons répété chez *M. truncatula* les expérimentations d'organogénèse spontanée réalisées chez *L. japonicus* (Soyano et al., 2013), nous n'avons pas réussi à reproduire les phénotypes observés. Au-delà d'un problème technique, ce résultat négatif peut provenir d'une différence intrinsèque des complexes NF-Y et du processus symbiotique entre ces deux légumineuses.

Ces différences entre les systèmes ne sont pas incohérentes, en effet, *L. japonicus* et *P. vulgaris* sont des légumineuses avec des nodules à croissance déterminée alors que *M. truncatula* possède des nodules à croissance indéterminée. Il est relativement bien décrit que ces deux types de nodules ont une initiation et une morphologie très différente, particulièrement en ce qui concerne le méristème et sa maintenance. Dans cette étude, nous avons identifié des protéines conservées entre les légumineuses avec des rôles dans l'organogénèse nodulaire. Etant donné la différence entre ces deux types de nodules, nous pouvons faire l'hypothèse que les facteurs de transcription NF-Y impliqués dans ces organogénèses nodulaires ont des rôles et des cibles partiellement différents. Afin de mieux comprendre quelles peuvent être les différences et similarités entre les complexes NF-Y dans les deux systèmes nodulaires, nous pouvons envisager l'analyse de cibles de ces facteurs de transcription par ChIP-seq. De manière plus développementale, nous pouvons aussi réaliser

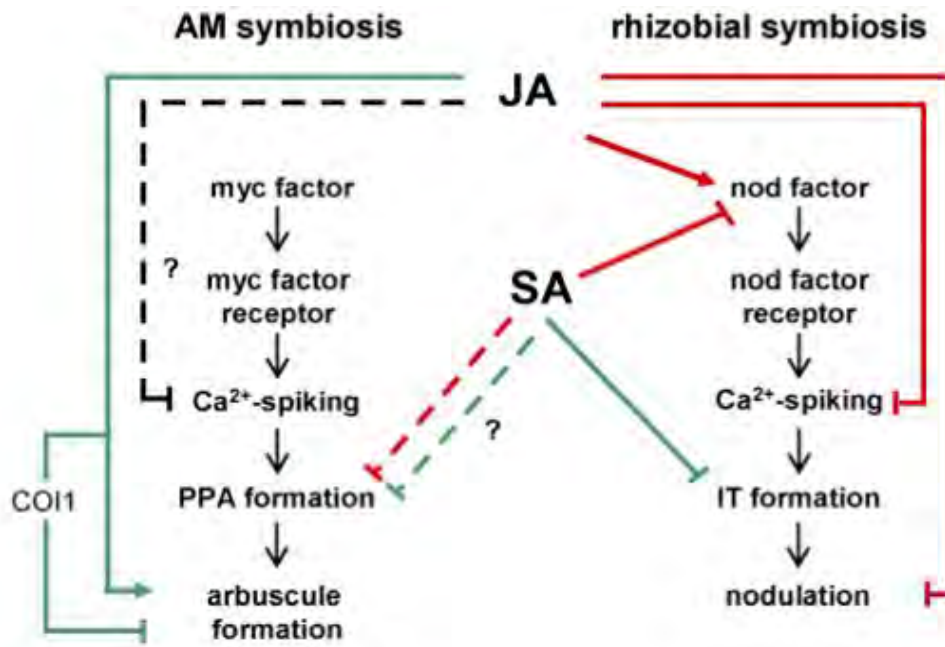


Figure 53: Représentation schématique de l'influence du JA et SA sur les endosymbioses racinaires.

une analyse "fate-map" des nodules indéterminés de *L. japonicus* et/ou *P. vulgaris*, comparer des nodules sauvages et déficients pour les sous-unités NF-Y afin de comprendre plus précisément leurs rôles.

3. Quel est le rôle des TINs dans la symbiose rhizobienne?

Au cours de ce travail, une approche de crible double hybride sur une banque de cDNA symbiotiques a permis l'identification de deux protéines JAZ interagissant avec MtNF-YC2. Ces deux protéines appelées TIN1 et TIN2 pour TIFY proteins Involved in Nodulation représentent une classe de protéines encore jamais étudiées au cours de la symbiose rhizobienne. Le mode d'action des protéines JAZ est intimement lié à l'acide jasmonique (JA), une hormone végétale impliquée dans des processus développementaux et de défense. Le rôle du JA dans les endosymbioses racinaires a déjà été étudié, avec des conclusions partielles et parfois contradictoires (Wasternack and Hause, 2013) (**Figure 53**). L'une des premières descriptions du rôle du JA dans la nodulation a été sa capacité à induire les gènes *nod* des rhizobia par une application exogène, promouvant ainsi la capacité d'interaction (Rosas et al., 1998; Mabood et al., 2006). Cependant, de façon contradictoire, chez *M. truncatula*, il a été montré un effet négatif du JA sur l'induction des nodulines précoces et les oscillations calciques (Miwa et al., 2006; Sun et al., 2006). En ce qui concerne le développement nodulaire, le JA a aussi été caractérisé comme régulateur positif ou négatif en fonction des plantes ou des approches utilisées (Ding and Oldroyd, 2009; Gutjahr and Paszkowski, 2009). Chez *M. truncatula*, il a été montré que le niveau endogène de JA n'était pas affecté par l'inoculation de rhizobia (Zdyb et al., 2011). De plus, la diminution de la production de JA dans les racines par RNAi sur un gène de biosynthèse (transformation hairy-root) n'affecte en rien le nombre ou la morphologie des nodules (Zdyb et al., 2011). De façon systémique, il a été démontré un rôle du JA dans la régulation de la nodulation en réponse à la lumière et dans l'AON. Ces deux processus qui nécessitent un signal foliaire qui agit au niveau racinaire impliquent le JA comme régulateur positif de la formation des nodules (Kinkema and Gresshoff, 2008; Shigeyama et al., 2012). En conclusion, comme de nombreuses hormones, le JA présente des rôles pléiotropes et parfois antagonistes au cours de la symbiose rhizobienne. La situation se complique encore si on considère que les JAZ bien qu'étant un élément essentiel de la signalisation JA, ont un effet de répression de la réponse

hormonale en inhibant la transcription des gènes en aval. De plus, les JAZ ont été montrées comme impliquées dans les signalisations croisées avec les hormones éthylène, acide salicylique et auxine qui ont toutes des effets sur la symbiose (Oldroyd et al., 2011; Wasternack and Hause, 2013). Ainsi, il est très compliqué de prédire le rôle symbiotique que pourrait jouer les protéines TIN dans le cadre de la signalisation hormonale. Si ces protéines sont bien des JAZ, elles peuvent aussi bien être régulées par le JA, mais aussi l'auxine ou l'acide salicylique et en tant que répresseurs, elles peuvent réguler négativement un processus positif ou négatif dans la symbiose rhizobienne.

Afin de préciser ce rôle, nous pouvons envisager plusieurs expérimentations permettant à la fois de définir la voie de signalisation et les processus dans lesquels TIN1 et TIN2 pourraient intervenir. Premièrement, les seules données d'expression dont nous disposons, proviennent du projet Symbimics et du MtGEA. Elles nous indiquent que *TIN1* et *TIN2* sont induits fortement par le JA, or cette hormone est produite très rapidement après une blessure des tissus (Wasternack and Hause, 2013). De plus il a été montré une forte accumulation de JA dans les nodules après seulement 30 minutes de chocs mécaniques (Zdyb et al., 2011). Ainsi, dans le cadre des études transcriptomiques les nodules prélevés sont coupés de la racine un par un avant d'être congelés et sont comparés à des racines carencées en azote mais sans blessures. Il est donc possible que la forte induction des TIN dans les nodules soit "parasite" et résulte de la manière dont sont préparés les échantillons. Il serait donc intéressant de refaire ces expérimentations en tenant compte de cette particularité et en comparant par exemple les nodules aux racines blessées ou en réalisant une préfixation des nodules coupés. De plus, nous pouvons aussi envisager des traitements exogènes de JA sur les racines ou des approches pharmacologiques pour diminuer la teneur en JA et mieux évaluer l'expression de *TIN1* et *TIN2* en réponse à cette hormone. Même s'il est toujours délicat de modifier les balances hormonales, de par leur effet systémique et interdépendant, les traitements exogènes d'hormones induisent de nombreux artéfacts. Nous savons aussi que l'éthylène et l'auxine jouent des rôles importants dans la formation du nodule, nous pouvons donc utiliser le mutant hyper nodulant et insensible à l'éthylène *sickle* (Penmetsa and Cook, 1997) ou des traitements d'auxine ou éthylène afin de compléter ces expérimentations d'expression et tenter d'identifier les voies d'activation des *TINs*. Au niveau fonctionnel, il a été montré que l'ajout de 1 μ M de JA exogène inhibe de façon drastique le nombre de nodules par racine chez *M. truncatula* (ces concentrations affectent aussi la croissance racinaire) (Sun et al., 2006). Ainsi, il serait intéressant de tester l'évolution de ce phénotype sur les mutants

dans les gènes TINs, le RNAi sur *TIN1* et *TIN2* ou encore des racines sur-exprimant les TINs. Ici aussi, une limitation importante est apportée par la manipulation des hormones. Notamment, l'utilisation de transformations transitoires par "hairy roots" modifie les balances hormonales (Boisson-Dernier et al., 2001) racinaires rendant toutes conclusions délicates.

Si on réfléchit au rôle de TIN1 et TIN2 en interaction avec les complexes NF-Y symbiotiques, il nous reste à définir quelques points au niveau mécanistique et fonctionnel. Premièrement, si les TINs sont bien des protéines JAZ, leur mode d'action consiste à inhiber l'activité transcriptionnelle des protéines régulant l'expression des gènes de réponse au JA. Ainsi, TIN1 et TIN2 inhiberaient l'activité transcriptionnelle des complexes NF-Y dans les nodules en interagissant avec MtNF-YC2 ou MtNF-YC1 en l'absence de JA. Si l'on considère que les complexes NF-Y régulent positivement la nodulation (leur mutation affecte le nombre et la morphologie des nodules), dans ce schéma, TIN1 et TIN2 inhiberaient ce processus de manière dépendante du JA. L'action des complexes NF-Y au sein des nodules serait alors dépendante de cette hormone. Etant donné le relativement faible niveau d'expression de *TIN1* et *TIN2* dans les nodules (environ dix fois plus faible que les sous-unités NF-Y d'après Symbimics) il est aussi probable que ce contrôle soit épisodique ou spécifique à un processus particulier dans des couches cellulaires spécifiques et difficilement mesurable. Afin d'aller plus loin dans cette analyse, il est important de déterminer que les TINs sont effectivement des répresseurs transcriptionnels. Pour cela, des expérimentations sont actuellement en cours au VIB à Gent pour déterminer par transactivation dans des protoplastes de tabacs si TIN1 et TIN2 sont capables de diminuer l'activité transcriptionnelle des NF-Y sur le promoteur d'*ERN1*. Cette étude mécanistique n'aura en réalité que peu de sens biologique. En effet, la régulation d'*ERN1* par MtNF-YA1 et MtNF-YA2 a été démontrée au cours de la signalisation NF or, les données d'expression disponibles ne montrent aucune induction de *TIN1* et *TIN2* par un traitement NF un niveau d'expression peine détectable dans les racines. Par conséquent, il est peu probable que les TIN jouent un rôle au cours des étapes précoces de la symbiose rhizobienne.

En ce qui concerne l'interaction entre les TINs et les NF-Y, nous avons soulevé plusieurs points intéressants qui restent à confirmer dans d'autres systèmes d'interaction protéines / protéines. Nous avons en effet identifié l'interaction entre MtNF-YC2 et TIN1 / TIN2 lors d'un crible double hybride dans la levure. Cette interaction a ensuite été confirmée dans le même système pour la protéine TIN1. Lors de cette validation, nous avons aussi testé

la capacité de TIN1 à interagir avec les sous-unités MtNF-YA1, MtNF-YB16, MtNF-YC1 et MtNF-YC2 mutée sur deux acides aminés. De façon intéressante, nous avons obtenu une interaction avec MtNF-YA1, MtNF-YC1 mais pas avec MtNF-YB16 et MtNF-YC2**. L'interaction avec MtNF-YC1 n'est pas étonnante, étant donné que MtNF-YC2 et MtNF-YC1 sont très proches (82% d'identité) et occupent des fonctions redondantes dans le développement nodulaire. L'absence d'interaction avec MtNF-YC2** est plus étonnante, en effet, l'isoleucine 136 et la leucine 139 ont été décrites comme indispensables à la formation du trimère NF-Y. En effet, chez les mammifères, la sous-unité NF-YC I77D/L80E perd sa capacité à lier l'ADN, et à interagir avec NF-YB et NF-YA, cependant, rien n'est décrit quant à l'interaction avec d'autres protéines au-delà du complexe NF-Y (Kim et al., 1996). Ces acides aminés se trouvent au cœur du domaine HFM (Histone Fold Motif) des NF-YC qui est essentiel pour leurs fonctions au sein du complexe NF-Y, mais peu de choses sont décrites quant aux domaines requis pour les autres types d'interactions. Dans le cadre de l'interaction entre PvSIN1 et PvNF-YC1, il a été montré que le domaine HFM de PvNF-YC1 n'était pas suffisant pour l'interaction avec PvSIN1 (Battaglia et al., 2014). Les délétions séparées des parties en amont ou en aval de l'HFM n'affectent pas l'interaction, mais l'association des deux délétions entraîne la perte d'interaction. Il semble donc que d'autres parties que le domaine HFM soient requises pour le recrutement des partenaires mais il est difficile de clairement les définir. Chez les animaux, la quatrième hélice α (α C, en C-terminal) des NF-YC a été caractérisée comme étant la cible de protéines régulatrices agissant avec les complexes NF-Y (Romier et al., 2003). Dans notre cas, l'effet des mutations ponctuelles, qui affectent la possibilité de NF-YC2 à former un trimère avec des sous-unités NF-YA et NF-YB, peut aussi suggérer que TIN1 n'interagit pas directement ou uniquement avec MtNF-YC2 mais aussi via ou avec d'autres membres du complexe NF-Y, ou qu'il nécessite un complexe NF-Y trimérique pour interagir. En effet, il existe dans la levure des sous-unités NF-YA et NF-YB qui peuvent s'associer avec MtNF-YC2 lors de nos tests en double hybride, l'expression de la sous-unité MtNF-YC2** abolit l'ensemble de ces interactions ce qui peut avoir des répercussions sur l'interaction avec TIN1. L'interaction observée entre MtNF-YA1 et TIN1 dans la levure abonde dans ce sens. Il est en effet possible que TIN1 interagisse avec la sous-unité NF-YA du complexe NF-Y et non directement avec la sous-unité NF-YC. Dans tous les cas, ces expérimentations nécessitent des validations afin de confirmer ces interactions et l'utilisation d'autres contrôles tels que NF-YA1* (K171E) peut nous aider à mieux les comprendre. Enfin, dans le cadre de la conservation entre les légumineuses, il serait

intéressant d'observer ces protéines TINs dans d'autres systèmes symbiotiques et de tester leur capacité à interagir avec les complexes NF-Y.

4. Formation des complexes hétérotrimériques.

La formation des complexes NF-Y est très bien décrite dans les systèmes animaux où il n'existe qu'une seule version de chaque type de sous-unité. Chez les plantes la situation est légèrement différente, et la multiplicité des sous-unités crée une nouvelle problématique : Est-ce qu'il existe une spécificité d'interaction entre les protéines NF-Y ou est-ce que le nombre de complexes NF-Y possibles est uniquement limité par le profil d'expression de chacun des gènes. Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction (partie 3.2.2.3.), deux études majeures se sont penchées sur la question avec les protéines NF-Y d'*A. thaliana* (Calvenzani et al., 2012; Hackenberg et al., 2012). Bien que les conclusions des deux études diffèrent légèrement il semblerait que la formation des complexes NF-Y de plantes soit très similaire à ce qui a été décrit chez les animaux. Même si le travail fourni au cours de cette thèse ne consistait pas en une étude systématique de la formation complexes NF-Y, nos résultats amènent quelques réflexions quant à la spécificité d'interaction et la formation de ces complexes. Nous avons en effet testé plusieurs interactions entre les sous-unités NF-Y avec des systèmes à deux et trois composantes. De plus nous avons réalisé des substitutions d'acides aminés essentiels dans les domaines d'interaction protéine / protéine et protéine / ADN et étudié la localisation et relocalisation subcellulaire des NF-Y.

Dans le cadre de notre étude, nous avons comme point de départ la sous-unité MtNF-YA1 et une partie de la thèse consistait à identifier les protéines NF-YB et NF-YC capables de former des complexes avec MtNF-YA1. Au début de ce travail, les études sur la spécificité d'interaction n'étaient pas publiées et il n'existait encore aucune sous-unité NF-YB et NF-YC caractérisée dans la symbiose rhizobienne. Nous avons donc choisi une approche sans *a priori* avec un crible double hybride. Le premier résultat surprenant, est l'interaction identifiée entre MtNF-YA1 et les sous-unités MtNF-YC1 et MtNF-YC2. En effet dans les systèmes animaux, il a été décrit que ce type d'interaction nécessitait au préalable la formation du dimère NF-YB/NF-YC (Mantovani, 1999). De plus les tests d'interactions entre les sous-unités NF-YA et NF-YC ou NF-YB d'*A. thaliana* confirment ces observations : parmi les 600 interactions

testés seule AtNF-YA3 a montré une interaction positive avec AtNF-YC1 et AtNF-YC4 (Hackenberg et al., 2012). Ces interactions ne sont pas discutées dans l'article, cependant, AtNF-YA3, AtNF-YC1 et AtNF-YC4 sont relativement éloignées de nos protéines NF-Y symbiotiques (Laloum et al., 2013). De façon intéressante, AtNF-YC1 et AtNF-YC4 sont très proche phylogénétiquement et possèdent peut être des caractéristiques qui autorisent ce type d'interaction. Une hypothèse probable est que ce type d'interaction soit dépendant de la sous-unité NF-YB présente dans la levure. En effet, chez le rat il a déjà été démontré que la sous-unité NF-YC est capable de s'associer avec les NF-YB et NF-YA de levure afin de former un complexe NF-Y stable et capable de lier l'ADN (Sinha et al., 1995). Afin de démontrer cette hypothèse, il nous faudrait utiliser des mutants de levure dans la sous-unité NF-YB afin d'identifier si l'interaction entre MtNF-YA1 et les MtNF-YC en est dépendante. Un autre moyen serait de cloner la sous-unité NF-YB de levure et tester directement sa capacité à interagir avec MtNF-YC1 ou MtNF-YC2. L'interaction entre MtNF-YA1 et MtNF-YC1 ou MtNF-YC2 identifiée dans la levure n'a jamais pu être confirmée dans un système plante tel que le BiFC. Ce résultat négatif est difficilement interprétable car il existe probablement des sous-unités NF-YB exprimées dans les feuilles de *N. benthamiana* qui devraient pouvoir interagir avec MtNF-YC1 ou MtNF-YC2 comme le NF-YB de levure. Cependant, cette absence d'interaction peut aussi être la conséquence d'un problème technique même si l'analyse en western blot montre une expression correcte des protéines. D'autre part, les expérimentations d'interaction deux à deux avec MtNF-YA1 et les protéines NF-YB que nous avons cloné n'ont en aucun cas été positives. Afin d'observer une interaction de ce type il nous a fallu co-exprimer les sous-unités MtNF-YC1 ou MtNF-YC2 dans la levure. Par conséquent, nous pouvons faire l'hypothèse que la sous-unité NF-YC de levure n'est pas présente ou incapable de pallier l'absence d'une sous-unité NF-YC de plante pour former le dimère NF-YB / NF-YC requis pour l'interaction avec les NF-YA. Nous pouvons noter que ces résultats sont en désaccord avec l'interaction entre les protéines de *L. japonicus* LjNF-YB1 et LjNF-YA1 identifiée en BiFC. Bien que les systèmes soient *a priori* différents, nous avons nous même testé ce type d'interaction en BiFC avec nos protéines sans succès.

En ce qui concerne la spécificité d'interaction, nous avons testé au cours de ce travail la capacité de six NF-YB à interagir avec MtNF-YC2. Nous avons identifié une certaine spécificité d'interaction puisque MtNF-YB3 et MtNF-YB10 qui appartiennent au groupe de LEC1 et LEC1-like (Laloum et al., 2013) ne sont pas capables d'interagir avec MtNF-YC2. Ces conclusions ne sont cependant pas définitives, nous avons en effet testé cette interaction

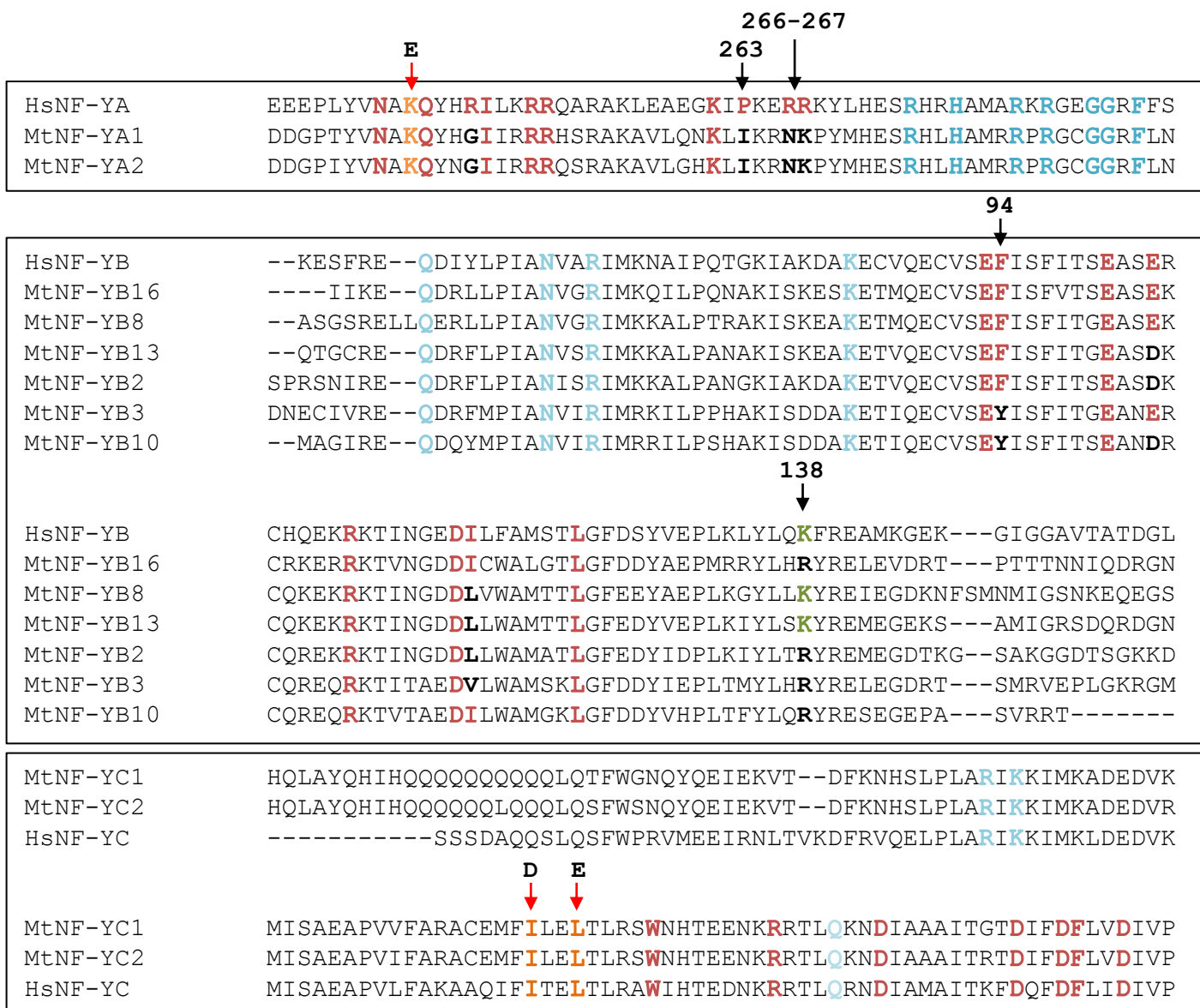


Figure 54: Alignement protéique des sous-unités NF-Y étudiées au cours de la thèse avec les sous-unités humaines.

Alignement partiel, des domaines conservés avec le logiciel MAFFT <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>. Mise en évidence des résidus essentiels pour l'hétérotrimérisation (X), la liaison avec la boîte CCAAT (X), les liaisons non spécifiques avec l'ADN (X) la lysine 138 monoubiquitinée (X) et les résidus mutés au cours de nos expérimentations (X) avec les remplacements effectués indiqués par des flèches rouges. Les positions des résidus clés sont indiquées par des flèches noires. Ces résidus clés ont été identifiés d'après : Petroni et al., 2012 et Nardini et al., 2013

uniquement dans la levure et nous n'avons pas vérifié l'expression des protéines. De plus, l'étude d'interaction systématique de Calvenzani et ses collaborateurs a démontré que la sous-unité AtNF-YB9 (orthologue de MtNF-YB10) est incapable d'interagir avec les protéines NF-YC dans la levure cependant, ces interactions étaient possibles dans d'autres systèmes (Calvenzani et al., 2012). Même s'il est difficile de comprendre ces différences il conviendrait de tester ces interactions entre MtNF-YC2 et MtNF-YB3 et B10 en BiFC ou CoIP par exemple. Nos données d'interaction sont de plus légèrement contradictoires avec les expérimentations sur *L. japonicus* (Soyano et al., 2013). En effet, même s'il s'agit d'un autre système, les auteurs de cette étude ont démontré que LjNF-YB1 est capable d'interagir avec LjNF-YA1 et LjNF-YA2 alors que LjNF-YB2 est incapable d'interagir avec LjNF-YA1 mais peut interagir avec LjNF-YA2. LjNF-YB2 se trouve dans le même sous-groupe phylogénétique que MtNF-YB13 et MtNF-YB2 qui n'ont pas montré de différences d'interaction avec MtNF-YB16. Bien sûr nous ne comparons pas les mêmes données, il est donc impossible d'affirmer que ces données sont contradictoires mais il semble y avoir une spécificité d'interaction accrue chez *L. japonicus*.

Des études approfondies de structures / fonction sur les sous-unités NF-Y humaines ont permis d'identifier les domaines et des acides aminés essentielles aux fonctions de ces protéines (Mantovani et al., 1994; Kim et al., 1996; Sinha et al., 1996). Plus récemment une analyse de la structure tridimensionnelle des complexes NF-Y en association ou non avec l'ADN a permis d'aller plus loin dans la caractérisation du rôle des acides aminés (Nardini et al., 2013) (**Figure 54**). En recherchant ces résidus chez les protéines NF-Y que nous avons étudié, on constate qu'ils sont parfaitement conservés chez les sous-unités MtNF-YC1 et MtNF-YC2 alors qu'on note quelques différences chez les sous-unités NF-YB et NF-YA. Ces mutations ne concernent que les acides aminés impliqués dans la formation des hétérotrimères NF-Y, et non les résidus requis pour la liaison à l'ADN. Chez MtNF-YA1 et MtNF-YA2, la proline 263 et des arginines 266 et 267 sont mutées en des résidus avec des propriétés physico-chimiques relativement différentes (respectivement isoleucine, asparagine et lysine). Ces acides aminés qui se trouvent dans le connecteur entre les domaines A1 et A2 sont impliqués dans les changements de conformation de ces domaines pour l'optimisation des interactions avec l'ADN et le dimère NF-YB / NF-YC. Ces mutations peuvent être à l'origine d'un mode d'action différent des NF-YA de plantes. De façon générale, il n'y a à ce jour aucune étude complète de la spécificité d'interaction des protéines NF-YA chez les plantes même s'il semble que les NF-YA sont capables d'interagir avec la plupart des dimères NF-

YB/NF-YC (Petroni et al., 2012). Sur les NF-YB, la phénylalanine 94 (essentielle pour l'hétérotrimérisation d'après (Nardini et al., 2013)) est mutée en tyrosine uniquement chez les protéines LEC qui n'interagissent pas avec MtNF-YC2. Cependant, la ressemblance de ces deux acides aminés (tous les deux aromatiques) suggère que cette mutation n'est pas suffisante pour expliquer cette spécificité d'interaction. Nous pouvons aussi noter la variation de deux autres acides aminés requis pour l'hétérotrimérisation chez les NF-YB mais qui ne présentent pas de corrélation avec nos données d'interactions. La sous-unité MtNF-YB16 qui est la protéine qui semble la plus pertinente dans le contexte des complexes NF-Y symbiotiques ne présente aucune variation par rapport à la protéine NF-YB humaine sur les résidus essentiels pour la formation de complexes.

Au-delà de la formation des hétérotrimères, il a été identifié chez les mammifères le résidu lysine 138 qui subit une mono-ubiquitination indispensable à l'activation de la transcription (Nardini et al., 2013)(**Figure 54**). De façon surprenante, cet acide aminé est muté chez MtNF-YB16, B2, B3 et B10 en un résidu arginine. Chez les mammifères la mutation K138R n'affecte en rien la formation du trimère NF-Y et sa liaison à l'ADN, cependant, l'arginine ne subit pas de mono-ubiquitination ce qui a une conséquence sur l'activation des gènes cibles (Nardini et al., 2013). Cette mutation est aussi conservée chez la protéine LJNF-YB1(Soyano et al., 2013) et sur environ un tiers des NF-YB de *M. truncatula*. Si le rôle de ce résidu est conservé chez les plantes, cela signifierait que les protéines NF-YB présentant cette mutation agiraient en tant que dominant négatif en recrutant les partenaires NF-Y et en liant les boîtes CCAAT mais sans en activer la transcription. Afin de confirmer ces hypothèses il serait intéressant de réaliser les expérimentations de détection de mono-ubiquitination sur les sous-unités NF-YB de plante présentant ou non la mutation. Dans tous les cas, si MtNF-YB16 est une sous-unité dominante négative, cela peut expliquer l'absence de phénotypes symbiotiques dans nos expérimentations fonctionnelles.

Les facteurs de transcription NF-Y de plantes présentent beaucoup de similarité avec leurs orthologues chez les mammifères. Cependant on note quelques variations entre les deux systèmes mais le manque d'étude structure/fonction approfondie chez les plantes ne permet pas de comprendre leur sens. A l'heure où les complexes sont identifiés dans de nombreux processus comme des acteurs clef, il devient primordial de mieux comprendre la biochimie de ces facteurs de transcription chez les plantes.

CHAPITRE V : BIBLIOGRAPHIE

- Alber, T.** (1992). Structure of the leucine zipper. *Curr Opin Genet Dev* **2**, 205-210.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D.** (1994). *Molecular Biology of the Cell.* (Garland science).
- Alunni, B., Kevei, Z., Redondo-Nieto, M., Kondorosi, A., Mergaert, P., and Kondorosi, E.** (2007). Genomic organization and evolutionary insights on GRP and NCR genes, two large nodule-specific gene families in *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 1138-1148.
- 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.
- Ané, 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**, 1364-1367.
- Antolín-Llovera, M., Ried, M.K., and Parniske, M.** (2014). Cleavage of the SYMBIOSIS RECEPTOR-LIKE KINASE ectodomain promotes complex formation with Nod factor receptor 5. *Curr Biol* **24**, 422-427.
- Aravind, L., Anantharaman, V., Balaji, S., Babu, M.M., and Iyer, L.M.** (2005). The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 231-262.
- 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.
- Bai, Y., Meng, Y., Huang, D., Qi, Y., and Chen, M.** (2011). Origin and evolutionary analysis of the plant-specific TIFY transcription factor family. *Genomics* **98**, 128-136.
- Battaglia, M., Ripodas, C., Clúa, J., Baudin, M., Aguilar, O.M., Niebel, A., Zanetti, M.E., and Blanco, F.A.** (2014). A nuclear factor Y interacting protein of the GRAS family is required for nodule organogenesis, infection thread progression, and lateral root growth. *Plant Physiol* **164**, 1430-1442.
- Baxevanis, A.D., Arents, G., Moudrianakis, E.N., and Landsman, D.** (1995). A variety of DNA-binding and multimeric proteins contain the histone fold motif. *Nucleic Acids Res* **23**, 2685-2691.
- 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.
- Bensmihen, S., de Billy, F., and Gough, C.** (2011). Contribution of NFP LysM Domains to the Recognition of Nod Factors during the *Medicago truncatula*/*Sinorhizobium meliloti* Symbiosis. *Plos One* **6**.

- Berg, J.M.** (1990). Zinc finger domains: hypotheses and current knowledge. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **19**, 405-421.
- Besserer, A., Puech-Pagès, V., Kiefer, P., Gomez-Roldan, V., Jauneau, A., Roy, S., Portais, J.C., Roux, C., Bécard, G., and Séjalon-Delmas, N.** (2006). Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol* **4**, e226.
- Bogdanove, A.J., and Voytas, D.F.** (2011). TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science* **333**, 1843-1846.
- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Bécard, G., Rosenberg, C., and Barker, D.G.** (2001). *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 695-700.
- 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.
- Bonfante, P., and Genre, A.** (2008). Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. *Trends in Plant Science* **13**, 492-498.
- Braybrook, S.A., and Harada, J.J.** (2008). LECs go crazy in embryo development. *Trends Plant Sci* **13**, 624-630.
- Bucher, P.** (1990). Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J Mol Biol* **212**, 563-578.
- 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**.
- Cao, S., Kumimoto, R.W., Gnesutta, N., Calogero, A.M., Mantovani, R., and Holt, B.F.** (2014). A Distal CCAAT/NUCLEAR FACTOR Y Complex Promotes Chromatin Looping at the FLOWERING LOCUS T Promoter and Regulates the Timing of Flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**, 1009-1017.
- 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.
- 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**, 1507-1518.
- Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, R.V., Journet, E.P., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C., and Denarie, J.** (2000). Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell* **12**, 1647-1665.
- Causier, B., Ashworth, M., Guo, W., and Davies, B.** (2012). The TOPLESS interactome: a framework for gene repression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **158**, 423-438.
- Cebolla, A., Vinardell, J.M., Kiss, E., Oláh, B., Roudier, F., Kondorosi, A., and Kondorosi, E.** (1999). The mitotic inhibitor *ccs52* is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *EMBO J* **18**, 4476-4484.
- 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.
- Chabaud, M., Genre, A., Sieberer, B.J., Faccio, A., Fournier, J., Novero, M., Barker, D.G., and Bonfante, P.** (2011). Arbuscular mycorrhizal hyphopodia and germinated spore exudates trigger Ca²⁺ spiking in the legume and nonlegume root epidermis. *New Phytol* **189**, 347-355.
- Chae, H., Yun, J., Bang, Y., and Shin, D.** (2004). Cdk2-dependent phosphorylation of the NF-Y transcription factor is essential for the expression of the cell cycle-regulatory genes and cell cycle G1/S and G2/M transitions. *Oncogene* **23**, 4084-4088.
- Charoensawan, V., Wilson, D., and Teichmann, S.A.** (2010). Genomic repertoires of DNA-binding transcription factors across the tree of life. *Nucleic Acids Res* **38**, 7364-7377.
- Chen, C.F., He, X., Arslan, A.D., Mo, Y.Y., Reinhold, W.C., Pommier, Y., and Beck, W.T.** (2011). Novel regulation of nuclear factor-YB by miR-485-3p affects the expression of DNA topoisomerase II α and drug responsiveness. *Mol Pharmacol* **79**, 735-741.
- Chini, A., Fonseca, S., Chico, J.M., Fernández-Calvo, P., and Solano, R.** (2009). The ZIM domain mediates homo- and heteromeric interactions between Arabidopsis JAZ proteins. *Plant J* **59**, 77-87.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., García-Casado, G., López-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L., and Solano, R.** (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**, 666-671.
- Chung, H.S., and Howe, G.A.** (2009). A critical role for the TIFY motif in repression of jasmonate signaling by a stabilized splice variant of the JASMONATE ZIM-domain protein JAZ10 in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**, 131-145.
- Clement, L.W., Köppen, S.C., Brand, W.A., and Heil, M.** (2008). Strategies of a parasite of the ant-Acacia mutualism. *Behav Ecol Sociobiol* **62**, 953-962.
- 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.
- 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.
- Cooper, J.B., and Long, S.R.** (1994). Morphogenetic Rescue of *Rhizobium meliloti* Nodulation Mutants by trans-Zeatin Secretion. *Plant Cell* **6**, 215-225.
- 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.
- Costa, J.L., Paulsrud, P., and Lindblad, P.** (1999). Cyanobiont diversity within coralloid roots of selected cycad species. *Fems Microbiology Ecology* **28**, 85-91.
- Crespi, M., and Frugier, F.** (2008). De novo organ formation from differentiated cells: root nodule organogenesis. *Sci Signal* **1**, re11.
- Cronan, G.E., and Keating, D.H.** (2004). Sinorhizobium *meliloti* sulfotransferase that modifies lipopolysaccharide. *J Bacteriol* **186**, 4168-4176.
- Cuéllar Pérez, A., Nagels Durand, A., Vanden Bossche, R., De Clercq, R., Persiau, G., Van Wees, S.C., Pieterse, C.M., Gevaert, K., De Jaeger, G., Goossens, A., and**

- Pauwels, L.** (2014). The non-JAZ TIFY protein TIFY8 from *Arabidopsis thaliana* is a transcriptional repressor. *PLoS One* **9**,
- Delaux, P.M., Bécard, G., and Combier, J.P.** (2013a). NSP1 is a component of the Myc signaling pathway. *New Phytol* **199**, 59-65.
- Delaux, P.M., Séjalon-Delmas, N., Bécard, G., and Ané, J.M.** (2013b). Evolution of the plant-microbe symbiotic 'toolkit'. *Trends Plant Sci* **18**, 298-304.
- Demchenko, K., Winzer, T., Stougaard, J., Parniske, M., and Pawlowski, K.** (2004). Distinct roles of *Lotus japonicus* SYMRK and SYM15 in root colonization and arbuscule formation. *New Phytologist* **163**, 381-392.
- Den Herder, G., and Parniske, M.** (2009). The unbearable naivety of legumes in symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* **12**, 491-499.
- Didier, D.K., Schiffenbauer, J., Woulfe, S.L., Zacheis, M., and Schwartz, B.D.** (1988). Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 7322-7326.
- Dietz, K.J., Vogel, M.O., and Viehhauser, A.** (2010). AP2/EREBP transcription factors are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signalling. *Protoplasma* **245**, 3-14.
- Ding, Y., and Oldroyd, G.E.** (2009). Positioning the nodule, the hormone dictum. *Plant Signal Behav* **4**, 89-93.
- Dolfini, D., and Mantovani, R.** (2013). Targeting the Y/CCAAT box in cancer: YB-1 (YBX1) or NF-Y? *Cell Death and Differentiation* **20**, 676-685.
- 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.
- Downie, J.A.** (2005). Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Curr Biol* **15**, R196-198.
- Dénarié, J., Debelle, F., and Promé, J.C.** (1996). Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem* **65**, 503-535.
- 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. *Plant Physiology* **136**, 3159-3176.
- Eliseeva, I.A., Kim, E.R., Guryanov, S.G., Ovchinnikov, L.P., and Lyabin, D.N.** (2011). Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions. *Biochemistry (Mosc)* **76**, 1402-1433.
- Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kaló, P., and Kiss, G.B.** (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **417**, 962-966.
- 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.
- Fields, S., and Song, O.** (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Filtz, T.M., Vogel, W.K., and Leid, M.** (2014). Regulation of transcription factor activity by interconnected post-translational modifications. *Trends Pharmacol Sci* **35**, 76-85.
- Fliegmann, J., Canova, S., Lachaud, C., Uhlenbroich, S., Gascioli, V., Pichereaux, C., Rossignol, M., Rosenberg, C., Cumener, M., Pitorre, D., Lefebvre, B., Gough, C.,**

- Samain, E., Fort, S., Driguez, H., Vauzeilles, B., Beau, J.M., Nurisso, A., Imberty, A., Cullimore, J., and Bono, J.J.** (2013). Lipo-chitooligosaccharidic symbiotic signals are recognized by LysM receptor-like kinase LYR3 in the legume *Medicago truncatula*. *ACS Chem Biol* **8**, 1900-1906.
- 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.
- Franche, C., Lindstrom, K., and Elmerich, C.** (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil* **321**, 35-59.
- Frontini, M., Imbriano, C., Manni, I., and Mantovani, R.** (2004). Cell cycle regulation of NF-YC nuclear localization. *Cell Cycle* **3**, 217-222.
- Gao, X., and Guo, Y.** (2012). CLE peptides in plants: proteolytic processing, structure-activity relationship, and ligand-receptor interaction. *J Integr Plant Biol* **54**, 738-745.
- Gaston, K., and Jayaraman, P.S.** (2003). Transcriptional repression in eukaryotes: repressors and repression mechanisms. *Cell Mol Life Sci* **60**, 721-741.
- Geiman, Q.M.** (1964). Comparative physiology: mutualism, symbiosis, and parasitism. *Annu Rev Physiol* **26**, 75-108.
- Genre, A., Chabaud, M., Balzergue, C., Puech-Pagès, V., Novero, M., Rey, T., Fournier, J., Rochange, S., Bécard, G., Bonfante, P., and Barker, D.G.** (2013). Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytol* **198**, 190-202.
- Gholami, A., De Geyter, N., Pollier, J., Goormachtig, S., and Goossens, A.** (2014). Natural product biosynthesis in *Medicago* species. *Nat Prod Rep* **31**, 356-380.
- Gibson, K.E., Kobayashi, H., and Walker, G.C.** (2008). Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu Rev Genet* **42**, 413-441.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A., and Schiestl, R.H.** (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**, 1425.
- Glazebrook, J., Ichige, A., and Walker, G.C.** (1993). A *Rhizobium meliloti* homolog of the *Escherichia coli* peptide-antibiotic transport protein SbmA is essential for bacteroid development. *Genes Dev* **7**, 1485-1497.
- 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.
- Gobbato, E., Marsh, J.F., Vernié, T., Wang, E., Maillet, F., Kim, J., Miller, J.B., Sun, J., Bano, S.A., Ratet, P., Mysore, K.S., Dénarié, J., Schultze, M., and Oldroyd, G.E.** (2012). A GRAS-type transcription factor with a specific function in mycorrhizal signaling. *Curr Biol* **22**, 2236-2241.
- 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.
- Gough, C.** (2009). *Medicago truncatula*, un modèle pour l'étude des endosymbioses racinaires. *Clare Cough. Biofutur* **294**, 30-33.
- Gough, C., and Cullimore, J.** (2011). Lipo-chitooligosaccharide signaling in endosymbiotic plant-microbe interactions. *Molecular plant-microbe interactions*. **24**, 867-878.
- Graham, P.H., and Vance, C.P.** (2003). Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* **131**, 872-877.

- Green, M.R.** (2005). Eukaryotic transcription activation: right on target. *Mol Cell* **18**, 399-402.
- 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.
- Grunewald, W., Vanholme, B., Pauwels, L., Plovie, E., Inzé, D., Gheysen, G., and Goossens, A.** (2009). Expression of the Arabidopsis jasmonate signalling repressor JAZ1/TIFY10A is stimulated by auxin. *EMBO Rep* **10**, 923-928.
- Gutjahr, C., and Paszkowski, U.** (2009). Weights in the balance: jasmonic acid and salicylic acid signaling in root-biotroph interactions. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 763-772.
- Gutjahr, C., and Parniske, M.** (2013). Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **29**, 593-617.
- Gyaneshwar, P., Hirsch, A.M., Moulin, L., Chen, W.M., Elliott, G.N., Bontemps, C., Estrada-de Los Santos, P., Gross, E., Dos Reis, F.B., Sprent, J.I., Young, J.P., and James, E.K.** (2011). Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Mol Plant Microbe Interact* **24**, 1276-1288.
- Haag, A.F., Balaban, M., Sani, M., Kerscher, B., Pierre, O., Farkas, A., Longhi, R., Boncompagni, E., Hérouart, D., Dall'angelo, S., Kondorosi, E., Zanda, M., Mergaert, P., and Ferguson, G.P.** (2011). Protection of Sinorhizobium against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis. *PLoS Biol* **9**.
- Hackenberg, D., Wu, Y.F., 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**, 876-888.
- 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.
- 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. *Mol Plant Microbe Interact* **24**, 1385-1395.
- Herbig, E., Warfield, L., Fish, L., Fishburn, J., Knutson, B.A., Moorefield, B., Pacheco, D., and Hahn, S.** (2010). Mechanism of Mediator recruitment by tandem Gcn4 activation domains and three Gal11 activator-binding domains. *Mol Cell Biol* **30**, 2376-2390.
- Hirsch, S., and Oldroyd, G.E.** (2009). GRAS-domain transcription factors that regulate plant development. *Plant Signal Behav* **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**.
- 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**.

- Ichige, A., and Walker, G.C.** (1997). Genetic analysis of the *Rhizobium meliloti* *bacA* gene: functional interchangeability with the *Escherichia coli* *sbmA* gene and phenotypes of mutants. *J Bacteriol* **179**, 209-216.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A.** (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**, 163-168.
- Ivanov, S., Fedorova, E.E., Limpens, E., De Mita, S., Genre, A., Bonfante, P., and Bisseling, T.** (2012). Rhizobium-legume symbiosis shares an exocytotic pathway required for arbuscule formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 8316-8321.
- Jeudy, C., Ruffel, S., Freixes, S., Tillard, P., Santoni, A.L., Morel, S., Journet, E.P., Duc, G., Gojon, A., Lepetit, M., and Salon, C.** (2010). Adaptation of *Medicago truncatula* to nitrogen limitation is modulated via local and systemic nodule developmental responses. *New Phytol* **185**, 817-828.
- 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**, 737-748.
- Kahle, J., Baake, M., Doenecke, D., and Albig, W.** (2005). Subunits of the heterotrimeric transcription factor NF-Y are imported into the nucleus by distinct pathways involving importin beta and importin 13. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 5339-5354.
- 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**, 359-364.
- Kereszt, A., Mergaert, P., and Kondorosi, E.** (2011). Bacteroid development in legume nodules: evolution of mutual benefit or of sacrificial victims? *Mol Plant Microbe Interact* **24**, 1300-1309.
- 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**, 3974-3989.
- 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.
- Kim, J.W., Jang, S.M., Kim, C.H., An, J.H., and Choi, K.H.** (2012a). Transcriptional activity of neural retina leucine zipper (Nrl) is regulated by c-Jun N-terminal kinase and Tip60 during retina development. *Mol Cell Biol* **32**, 1720-1732.
- Kim, J.W., Jang, S.M., Kim, C.H., An, J.H., Kang, E.J., and Choi, K.H.** (2012b). New molecular bridge between RelA/p65 and NF- κ B target genes via histone acetyltransferase TIP60 cofactor. *J Biol Chem* **287**, 7780-7791.

- Kinkema, M., and Gresshoff, P.M.** (2008). Investigation of downstream signals of the soybean autoregulation of nodulation receptor kinase GmNARK. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 1337-1348.
- Klopotowski, T., and Hulanicka, D.** (1963). Imidazoleglycerol accumulation by yeast resulting from the inhibition of histidine biosynthesis by 3-amino-1,2,4-triazole. *Acta Biochim Pol* **10**, 209-218.
- 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 Physiol* **137**, 1197-1204.
- Kondorosi, E., Mergaert, P., and Kereszt, A.** (2013). A paradigm for endosymbiotic life: cell differentiation of Rhizobium bacteria provoked by host plant factors. *Annu Rev Microbiol* **67**, 611-628.
- 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.
- Kucho, K., Hay, A.E., and Normand, P.** (2010). The Determinants of the Actinorhizal Symbiosis. *Microbes and Environments* **25**, 241-252.
- Kulaeva, O.I., Nizovtseva, E.V., Polikanov, Y.S., Ulianov, S.V., and Studitsky, V.M.** (2012). Distant activation of transcription: mechanisms of enhancer action. *Mol Cell Biol* **32**, 4892-4897.
- Kumimoto, R., Zhang, Y., Siefers, N., and Holt, B.** (2010). NF-YC3, NF-YC4 and NF-YC9 are required for CONSTANS-mediated, photoperiod-dependent flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **63**, 379-391.
- Laloum, T.** (2013). Etude du rôle des facteurs de transcription MtNF-YA1 et MtNF-YA2 dans les étapes précoces de la symbiose rhizobienne chez *Medicago truncatula* In *Biosciences Végétales* (Toulouse: Université Paul Sabatier), pp. 264.
- Laloum, T., De Mita, S., Gamas, P., Baudin, M., and Niebel, A.** (2013). CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many? *Trends in Plant Science* **18**, 157-166.
- Laloum, T., Baudin, M., Frances, L., Lepage, A., Billault-Penneteau, B., Cerri, M.R., Ariel, F., Jardinaud, M.F., Gamas, P., de Carvalho-Niebel, F., and Niebel, A.** (2014). Two CCAAT box-binding transcription factors redundantly regulate early steps of the legume-rhizobia endosymbiosis. *Plant J*, in press.
- Laporte, P., Lepage, A., Fournier, J., Catrice, O., Moreau, S., Jardinaud, M.F., Mun, J.H., Larrainzar, E., Cook, D.R., Gamas, P., and Niebel, A.** (2014). The CCAAT box-binding transcription factor NF-YA1 controls rhizobial infection. *J Exp Bot* **65**, 481-494.
- Lauressergues, D., Delaux, P.M., Formey, D., Lelandais-Brière, C., Fort, S., Cottaz, S., Bécard, G., Niebel, A., Roux, C., and Combiér, J.P.** (2012). The microRNA miR171h modulates arbuscular mycorrhizal colonization of *Medicago truncatula* by targeting NSP2. *Plant J* **72**, 512-522.
- Lee, K.H., and Larue, T.A.** (1992). Exogenous Ethylene Inhibits Nodulation of *Pisum sativum* L. cv Sparkle. *Plant Physiol* **100**, 1759-1763.
- Lefebvre, B., Timmers, T., Mbengue, M., Moreau, S., Hervé, C., Tóth, K., Bittencourt-Silvestre, J., Klaus, D., Deslandes, L., Godiard, L., Murray, J.D., Udvardi, M.K., Raffaele, S., Mongrand, S., Cullimore, J., Gamas, P., Niebel, A., and Ott, T.** (2010). A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 2343-2348.

- 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., Distelfeld, A., Comis, A., and Dubcovsky, J.** (2011). Wheat flowering repressor VRN2 and promoter CO2 compete for interactions with NUCLEAR FACTOR-Y complexes. *Plant J* **67**, 763-773.
- Li, F.Q., Hou, B.H., Chen, L., Yao, Z.J., and Hong, G.F.** (2008a). 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.
- Li, W.X., Oono, Y., Zhu, J., He, X.J., Wu, J.M., Iida, K., Lu, X.Y., Cui, X., Jin, H., and Zhu, J.K.** (2008b). The Arabidopsis NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell* **20**, 2238-2251.
- 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.
- 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.
- Liu, W., Kohlen, W., Lillo, A., Op den Camp, R., Ivanov, S., Hartog, M., Limpens, E., Jamil, M., Smaczniak, C., Kaufmann, K., Yang, W.C., Hooiveld, G.J., Charnikhova, T., Bouwmeester, H.J., Bisseling, T., and Geurts, R.** (2011). Strigolactone biosynthesis in *Medicago truncatula* and rice requires the symbiotic GRAS-type transcription factors NSP1 and NSP2. *Plant Cell* **23**, 3853-3865.
- Mabood, F., Souleimanov, A., Khan, W., and Smith, D.L.** (2006). Jasmonates induce Nod factor production by *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiol Biochem* **44**, 759-765.
- Madsen, E.B., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., and Stougaard, J.** (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* **425**, 637-640.
- Madsen, L.H., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J.T., Heckmann, A.B., Bek, A.S., Ronson, C.W., James, E.K., and Stougaard, J.** (2010). The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat Commun* **1**, 10.
- Maillet, F., Poinot, V., André, O., Puech-Pagès, V., Haouy, A., Gueunier, M., Cromer, L., Giraudet, D., Formey, D., Niebel, A., Martinez, E.A., Driguez, H., Bécard, G., and Dénarié, J.** (2011). Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* **469**, 58-63.

- Manni, I., Caretti, G., Artuso, S., Gurtner, A., Emiliozzi, V., Sacchi, A., Mantovani, R., and Piaggio, G.** (2008). Posttranslational Regulation of NF-YA Modulates NF-Y Transcriptional Activity. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 5203-5213.
- Mantovani, R.** (1999). The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* **239**, 15-27.
- Mantovani, R., Lio, X., Pessara, U., Vanhuisjduijnen, R., Benoist, C., and Mathis, D.** (1994). Dominant-negative analogs of NF-YA. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 20340-20346.
- 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.
- 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.
- Mathesius, U.** (2001). Flavonoids induced in cells undergoing nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidase. *J Exp Bot* **52**, 419-426.
- 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**, 3474-3488.
- McNabb, D.S., and Pinto, I.** (2005). Assembly of the Hap2p/Hap3p/Hap4p/Hap5p-DNA complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **4**, 1829-1839.
- Mergaert, P., Nikovics, K., Kelemen, Z., Maunoury, N., Vaubert, D., Kondorosi, A., and Kondorosi, E.** (2003). A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiology* **132**, 161-173.
- 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**, 912-921.
- 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, J.B., Pratap, A., Miyahara, A., Zhou, L., Bornemann, S., Morris, R.J., and Oldroyd, G.E.** (2013). Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase is negatively and positively regulated by calcium, providing a mechanism for decoding calcium responses during symbiosis signaling. *Plant Cell* **25**, 5053-5066.
- Miwa, H., Sun, J., Oldroyd, G., and Downie, J.** (2006). 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.
- 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**, 222-237.
- Mortier, V., Wasson, A., Jaworek, P., De Keyser, A., Decroos, M., Holsters, M., Tarkowski, P., Mathesius, U., and Goormachtig, S.** (2014). Role of LONELY GUY genes in indeterminate nodulation on *Medicago truncatula*. *New Phytol* **202**, 582-593.
- 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. *Mol Plant Microbe Interact* **24**, 631-639.
- Murray, J.D., Karas, B.J., Sato, S., Tabata, S., Amyot, L., and Szczyglowski, K.** (2007). A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science* **315**, 101-104.
- Nardini, M., Gnesutta, N., Donati, G., Gatta, R., Forni, C., Fossati, A., Vonrhein, C., Moras, D., Romier, C., Bolognesi, M., and Mantovani, R.** (2013). Sequence-Specific Transcription Factor NF-Y Displays Histone-like DNA Binding and H2B-like Ubiquitination. *Cell* **152**, 132-143.
- Ni, Z., Hu, Z., Jiang, Q., and Zhang, H.** (2013). GmNFYA3, a target gene of miR169, is a positive regulator of plant tolerance to drought stress. *Plant Mol Biol* **82**, 113-129.
- Oka-Kira, E., and Kawaguchi, M.** (2006). Long-distance signaling to control root nodule number. *Curr Opin Plant Biol* **9**, 496-502.
- Okamoto, S., Shinohara, H., Mori, T., Matsubayashi, Y., and Kawaguchi, M.** (2013). Root-derived CLE glycopeptides control nodulation by direct binding to HAR1 receptor kinase. *Nat Commun* **4**, 2191.
- Oldroyd, G.E.D., Engstrom, E., and Long, S.** (2001). Ethylene inhibits the nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **13**, 1835-1849.
- Oldroyd, G.E.D., Murray, J., Poole, P., and Downie, J.** (2011). The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *Annual Review Genetics*, Vol 45 **45**, 119-144.
- Oldroyd, G.E.D.** (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology* **11**, 252-263.
- Oldroyd, G.E.D., and Downie, J.A.** (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 519-546.
- Osada, S., Yamamoto, H., Nishihara, T., and Imagawa, M.** (1996). DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. *J Biol Chem* **271**, 3891-3896.
- Patikoglou, G., and Burley, S.K.** (1997). Eukaryotic transcription factor-DNA complexes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **26**, 289-325.
- Pauwels, L., and Goossens, A.** (2011). The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *Plant Cell* **23**, 3089-3100.
- Pauwels, L., Barbero, G.F., Geerinck, J., Tilleman, S., Grunewald, W., Perez, A.C., Chico, J.M., Vanden Bossche, R., Sewell, J., Gil, E., Garcia-Casado, G., Witters, E., Inze, D., Long, J.A., De Jaeger, G., Solano, R., and Goossens, A.** (2010). NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* **464**, 788-U169.
- Pawlowski, K., and Demchenko, K.N.** (2012). The diversity of actinorhizal symbiosis. *Protoplasma* **249**, 967-979.

- 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 DMI1 protein modulates cytosolic calcium signaling. *Plant Physiology* **145**, 192-203.
- Penmetsa, R.V., and Cook, D.R.** (1997). A Legume Ethylene-Insensitive Mutant Hyperinfected by Its Rhizobial Symbiont. *Science* **275**, 527-530.
- Penmetsa, R.V., Frugoli, J.A., Smith, L.S., Long, S.R., and Cook, D.R.** (2003). Dual genetic pathways controlling nodule number in Medicago truncatula. *Plant Physiol* **131**, 998-1008.
- Perret, X., Staehelin, C., and Broughton, W.J.** (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 180-201.
- Perrine-Walker, F.M., Lartaud, M., Kouchi, H., and Ridge, R.W.** (2014). Microtubule array formation during root hair infection thread initiation and elongation in the Mesorhizobium-Lotus symbiosis. *Protoplasma*.
- Petroni, K., Kumimoto, R.W., Gnesutta, N., Calvenzani, V., Fornari, M., Tonelli, C., Holt, B.F., and Mantovani, R.** (2012). The Promiscuous Life of Plant NUCLEAR FACTOR Y Transcription Factors. *Plant Cell* **24**, 4777-4792.
- Pfeifer, K., Arcangioli, B., and Guarente, L.** (1987). Yeast HAP1 activator competes with the factor RC2 for binding to the upstream activation site UAS1 of the CYC1 gene. *Cell* **49**, 9-18.
- Pinkham, J.L., Olesen, J.T., and Guarente, L.P.** (1987). Sequence and nuclear localization of the Saccharomyces cerevisiae HAP2 protein, a transcriptional activator. *Mol Cell Biol* **7**, 578-585.
- 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.
- Prasanna, R., Joshi, M., Rana, A., Shivay, Y.S., and Nain, L.** (2012). Influence of co-inoculation of bacteria-cyanobacteria on crop yield and C-N sequestration in soil under rice crop. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **28**, 1223-1235.
- Ptashne, M.** (1988). How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* **335**, 683-689.
- 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.
- Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H., and Kerp, H.** (1994). Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11841-11843.
- Reynoso, M.A., Blanco, F.A., Bailey-Serres, J., Crespi, M., and Zanetti, M.E.** (2012). Selective recruitment of mRNAs and miRNAs to polyribosomes in response to rhizobia infection in Medicago truncatula. *Plant J* **73**, 289-301.
- 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**, 208-216.
- Rival, P., de Billy, F., Bono, J.J., Gough, C., Rosenberg, C., and Bensmihen, S.** (2012). Epidermal and cortical roles of NFP and DMI3 in coordinating early steps of nodulation in Medicago truncatula. *Development* **139**, 3383-3391.
- Robledo, M., Jiménez-Zurdo, J.I., Velázquez, E., Trujillo, M.E., Zurdo-Piñeiro, J.L., Ramírez-Bahena, M.H., Ramos, B., Díaz-Mínguez, J.M., Dazzo, F., Martínez-**

- Molina, E., and Mateos, P.F.** (2008). Rhizobium cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7064-7069.
- Roeder, R.G.** (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* **21**, 327-335.
- 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.
- Rosas, S., Soria, R., Correa, N., and Abdala, G.** (1998). Jasmonic acid stimulates the expression of nod genes in Rhizobium. *Plant Mol Biol* **38**, 1161-1168.
- Roux, B., Rodde, N., Jardinaud, M.F., Timmers, T., Sauviac, L., Cottret, L., Carrère, S., Sallet, E., Courcelle, E., Moreau, S., Debelle, F., Capela, D., de Carvalho-Niebel, F., Gouzy, J., Bruand, C., and Gamas, P.** (2014). An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *Plant J* **77**, 817-837.
- Rípodas, C., Clua, J., Battaglia, M., Baudin, M., Niebel, A., Zanetti, M.E., and Blanco, F.** (2014). Transcriptional regulators of legume-rhizobia symbiosis: Nuclear Factors Ys and GRAS are two for tango. *Plant Signal Behav* **9**.
- 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**, 610-624.
- Schaarschmidt, S., Gresshoff, P.M., and Hause, B.** (2013). Analyzing the soybean transcriptome during autoregulation of mycorrhization identifies the transcription factors GmNF-YA1a/b as positive regulators of arbuscular mycorrhization. *Genome Biol* **14**, R62.
- Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J., and Stougaard, J.** (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* **402**, 191-195.
- Schnabel, E., Journet, E.P., de Carvalho-Niebel, F., Duc, G., and Frugoli, J.** (2005). The *Medicago truncatula* SUNN gene encodes a CLV1-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length. *Plant Mol Biol* **58**, 809-822.
- Schornack, S., Moscou, M.J., Ward, E.R., and Horvath, D.M.** (2013). Engineering plant disease resistance based on TAL effectors. *Annu Rev Phytopathol* **51**, 383-406.
- Schultze, M., Staehelin, C., Röhrig, H., John, M., Schmidt, J., Kondorosi, E., Schell, J., and Kondorosi, A.** (1995). In vitro sulfotransferase activity of Rhizobium meliloti NodH protein: lipochitoooligosaccharide nodulation signals are sulfated after synthesis of the core structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2706-2709.
- Shigeyama, T., Tominaga, A., Arima, S., Sakai, T., Inada, S., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Uchiumi, T., Abe, M., Hashiguchi, M., Akashi, R., Hirsch, A.M., and Suzuki, A.** (2012). Additional cause for reduced JA-Ile in the root of a *Lotus japonicus* phyB mutant. *Plant Signal Behav* **7**, 746-748.
- 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* **18**, 1195-1204.

- Sieberer, B.J., Chabaud, M., Fournier, J., Timmers, A.C., 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 J* **69**, 822-830.
- 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**, 1197-1206.
- Simon, J.A., and Kingston, R.E.** (2009). Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 697-708.
- Singh, S., and Parniske, M.** (2012). Activation of calcium- and calmodulin-dependent protein kinase (CCaMK), the central regulator of plant root endosymbiosis. *Curr Opin Plant Biol* **15**, 444-453.
- Singh, S., Katzer, K., Lambert, J., Cerri, M., and Parniske, M.** (2014). CYCLOPS, a DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development. *Cell Host Microbe* **15**, 139-152.
- Singleton, P.W., and van Kessel, C.** (1987). Effect of localized nitrogen availability to soybean half-root systems on photosynthate partitioning to roots and nodules. *Plant Physiol* **83**, 552-556.
- Sinha, S., Maity, S.N., Lu, J., and de Crombrughe, B.** (1995). Recombinant rat CBF-C, the third subunit of CBF/NFY, allows formation of a protein-DNA complex with CBF-A and CBF-B and with yeast HAP2 and HAP3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1624-1628.
- Sinha, S., Kim, I., Sohn, K., DeCrombrughe, 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.
- Sinharoy, S., Torres-Jerez, I., Bandyopadhyay, K., Kereszt, A., Pislariu, C.I., Nakashima, J., Benedito, V.A., Kondorosi, E., and Udvardi, M.K.** (2013). The C₂H₂ transcription factor regulator of symbiosome differentiation represses transcription of the secretory pathway gene VAMP721a and promotes symbiosome development in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **25**, 3584-3601.
- 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.
- Smith, S.E., and Smith, F.A.** (2012). Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. *Mycologia* **104**, 1-13.
- 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.
- Sorin, C., Declerck, M., Christ, A., Blein, T., Ma, L., Lelandais-Brière, C., Njo, M.F., Beeckman, T., Crespi, M., and Hartmann, C.** (2014). A miR169 isoform regulates specific NF-YA targets and root architecture in *Arabidopsis*. *New Phytol* **202**, 1197-1211.
- Soupène, E., Foussard, M., Boistard, P., Truchet, G., and Batut, J.** (1995). Oxygen as a key developmental regulator of *Rhizobium meliloti* N₂-fixation gene expression within the alfalfa root nodule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3759-3763.

- Soyano, T., Kouchi, H., Hirota, A., and Hayashi, M.** (2013). NODULE INCEPTION Directly Targets NF-Y Subunit Genes to Regulate Essential Processes of Root Nodule Development in *Lotus japonicus*. *Plos Genetics* **9**.
- Staswick, P.E.** (2008). JAZing up jasmonate signaling. *Trends in Plant Science* **13**, 66-71.
- 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., Cardoza, V., Mitchell, D., Bright, L., Oldroyd, G., and Harris, J.** (2006). Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *Plant Journal* **46**, 961-970.
- Svistoonoff, S., Hocher, V., and Gherbi, H.** (2014). Actinorhizal root nodule symbioses: what is signalling telling on the origins of nodulation? *Curr Opin Plant Biol* **20C**, 11-18.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A., and Browse, J.** (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**, 661-665.
- Thirumurugan, T., Ito, Y., Kubo, T., Serizawa, A., and Kurata, N.** (2008). Identification, characterization and interaction of HAP family genes in rice. *Molecular Genetics and Genomics* **279**, 279-289.
- Timmers, A.C., 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.
- Timmers, A.C., Soupène, E., Auriac, M.C., de Billy, F., Vasse, J., Boistard, P., and Truchet, G.** (2000). Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 1204-1213.
- 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.
- Tirichine, L., Sandal, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Albrektsen, A.S., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., and Stougaard, J.** (2007). A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science* **315**, 104-107.
- Tirichine, L., Imaizumi-Anraku, H., Yoshida, S., Murakami, Y., Madsen, L.H., Miwa, H., Nakagawa, T., Sandal, N., Albrektsen, A.S., Kawaguchi, M., Downie, A., Sato, S., Tabata, S., Kouchi, H., Parniske, M., Kawasaki, S., and Stougaard, J.** (2006). Dereglulation 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**, 670-673.
- Tsukada, J., Yoshida, Y., Kominato, Y., and Auron, P.E.** (2011). The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation. *Cytokine* **54**, 6-19.
- 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.
- van Rhijn, P., and Vanderleyden, J.** (1995). The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiological reviews* **59**, 124-142.

- Van Spronsen, P.C., Bakhuizen, R., van Brussel, A.A., and Kijne, J.W.** (1994). Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two-step process. *Eur J Cell Biol* **64**, 88-94.
- Vanholme, B., Grunewald, W., Bateman, A., Kohchi, T., and Gheysen, G.** (2007). The tify family previously known as ZIM. *Trends in Plant Science* **12**, 239-244.
- Vasse, J., de Billy, F., Camut, S., and Truchet, G.** (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J Bacteriol* **172**, 4295-4306.
- Venkateshwaran, M., Cosme, A., Han, L., Banba, M., Satyshur, K.A., Schleiff, E., Parniske, M., Imaizumi-Anraku, H., and Ané, 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**, 2528-2545.
- Vernié, T., Moreau, S., de Billy, F., Plet, J., Combier, J.P., Rogers, C., Oldroyd, G., Frugier, F., Niebel, A., and Gamas, P.** (2008). EFD Is an ERF transcription factor involved in the control of nodule number and differentiation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **20**, 2696-2713.
- Vinardell, J.M., Fedorova, E., Cebolla, A., Kevei, Z., Horvath, G., Kelemen, Z., Tarayre, S., Roudier, F., Mergaert, P., Kondorosi, A., and Kondorosi, E.** (2003). Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell* **15**, 2093-2105.
- Wager, A., and Browse, J.** (2012). Social Network: JAZ Protein Interactions Expand Our Knowledge of Jasmonate Signaling. *Front Plant Sci* **3**, 41.
- Wais, R., Galera, C., Oldroyd, G., Catoira, R., Penmetsa, 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.
- Wang, D., Griffiths, J., Starker, C., Fedorova, E., Limpens, E., Ivanov, S., Bisseling, T., and Long, S.** (2010). A nodule-specific protein secretory pathway required for nitrogen-fixing symbiosis. *Science* **327**, 1126-1129.
- Wang, Y.Y., Hsu, P.K., and Tsay, Y.F.** (2012). Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends in Plant Science* **17**, 458-467.
- Wasson, A.P., Pellerone, F.I., and Mathesius, U.** (2006). Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. *Plant Cell* **18**, 1617-1629.
- Wasternack, C., and Hause, B.** (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann Bot* **111**, 1021-1058.
- Wenkel, S., Turck, F., Singer, K., Gissot, L., Le Gourrierec, 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.
- Weston, L.A., and Mathesius, U.** (2013). Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy. *Journal of Chemical Ecology* **39**, 283-297.
- Wong, K.H., and Struhl, K.** (2011). The Cyc8-Tup1 complex inhibits transcription primarily by masking the activation domain of the recruiting protein. *Genes Dev* **25**, 2525-2539.
- Xiao, T.T., Schilderink, S., Moling, S., Deinum, E.E., Kondorosi, E., Franssen, H., Kulikova, O., Niebel, A., and Bisseling, T.** (2014). Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. *Development* **accepted**.

- Xie, F., Murray, J.D., Kim, J., Heckmann, A.B., Edwards, A., Oldroyd, G.E., and Downie, J.A.** (2012). Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 633-638.
- 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.
- Yan, Y., Stolz, S., Chételat, A., Reymond, P., Pagni, M., Dubugnon, L., and Farmer, E.E.** (2007). A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell* **19**, 2470-2483.
- Yano, K., Yoshida, S., Müller, J., Singh, S., Banba, M., Vickers, K., Markmann, K., White, C., Schuller, B., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Murooka, Y., Perry, J., Wang, T.L., Kawaguchi, M., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M., and Parniske, M.** (2008). CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20540-20545.
- Yoro, E., Suzaki, T., Toyokura, K., Miyazawa, H., Fukaki, H., and Kawaguchi, M.** (2014). A positive regulator of nodule organogenesis, NODULE INCEPTION, acts as a negative regulator of rhizobial infection in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.*
- Young, N.D., Debelle, F., Oldroyd, G.E.D., Geurts, R., Cannon, S.B., Udvardi, M.K., Benedito, 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.
- Yun, J., Chae, H., Choi, T., Kim, E., Bang, Y., Chung, J., Choi, K., Mantovani, R., and Shin, D.** (2003). Cdk2-dependent phosphorylation of the NF-Y transcription factor and its involvement in the p53-p21 signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 36966-36972.
- 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.
- Zdyb, A., Demchenko, K., Heumann, J., Mrosk, C., Grzeganeck, P., Göbel, C., Feussner, I., Pawlowski, K., and Hause, B.** (2011). Jasmonate biosynthesis in legume and actinorhizal nodules. *New Phytol* **189**, 568-579.

- Zhang, J., Subramanian, S., Stacey, G., and Yu, O.** (2009). Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti*. *Plant J* **57**, 171-183.
- Zielke, N., Edgar, B.A., and DePamphilis, M.L.** (2013). Endoreplication. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**.
- Zorbas, H., Rein, T., Krause, A., Hoffmann, K., and Winnacker, E.L.** (1992). Nuclear factor I (NF I) binds to an NF I-type site but not to the CCAAT site in the human alpha-globin gene promoter. *J Biol Chem* **267**, 8478-8484.

ANNEXES

Annexe 1: Article scientifique

- Auteurs: Battaglia, M. Rípodas, C., Clúa, J., **Baudin, M.**, Aguilar, O.M., Niebel, A., Zanetti, M.E., and Blanco, F.A.
- Date de publication: Mars 2014
- Titre: A nuclear factor Y interacting protein of the GRAS family is required for nodule organogenesis, infection thread progression, and lateral root growth.
- Journal: Plant Physiology

A Nuclear Factor Y Interacting Protein of the GRAS Family Is Required for Nodule Organogenesis, Infection Thread Progression, and Lateral Root Growth^{1[C][W][OPEN]}

Marina Battaglia^{2,3}, Carolina Rípodas², Joaquín Clúa, Maël Baudin, O. Mario Aguilar, Andreas Niebel, María Eugenia Zanetti, and Flavio Antonio Blanco*

Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Centro Científico y Tecnológico-La Plata, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, 1900 La Plata, Argentina (M.Bat., C.R., J.C, O.M.A., M.E.Z., F.A.B.); Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes, Unité Mixte de Recherche 441, F-31326 Castanet-Tolosan, France (M.Bau., A.N.); and Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes, Unité Mixte de Recherche 2594, F-31326 Castanet-Tolosan, France (M.Bau., A.N.)

A C subunit of the heterotrimeric nuclear factor Y (NF-YC1) was shown to play a key role in nodule organogenesis and bacterial infection during the nitrogen fixing symbiosis established between common bean (*Phaseolus vulgaris*) and *Rhizobium etli*. To identify other proteins involved in this process, we used the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) two-hybrid system to screen for NF-YC1-interacting proteins. One of the positive clones encodes a member of the Phytochrome A Signal Transduction1 subfamily of GRAS (for Gibberellic Acid-Insensitive (GAI), Repressor of GAI, and Scarecrow) transcription factors. The protein, named Scarecrow-like13 Involved in Nodulation (SIN1), localizes both to the nucleus and the cytoplasm, but in transgenic *Nicotiana benthamiana* cells, bimolecular fluorescence complementation suggested that the interaction with NF-YC1 takes place predominantly in the nucleus. SIN1 is expressed in aerial and root tissues, with higher levels in roots and nodules. Posttranscriptional gene silencing of *SIN1* using RNA interference (RNAi) showed that the product of this gene is involved in lateral root elongation. However, root cell organization, density of lateral roots, and the length of root hairs were not affected by *SIN1* RNAi. In addition, the expression of the RNAi of *SIN1* led to a marked reduction in the number and size of nodules formed upon inoculation with *R. etli* and affected the progression of infection threads toward the nodule primordia. Expression of *NF-YA1* and the G2/M transition cell cycle genes *CYCLIN B* and *Cell Division Cycle2* was reduced in *SIN1* RNAi roots. These data suggest that SIN1 plays a role in lateral root elongation and the establishment of root symbiosis in common bean.

One of the main entry points of molecular nitrogen into ecosystems is the mutualistic symbiosis between legume plants and rhizobia, which results in the

formation of a new root organ, the nodule. This interaction involves two separated but coordinated processes, the infection that leads bacteria to the interior of the root and the organogenesis of the nodule, where bacteria reduce atmospheric nitrogen to metabolic intermediates that the plant can incorporate (Oldroyd and Downie, 2008). Entry of rhizobia occurs mainly through an invagination of the root hair plasma membrane that expands toward the interior of the root, forming a cylindrical channel where bacteria allocate and proliferate. This penetration structure formed by the plant is called infection thread (IT). At the same time that infection begins, a yet unknown signal triggers the reactivation of cell divisions in the cortex, leading to the development of the nodule primordia. When the IT reaches the dividing cortex, bacteria are released into the cytoplasm in a process similar to endocytosis, producing a new organelle-like structure, the symbiosome, where the enzymatic nitrogen fixation takes place.

Establishment of symbiosis is highly specific, involving several recognition steps between both partners. In response to iso/flavonoids exuded by legume roots, rhizobia synthesize the Nod Factor, a lipochitoooligosaccharide molecule that acts as a signal in root cells. Perception of

¹ This work was supported by grants from Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Argentina (PICT 2008/0443 and 2010/2431), the ANR-09-BLAN-0033-01 HAPIHUB project, the "Laboratoire d'Excellence" entitled TULIP (ANR-10-LABX-41 to A.N. and M.Bau.), the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, and an Institut National de la Recherche Agronomique Contrat Jeune Scientifique contract (to M.Bau.).

² These authors contributed equally to the article.

³ Present address: Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 62250 Cuernavaca, Morelos, Mexico.

* Address correspondence to fablanco@biol.unlp.edu.ar.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: Flavio Antonio Blanco (fablanco@biol.unlp.edu.ar).

[C] Some figures in this article are displayed in color online but in black and white in the print edition.

[W] The online version of this article contains Web-only data.

[OPEN] Articles can be viewed online without a subscription.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.113.230896

Nod Factor requires two extracellular lysin motif receptor-like kinases and activates a signaling pathway that involves a series of downstream acting proteins, including a Leu-rich repeat receptor-like kinase, cation channels, a calcium/calmodulin dependent protein kinase (DMI3), nucleoporins, and Interacting Protein of DMI3, a protein of unknown function (Oldroyd et al., 2011).

In the past 10 years, a number of transcription factors that act downstream of this signaling pathway and are required for nodulation has been identified. Two of them, named Nodulation Signaling Pathway1 (NSP1) and NSP2, belong to the GRAS family, whose name derives from the three members initially identified: Gibberellic Acid-Insensitive (GAI), Repressor of GAI, and Scarecrow (SCR; Pysh et al., 1999). GRAS transcription factors are part of a large gene family of plant-specific proteins with at least 33 and 60 members in *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) and rice (*Oryza sativa*), respectively (Pysh et al., 1999; Tian et al., 2004; Lee et al., 2008). Members of this family play critical and diverse functions in signaling and transcription associated with plant developmental processes, such as root radial patterning and growth, development of adventitious roots, hypocotyl elongation, axillary shoot formation, and maintenance of shoot meristem. They also act as integrators of regulatory and environmental signals, such as abiotic and biotic stresses and the phytohormones gibberellic acid, brassinosteroids, jasmonic acid, and auxins (Bolle, 2004; Sun et al., 2012). In the legume symbiosis, NSP1 and NSP2 are essential for nodulation, mediating different nuclear factor-induced responses, such as root hair deformation, IT formation, cortical cell divisions, and expression of nodulin genes (Catoira et al., 2000; Oldroyd and Long, 2003; Kaló et al., 2005; Smit et al., 2005). Both proteins are also involved in mycorrhization (Liu et al., 2011), together with Required for Arbuscular Mycorrhization1 (RAM1), which plays a specific role in the formation of arbuscular mycorrhiza through its interaction with NSP2 but is dispensable for nodule formation (Gobbato et al., 2012).

Nuclear factors Y (NF-Ys) are heterotrimeric transcription factors composed by the NF-YA, NF-YB, and NF-YC subunits. This complex recognizes and binds with high affinity and sequence specificity to the CCAAT box, one of the most frequent eukaryotic promoter elements (Dolfini et al., 2012). Whereas each subunit of NF-Y is encoded by one or two members in yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) and mammals, these gene families have largely expanded in plants. Approximately 10 members were identified for each subunit in the genomes of both mono- and dicotyledonous plants (Petroni et al., 2012; Laloum et al., 2013). Individual NF-Y subunits have been implicated in a number of plant developmental processes, including embryogenesis, seed production, photoperiod-dependent flowering, pollen tube development, and root elongation, and in the transcriptional response to drought and endoplasmic reticulum stresses. NF-Y complexes or individual subunits have been shown to associate with other transcriptional regulators. For example,

the *Arabidopsis* NF-YA4/NF-YB3/NF-YC2 trimeric complex associates with the basic leucine zipper protein bZIP28 to promote transcriptional up-regulation of endoplasmic reticulum stress-responsive genes (Liu and Howell, 2010). Likewise, bZIP67 interacts with the NF-YC2/LEAFY COTYLEDON 1 (NF-YB9) heterodimer to activate abscisic acid-responsive elements of seed-specific genes (Yamamoto et al., 2009). In rice, NF-YB1 interacts with the MADS box protein MADS18 (Masiero et al., 2002). The heterotrimeric nature of NF-Y complexes, the association with other classes of transcription factors, and the expansion of the gene family of each subunit in plants result in a flexible combinatorial system that provides the versatility required to integrate endogenous and exogenous signals, allowing plants to grow and adapt to changing environmental conditions.

In legumes, members of the NF-YA and NF-YC gene families have been implicated in the development of indeterminate and determinate nodules, respectively. The A subunit of the NF-Y trimeric complex of *Medicago truncatula* (NF-YA1, formerly known as *Heme-Activated Protein2-1* [*MtHAP2-1*]) plays a central role during early symbiotic signaling and rhizobial infection, but it is also required for nodule meristem function and maintenance (Comber et al., 2006, 2008). In *Lotus japonicus*, knockdown of *LjNF-YA1* inhibited root nodule organogenesis but not the infection process (Soyano et al., 2013). Reverse genetic studies carried out in common bean (*Phaseolus vulgaris*) revealed that the NF-YC1 subunit is required for nodule organogenesis and rhizobial infection, as well as the activation of cell cycle genes at early stages of the symbiotic interaction. On the other hand, NF-YC1 plays a key role in the selection of rhizobial strains that are more efficient in the interaction between common bean and *Rhizobium etli* (Zanetti et al., 2010).

In this work, we aimed to identify new components of the signaling pathway in which NF-YC1 participates. We screened a yeast two-hybrid complementary DNA (cDNA) library, searching for interacting partners of NF-YC1. This study focuses on one of these partners, which encodes a transcription factor of the GRAS family that is required for nodule organogenesis, progression of ITs, and growth of lateral roots at postemergence stages.

RESULTS

Identification of a GRAS Transcription Factor from Common Bean

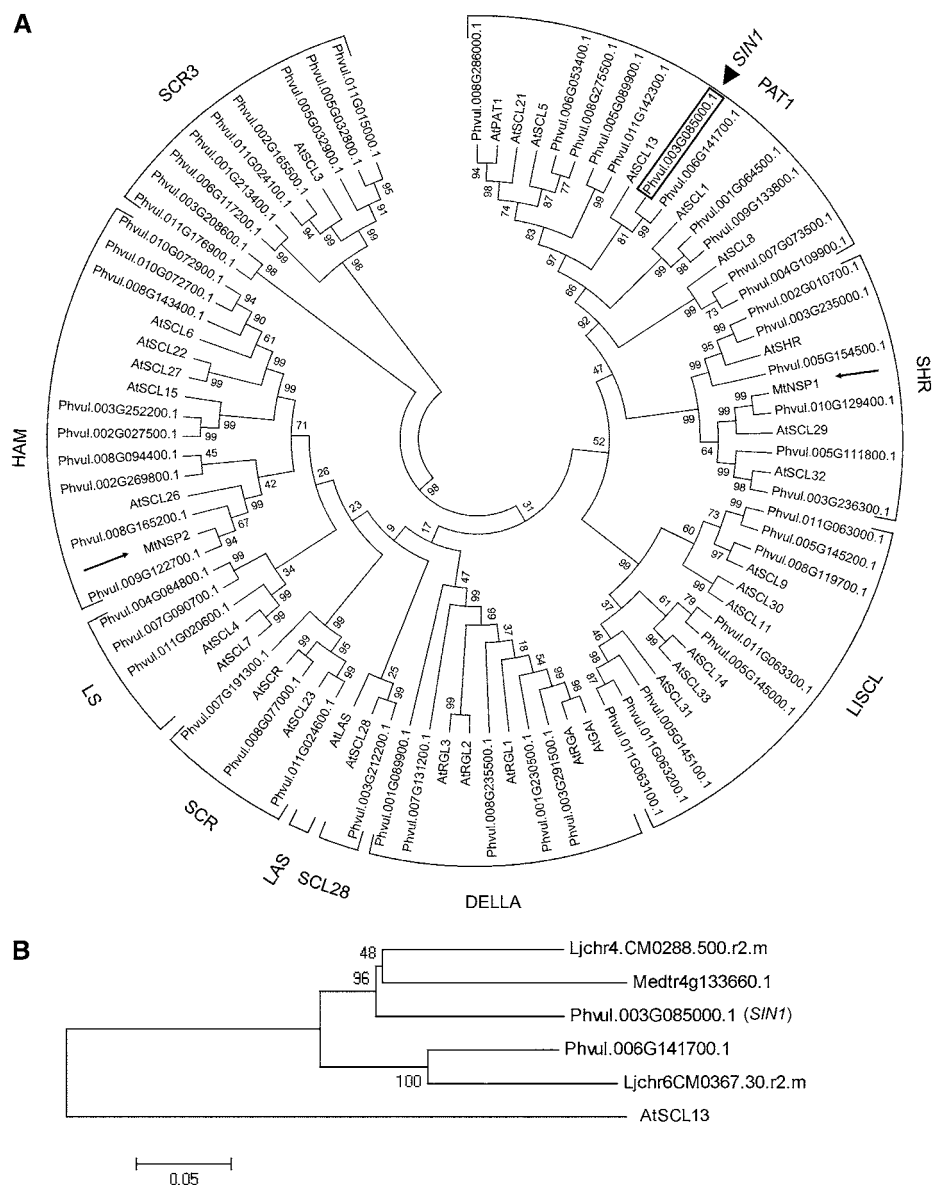
In a search for proteins that potentially interact with NF-YC1, we screened a common bean cDNA library using the yeast two-hybrid system. Forty-five positive clones corresponding to eight nonredundant cDNAs were obtained. Two of the cDNA clones showed high-sequence similarity to a GRAS protein according to a BLASTX search against the nonredundant GenBank database. A BLASTN search against the common bean genome v1.0 (<http://www.phytozome.org/commonbean.php>) showed that the gene with the highest sequence

identity was located on chromosome 3 (gene identification Phvul.003G085000). Analysis of the gene model revealed the presence of a single intron of 504 bp in the 5' untranslated region, which is 716 bp in length in the predicted mature transcript, a coding sequence of 1,650 bp, and a 3' untranslated region of 826 bp (Supplemental Fig. S1A). The predicted protein contains 549 amino acids, with a molecular mass of 61.2 kD and an isoelectric point of 10.8. The only conserved domain is the GRAS in the C terminus, where characteristic motifs and amino acids are highly conserved (Supplemental Fig. S1B).

The Arabidopsis GRAS family has been divided into several branches based on sequence homology (Bolle, 2004; Sun et al., 2012). The phylogenetic analysis of Arabidopsis and common bean sequences presented in Figure 1A shows that the protein encoded by Phvul.003G085000 belongs to the Phytochrome A

Signal Transduction1 (PAT1) branch of GRAS proteins, displaying highest sequence similarity with Scarecrow-like 13 (SCL13) from Arabidopsis. SCL13 was shown to play a role in light responses mediated by phytochrome A and B but is also expressed at high levels in Arabidopsis roots (Torres-Galea et al., 2006). The PAT1 family is represented by six members in Arabidopsis and 11 members in common bean (Fig. 1A). A phylogenetic analysis of the SCL13 branch, including the best homologs of AtSCL13 of *M. truncatula* and *L. japonicus*, is shown in Figure 1B. NSP1 and NSP2, two GRAS proteins identified in *M. truncatula* as required for nodulation (Kaló et al., 2005; Smit et al., 2005), as well as their best homologs/putative orthologs in common bean (Phvul.001G129400 and Phvul.009G122770), belong to the SHORT-ROOT (SHR) and HAIRY MERISTEM (HAM) families, respectively (Fig. 1A), revealing that

Figure 1. *SIN1* encodes a GRAS transcription factor of the PAT1 subfamily. A, Phylogenetic analysis of the GRAS family of common bean and Arabidopsis based on the classification in subfamilies performed by Bolle (2004) and Pysh et al. (1999). The position of *SIN1* (Phvul.003G085000) is indicated by a rectangle. NSP1 and NSP2 from *M. truncatula* are indicated with arrows. The phylogram was constructed using the neighbor-joining method based on the multiple sequence alignment analysis. The phylogenetic tree was generated using MEGA5 from a ClustalW analysis. Numbers represent bootstrap values obtained from 1,000 trials. B, SCL13 and its homologs from common bean, *M. truncatula*, and *L. japonicus*.



they are not close homologs of the protein encoded by Phvul.003G085000. Based on this analysis, we named the gene Phvul.003G085000 as *SCL13 Involved in Nodulation1* (*SIN1*).

SIN1 Interacts with NF-YC1

The partial cDNA of *SIN1* isolated in the yeast two-hybrid screening corresponds to a portion of the GRAS domain that contains the conserved Leu heptad II and one-half of the PFYRE motif (Supplemental Fig. S1B). Therefore, the interaction between NF-YC1 and *SIN1* was tested in yeast by retransformation with the full-length open reading frames (ORFs) of each protein. Growth under high stringent selection conditions and measurement of β -galactosidase activity confirmed the interaction between the complete proteins in yeast (Fig. 2). Deletion of either the C or N termini of NF-YC1 (Fig. 2A) partially interfered with the interaction, reducing the β -galactosidase activity to approximately 32% in both cases (Fig. 2, B and C). On the other hand, expression of the central region of NF-YC1, which harbors the conserved histone fold motifs required for DNA binding and the interaction with the A and B subunits of the NF-Y complex, may not be sufficient to interact with *SIN1*. This result indicates that regions other than the core domain of NF-YC1 are required for the interaction with *SIN1*. The physical interaction was confirmed in planta by bimolecular fluorescence complementation (BiFC) after agroinfiltration of *Nicotiana benthamiana* leaves (Fig. 2D). *SIN1* and NF-YC1 were fused to both the split C and N termini of the yellow fluorescent protein (YFP) and expressed in complementary pairs in agroinfiltrated leaves. Two days after transformation, a fluorescent signal corresponding to the wavelength of YFP emission was detected predominantly in the nucleus of *N. benthamiana* leaf epidermal cells by confocal laser microscopy (Fig. 2D). No signal was observed when the split C terminus of YFP (CYFP) and NF-YC1 fused to the split N terminus of YFP (NFYP; Fig. 2D, left) or NYFP and *SIN1*-CYFP were coexpressed (Supplemental Fig. S2A). A strong fluorescence signal in the nucleus was visualized when NSP1 and NSP2 from *M. truncatula* were used as a positive control of a BiFC interaction (Hirsch et al., 2009). This fluorescence signal was not observed when the interaction of either NF-YC1 or *SIN1* was tested against NSP1 or NSP2 (Supplemental Fig. S2, B–E). Taken together, our results suggest that *SIN1* and NF-YC1 interact both in yeast and in planta and that the interaction takes place mainly in the nuclei of plant cells.

SIN1 Is Localized Predominantly in the Nucleus

A nuclear localization signal known as pat7, which consists in a pattern starting with a P followed within three residues by a basic segment containing three K/R residues out of four, was identified in the amino acid 452 of the *SIN1* sequence (PRDDKKR) according to a

pSORTII analysis (Horton and Nakai, 1997) and predicted a nuclear localization with 70.6% reliability, based on Reinhardt's method for cytoplasmic/nuclear discrimination (Reinhardt and Hubbard, 1998). To investigate the subcellular localization of *SIN1*, a translational fusion between the GFP and *SIN1* (GFP-*SIN1*) was expressed in *N. benthamiana* leaves after agroinfiltration. Observation of the fluorescent signal indicates that *SIN1* is distributed between the nucleus and the cytoplasm (Fig. 2E). The integrity and stability of the GFP-*SIN1* fusion protein was verified by western blot (Fig. 2F).

SIN1 Is Expressed in Roots and Mature Nodules

Expression of *SIN1* in different organs from common bean was analyzed by quantitative reverse transcription followed by PCR (RT-qPCR). *SIN1* transcripts were detected in both photosynthetic and nonphotosynthetic organs; however, *SIN1* transcripts accumulated at higher levels in roots than in leaves or stems of 7-d-old plants and in nodules of 14 d post inoculation (dpi) as compared with younger nodules (i.e. 7 dpi; Fig. 3A). Because we have previously shown that *NF-YC1* mRNAs increase in roots at early time points after *R. etli* inoculation (Meschini et al., 2008; Zanetti et al., 2010), we examined the accumulation of *SIN1* transcripts at 24 h post inoculation (hpi) and 4 dpi. No differences were observed between uninoculated and inoculated roots at any of these time points (Fig. 3B). On the other hand, the expression pattern of the closest homolog of *SIN1*, Phvul.006G141700, revealed a completely distinct expression pattern: transcripts of this gene accumulated at higher levels in leaves compared with other organs, such as stem, root, and nodules (Supplemental Fig. S3).

Expression data of the putative ortholog/best homolog from *M. truncatula* (Medtr4g133660) was retrieved from RT-qPCR data (Moreau et al., 2011). Transcripts of this gene exhibited a similar expression pattern to that of *SIN1* in common bean, with highest expression in mature nodules of 14 and 16 dpi (Supplemental Fig. S4). The expression pattern observed in both legume plants is compatible with a role of *SIN1* at late stages of the symbiotic interaction between legumes and rhizobia. Based on gene expression data measured by microarray (Høgslund et al., 2009), the best homologs from *L. japonicus* (Fig. 1B) are accumulated in inoculated tissue at late stages of nodule formation (Supplemental Fig. S5). Mutation of *NODULE INCEPTION* or other components of the Nod Factor signaling pathway did not significantly affect the expression of the best homolog of *SIN1*, *chr4.CM0288.500.r2.m* (Supplemental Fig. S5).

Posttranscriptional Silencing of SIN1 Using RNAi

To functionally characterize *SIN1*, we took advantage of the common bean root transformation system using *Agrobacterium rhizogenes*. Expression of an RNA interference (RNAi) construct containing a region of the C

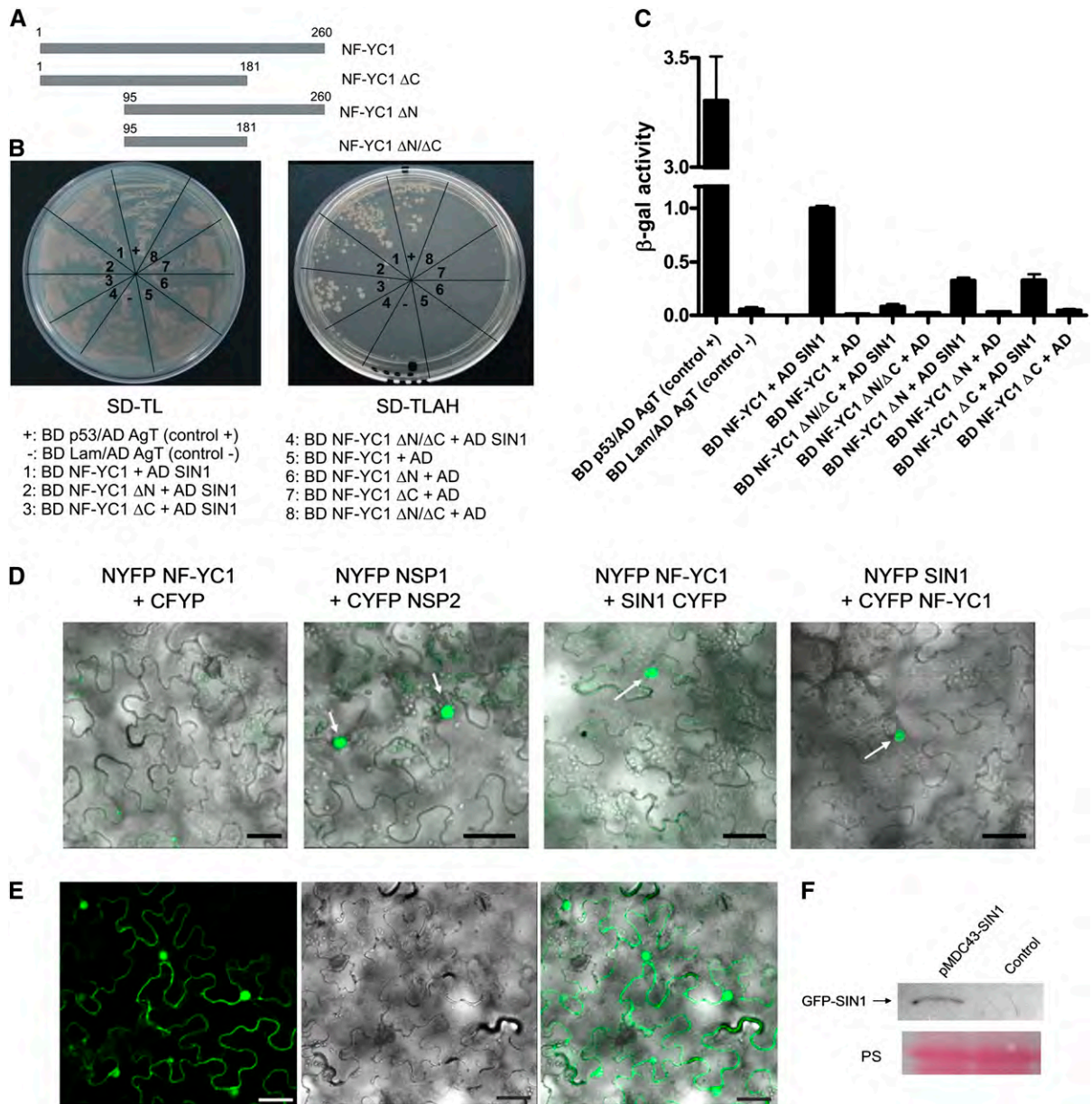


Figure 2. Interaction of NF-YC1 and SIN1. A, Schematic representation of NF-YC1 and deleted versions designed to test the interaction. B, Interaction in yeast using the two-hybrid system. The pGBKT7 plasmid containing the binding domain of the yeast transcription factor Gal4 (BD) was fused to different versions of NF-YC1 and introduced into the Y187 strain by transformation, whereas pGADT7, containing the activation domain of Gal4 (AD), was fused to SIN1 and introduced into the AH109 strain. These strains were mated in the combinations indicated (1 to 8) and selected in synthetic defined media (SD) lacking Leu, Trp (SD-TL) or Leu, Trp, adenine, and His (SD-TLAH). Positive and negative controls are p53 interacting with AgT and LamC, respectively. C, β -Galactosidase activity measured on the diploid yeasts. D, BiFC assay showing the interaction of NF-YC1 and SIN1 in *N. benthamiana* epidermal cells. The interaction between *M. truncatula* NSP1 and NSP2 is shown as a positive control. Arrows indicate the fluorescent signal in the nuclei. Bar = 25 μ m. E, Subcellular localization of SIN1: the ORF of SIN1 was cloned in pMDC43 for the construction of the GFP-SIN1 fusion and introduced in *N. benthamiana* leaf cells by agroinfiltration. The same image, obtained with a confocal microscope, is shown under UV (left), white light (middle), and merged (right). Bar = 25 μ m. F, Proteins were extracted from leaves agroinfiltrated with GFP-SIN1 or an untransformed strain of *Agrobacterium tumefaciens* (control), subjected to SDS-PAGE, and analyzed by immunoblot with anti-GFP antibodies, revealing the presence of a single band with the expected size of 88 kD (left). PS, Ponceau stain.

terminus of *SIN1* produced a reduction of *SIN1* mRNA levels ranging from 80% to 90%, as compared with control roots expressing *GUS* RNAi (Supplemental Fig. S6).

To assess the specificity of the posttranscriptional silencing generated by the RNAi strategy, we designed gene-specific primers for other genes of the PAT1 subfamily.

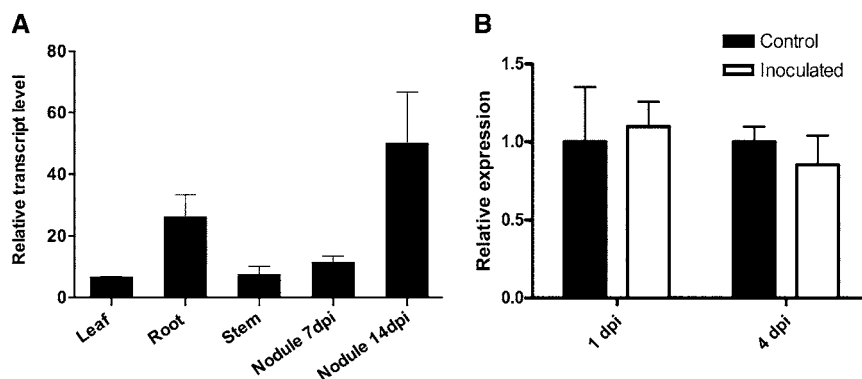


Figure 3. Relative expression of *SIN1* in different organs. A, RT-qPCR analysis of *SIN1* accumulation in different organs of common bean. Total RNA was extracted from different organs (leaf, root, and stem) of 7-d-old plants grown under optimal conditions and nodules formed by *R. etli* SC15 strain at 7 and 14 dpi. B, Levels of *SIN1* mRNA in roots after inoculation with *R. etli* strain SC15 or with yeast-extract mannitol media (control) at 1 or 4 dpi. Expression of the *SIN1* gene was measured by RT-qPCR and then normalized with *PvEF1 α* expression values. Data are the media of three technical replicates and are representative of two independent experiments. In B, values are presented relative to the control at 1 dpi. Error bars represent the sd. Expression in roots and 14-dpi nodules were significantly higher than in other tissues in an unpaired two-tailed Student's *t* test with $P < 0.05$. No significant differences were observed between control and inoculated values at 1 or 4 dpi.

The closest homolog of *SIN1*, Phvul.006G141700, showed a reduction of 46% compared with control roots, indicating that the RNAi construct designed to knock-down *SIN1* partially affected transcript levels of this gene (Supplemental Fig. S6). The expression of two other members of the PAT1 branch, the best homologs of Arabidopsis PAT1 and SCL8 in common bean (Phvul.008G286000 and Phvul.007.G073500, respectively), was not modified by expression of the *SIN1* RNAi construct. Because it is well described that *NSP1* and *NSP2* GRAS transcription factors play essential roles during nodule formation in *M. truncatula*, we also quantified the mRNA levels of the putative orthologs/best homologs of these genes in common bean, Phvul.010G129400 and Phvu1.009G122700, respectively. No significant differences in transcript levels of these genes were observed between *GUS* and *SIN1* RNAi roots, indicating that the small RNA/s generated by expression of the *SIN1* RNAi construct is/are not targeting *NSP1* or *NSP2* (Supplemental Fig. S6). Our results indicate that the RNAi construct we generated strongly silences *SIN1* and to a lesser extent Phvul.006G141700, a gene that exhibits 74% of identity with *SIN1* at the amino acid level, but with a very distinct expression pattern (Supplemental Fig. S3).

SIN1 Is Involved in Lateral Root Elongation

Several members of the GRAS family have been involved in different root developmental processes, including root radial patterning, root growth, and root cell elongation. Therefore, we compared the root architecture of *SIN1* RNAi composite plants with controls that express the *GUS* RNAi construct. Macroscopic and microscopic observations did not reveal any obvious difference in the cellular organization of the root apical zone

between *GUS* and *SIN1* RNAi plants (Fig. 4A). The root length was measured in the primary root that emerges from the callus (main root), as well as the first and secondary lateral roots (LR1 and LR2, respectively; Fig. 4B). The length of the main root was not affected by expression of the *SIN1* RNAi construct (Fig. 4C). However, the length of lateral roots was significantly reduced in *SIN1* as compared with *GUS* RNAi roots (Fig. 4C); lateral roots emerging from the main hairy roots (LR1) or from the second branch point (LR2) were 46% and 80% shorter than those of control roots, respectively. On the other hand, the density of lateral roots and length of root hairs were not affected by *SIN1* silencing (Fig. 4, D and E). This result suggests this member of the PAT1 family could be specifically involved in the postemergence elongation stage of lateral roots.

SIN1 Is Required for Proper Nodule Development and Progression of Infection

SIN1 was identified as a protein that interacts with NF-YC1, a transcriptional regulator required for nodule organogenesis and development. Thus, we investigated whether posttranscriptional silencing of *SIN1* affected nodule formation. Expression of *SIN1* RNAi in common bean hairy roots produced a marked reduction (approximately 75% to 80%) in the number of nodules formed upon inoculation with *R. etli* (Fig. 5, A and B). This reduction was observed as early as 7 dpi and persisted until 18 dpi, the last time point analyzed here (Fig. 5C). In addition, the few nodules formed in the *SIN1* RNAi roots were significantly smaller than those developed in *GUS* RNAi roots (Fig. 5, A, B, and D). However, nodule growth was delayed but not arrested in *SIN1* RNAi roots because the diameter of nodules increased continuously over the

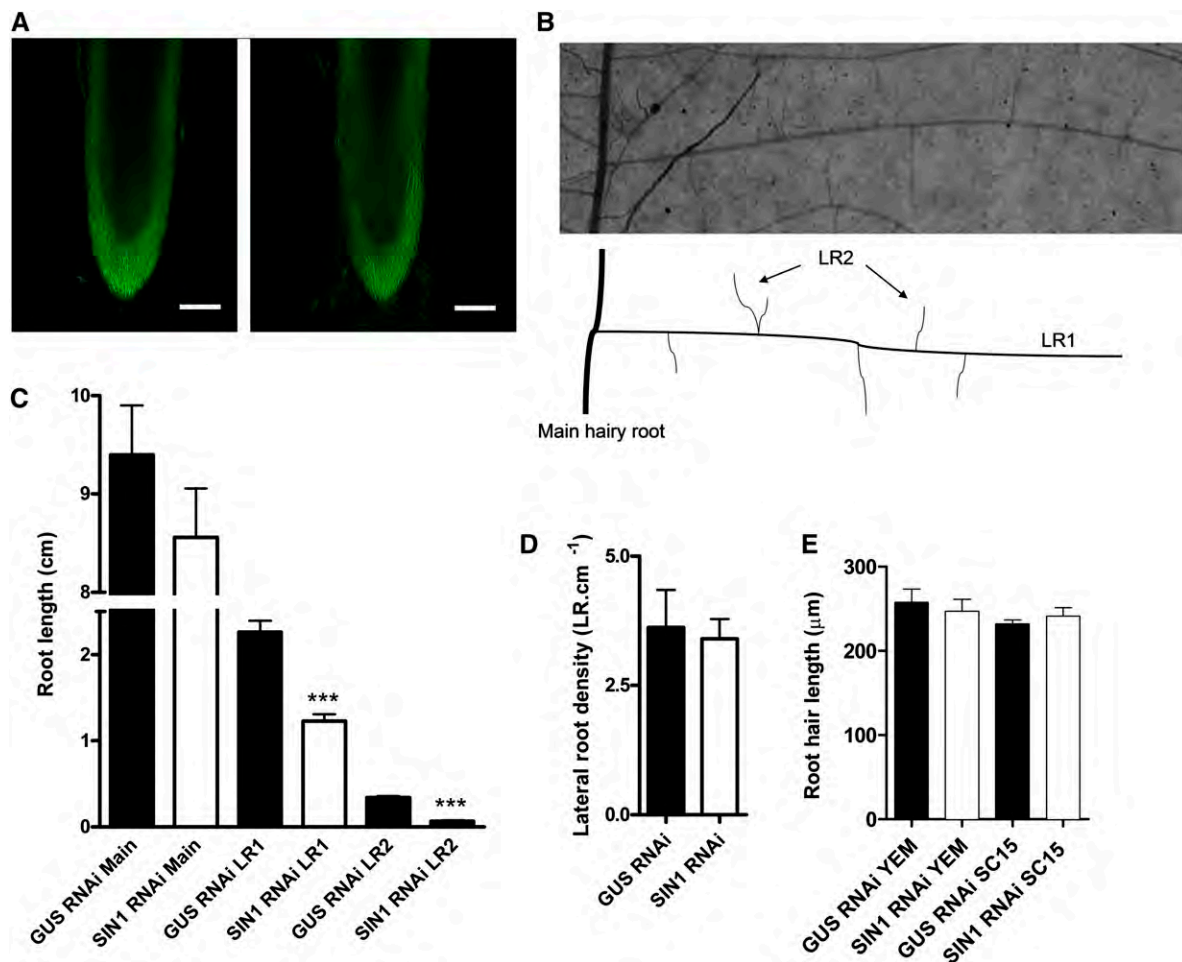


Figure 4. The length of lateral roots is affected in *SIN1* RNAi composite plants. A, General cell organization of the root tip of *GUS* (left) or *SIN1* (right) RNAi plants. Cells were observed in a confocal fluorescent microscope with optimal settings for GFP. Images were obtained by z integration of 5- μ m sections. Bar = 100 μ m. B, The first and second branches of roots emerging from the main hairy root were referred as LR1 and LR2, respectively. Length of the main root, LR1, and LR2 (C) and density of LR1 (D) were measured in *GUS*- and *SIN1* RNAi-transformed roots (black and white bars, respectively). E, Root hair length was also determined in roots inoculated with *R. etli* SC15 or control (yeast-extracted mannitol). Asterisks in C indicate significant differences in an unpaired two-tailed Student's *t* test with $P < 0.001$ ($n > 100$). No significant differences were observed in D and E between *GUS* and *SIN1* RNAi values ($n > 100$). [See online article for color version of this figure.]

time (from 6 to 19 dpi; Fig. 5D). At 7 dpi, most of the nodules formed in *SIN1* RNAi roots were infected by bacteria, but the occupancy of these nodules by a strain of *R. etli* that expresses the fluorescent protein DsRed was reduced as compared with control nodules (Fig. 5, E–H). Bright-field micrographs of mature nodule sections stained with toluidine blue revealed that the central tissue of *SIN1* RNAi nodules contained both infected and noninfected cells, but the colonized area was reduced as compared with *GUS* RNAi nodules (Fig. 5, I and J).

The phenotype produced by *SIN1* RNAi expression suggests that this gene might be involved in nodule organogenesis and growth but also led us to hypothesize that *SIN1* might have a role in the rhizobial infection of common bean roots. Therefore, we quantified the number and the progression of infection events by inoculating roots with the *R. etli* strain that expresses

the DsRed protein. The number of ITs per centimeter of root was slightly reduced in *SIN1* RNAi roots at 4 and 8 dpi; however, these differences were not statistically significant (Fig. 6A). On the other hand, whereas most of the ITs formed in control plants were found to reach the dividing cells in the cortex, they ended more frequently in the root hair or in the epidermal cells in *SIN1* RNAi roots at 4 or 8 dpi (Fig. 6B). Taken together, our results suggest that *SIN1* is not required for initiation of ITs but plays a key role in their progression.

Expression of *SIN1* RNAi Affects Expression of Cell Cycle Genes

To study whether *SIN1* is required for activation of early molecular responses of legumes to rhizobia, we

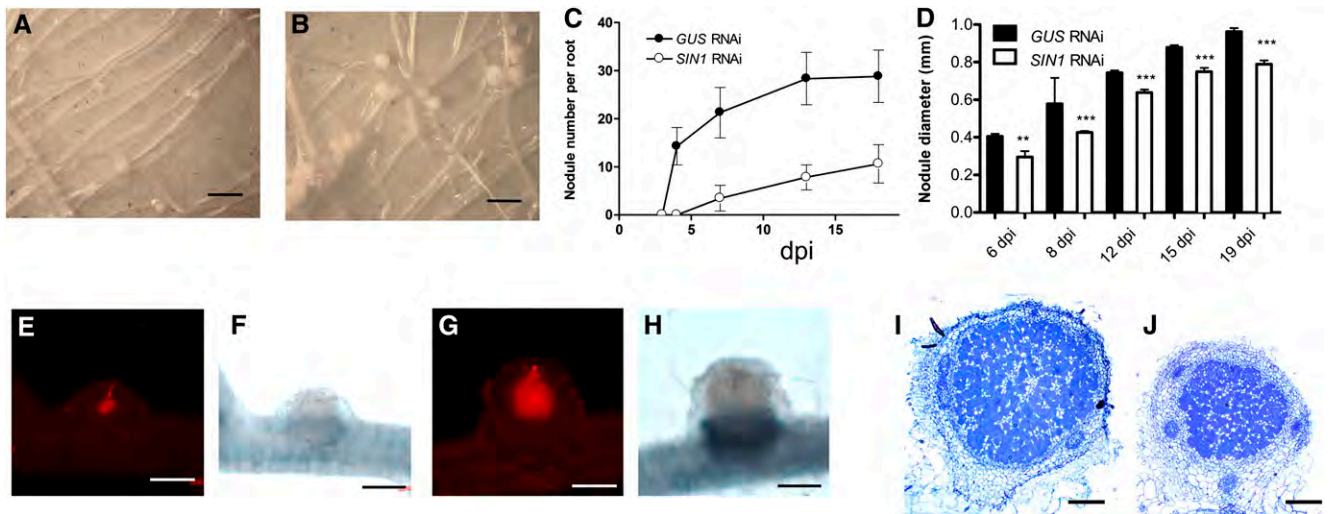


Figure 5. *SIN1* RNAi plants developed less and smaller nodules than controls. Nodulation phenotype of *SIN1* (A) and *GUS* RNAi (B) roots at 7 dpi with *R. etli* SC15. The number (C) and size (D) of nodules were recorded in both types of plants at different times after inoculation. Asterisks in D indicate significant differences in an unpaired two-tailed Student's *t* test with $P < 0.001$ ($n > 120$). Occupancy of nodules was examined 5 dpi with a strain of *R. etli* that expresses the DsRed protein by fluorescent microscopy in *SIN1* (E and F) and *GUS* RNAi roots (G and H) under UV (E and G) or visible light (F and H). Longitudinal sections of nodules formed in *GUS* (I) or *SIN1* (J) RNAi roots were observed at 21 dpi with *R. etli* strain SC15. Bars = 1 cm (A and B), 500 μm (E–H), and 300 μm (I and J).

monitored the expression of genes that are induced at early stages of the interaction. For this analysis, we selected *Rhizobium*-induced peroxidase (*RIP*), ethylene responsive factor required for nodulation (*ERN*), and early nodulin 40 (*ENOD40*), a group of genes that have been previously shown to increase their steady-state mRNA levels in common bean upon rhizobia inoculation (Blanco et al., 2009; Zanetti et al., 2010). As expected,

the three selected genes were induced by *R. etli* infection at 24 hpi (Fig. 7; Supplemental Fig. S7); however, expression of *SIN1* RNAi did not significantly affect the expression of these genes in control roots or in those inoculated with rhizobia, as compared with *GUS* RNAi plants. Considering the interaction between *SIN1* and NF-YC1, we wondered if *SIN1* silencing had an effect on transcript levels of two subunits of the

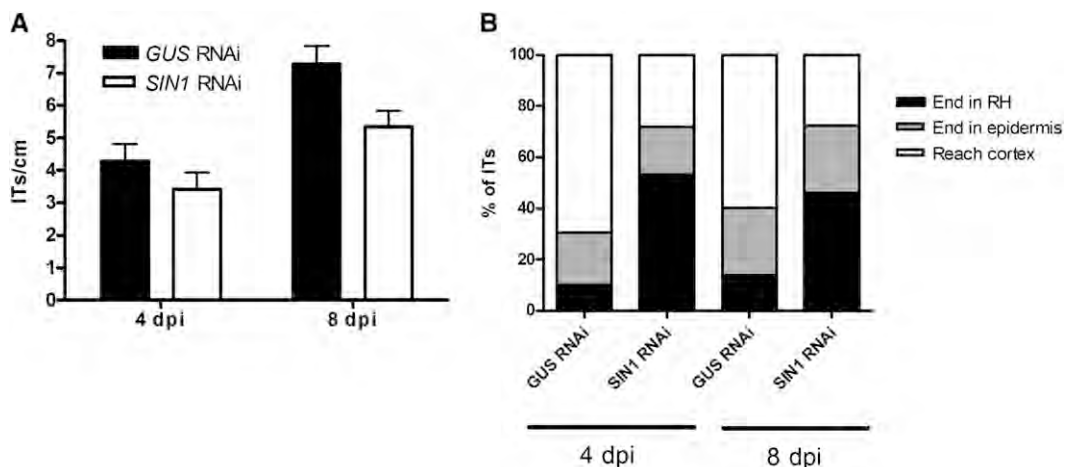


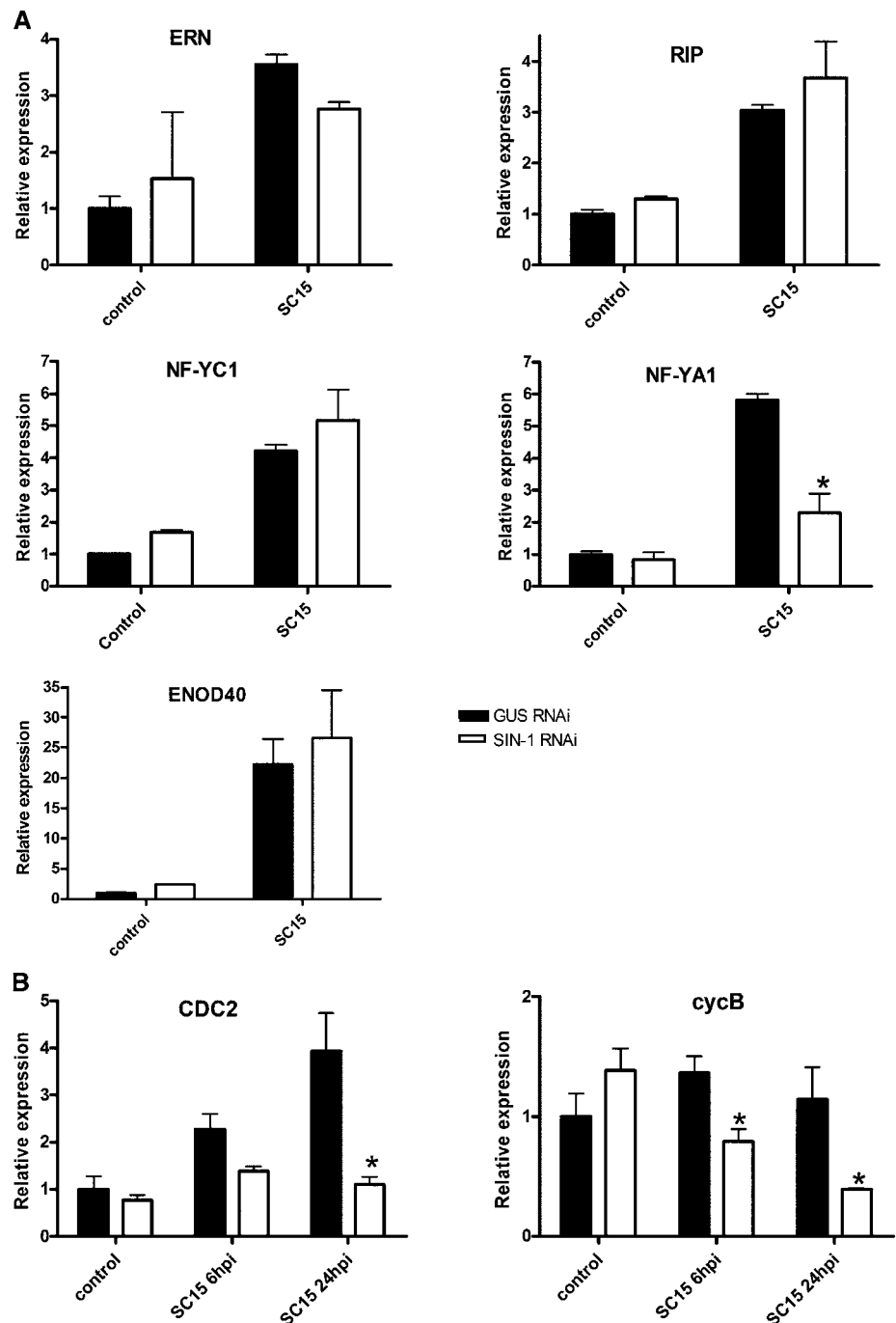
Figure 6. Effect of *SIN1* RNAi on infection events. The density of ITs (number of IT per root centimeter) formed in *GUS* and *SIN1* RNAi composite plants was quantified at 4 and 8 dpi with a *R. etli* strain that expresses the DsRed protein. There were no significant differences between *GUS* and *SIN1* RNAi at 4 or 8 dpi in an unpaired two-tailed Student's *t* test with $P < 0.05$ (A). ITs formed were classified as events that reach the cortex (white bars), end in the epidermis (gray bars), or end in the root hair (RH; black bars) and expressed as percentage of the total. The number of ITs that end in RH or reach the cortex were significantly higher in *SIN1* than in *GUS* RNAi plants in an unpaired two-tailed Student's *t* test with $P < 0.05$, whereas ITs that end in epidermis did not show significant variations (B). Approximately 60 infection events were recorded for *GUS* and *SIN1* RNAi at 4 or 8 dpi.

heterotrimeric complex, NF-YC1 and NF-YA1; the last is the best homolog/putative ortholog in common bean of *M. truncatula* NF-YA1/MtHAP2-1. As observed in Figure 7 and Supplemental Figure S7, transcripts of both genes increased in response to rhizobia, but no significant differences were observed between *GUS* and *SIN1* RNAi for NF-YC1. On the other hand, accumulation of NF-YA1 mRNAs in response to rhizobia inoculation was impaired in *SIN1* RNAi as compared with *GUS* RNAi roots, suggesting that SIN1 might directly or indirectly be involved in the transcriptional

or posttranscriptional response of NF-YA1 to rhizobial infection.

In a previous report, we showed that NF-YC1 controls the expression of genes involved in the G2/M transitions of the cell cycle, which are activated during nodule organogenesis (Zanetti et al., 2010). Thus, we examined whether silencing of *SIN1* affected the expression of two of these genes: *Cell Division Cycle 2* (*CDC2*) and *CYCLIN B* (*CYCB*). As observed in Figure 7B and Supplemental Figure S7, the silencing of *SIN1* also produced a reduction of *CDC2* and *CYCB* in inoculated

Figure 7. Effect of *SIN1* RNAi on the expression of early nodulins (A) and cell cycle genes (B). *GUS* (black bars) or *SIN1* RNAi (white bars) roots were inoculated with the *R. etli* strain SC15 and tissue was collected 6 or 24 hpi. Controls were treated with yeast-extract mannitol for 24 h. Expression of indicated genes was measured by RT-qPCR, normalized with *PvEF1 α* expression values, and presented relative to the values of *GUS* RNAi controls. Data are the media of three technical replicates, and two other independent experiments are shown in Supplemental Figure S7. Error bars represent the SD. Asterisks indicate that expression values in *SIN1* RNAi are significantly different from those in *GUS* RNAi roots at the same time point, in an unpaired two-tailed Student's *t* test with $P < 0.01$.



roots as compared with controls, indicating that *SIN1* and *NF-YC1* might act together to trigger the molecular responses that lead to reactivation of cortical divisions during nodule formation.

DISCUSSION

In this work, we identified a member of the plant-specific family of GRAS proteins through its physical interaction with *NF-YC1*. Both proteins are necessary for nodule organogenesis during the symbiotic interaction between common bean and rhizobia. However, *SIN1* seems to have an additional role in lateral root growth, a phenotype that was not observed in *NF-YC1* silenced roots. The posttranscriptional silencing mediated by RNAi produced a strong reduction of *SIN1* transcript levels but also partially reduced mRNAs levels of Phvul.006G141700 (Supplemental Fig. S6). Even though we cannot exclude an effect of the partial silencing of this *SIN1* homolog on the RNAi-mediated phenotype, it is more likely that changes in lateral root growth and the nodulation process are due to *SIN1* silencing. This assumption is based on the different levels of silencing, as well as the distinct expression pattern of both genes: whereas *SIN1* is accumulated at higher levels in the affected organs, namely roots and nodules, Phvul.006G141700 is mainly expressed in leaves (Supplemental Fig. S3).

As mentioned previously, GRAS proteins are involved in different developmental processes. Some members of the family are required for root patterning (SHR and SCR families), axillary meristem development (Lateral Suppressor), maintenance of shoot apical meristem (HAM), gibberellic and jasmonic acid response (DELLA), and light signaling (PAT1). In addition, three members of the GRAS family were previously identified as required for symbiotic interactions in *M. truncatula*: NSP1, NSP2, and RAM1. The heterodimers formed by NSP1 and NSP2 associate with promoters of Nod Factor-inducible genes, leading to molecular responses specific to legume-rhizobia interaction, whereas dimerization of NSP2 with RAM1 activates a molecular program that leads to arbuscular mycorrhization (Hirsch et al., 2009; Gobbato et al., 2012). On the other hand, SHR and SCR, other members of the GRAS gene family, can also form a heterodimer that defines a single cell layer of endodermis in plants (Cui et al., 2007). The primary sequence of *SIN1* contains all the domains defined in GRAS proteins: Leu heptad repeats I and II, VHIID, PFYRE, and SAW. Phylogenetic analysis of *SIN1* showed that it belongs to a branch that is present in legume and nonlegume plants, PAT1, whose members have been involved in phytochrome-dependent red and far-red light signaling (Bolle et al., 2000; Torres-Galea et al., 2006). *SIN1*, as NSP1 and NSP2, is involved in nodulation but also plays a role in lateral root growth, a developmental process that has not yet been associated with other members of the GRAS transcriptional regulators. Interestingly, two members of the *L. japonicus* NF-Y complex have been associated with lateral root formation

by activating cell divisions in the primordia (Soyano et al., 2013). Ectopic expression of *LjNF-YA1* and *LjNF-YB1* resulted in the formation of lateral roots with abnormal tips, suggesting a connection between NF-Y transcription factors and the organogenesis of lateral roots.

Symbiosis between legumes and rhizobia relies in the coordinated development of two processes, nodule organogenesis and bacterial infection (Oldroyd and Downie, 2008). We have previously reported that knockdown of *NF-YC1* leads to a reduction of the number and size of nodules (Zanetti et al., 2010). Here, we showed that expression of *SIN1* RNAi produced a similar effect: *NF-YC1* and *SIN1* RNAi roots formed only 20% of the nodules developed in *GUS* RNAi control plants. However, the infection phenotype was more severe in *NF-YC1* RNAi plants, showing a higher proportion of abortive events, a strong reduction of the density of ITs, and an excessive root hair deformation, whereas these defects were not observed in *SIN1* RNAi roots. This comparison suggests that *NF-YC1* can play a role in early events that lead to IT formation independently of *SIN1*. This idea is consistent with the expression pattern of both genes, because *NF-YC1* mRNAs levels increased as early as 3 hpi and remained high at 24 hpi, whereas *SIN1* transcript levels are not changed during early stages of the interaction. Comparison with the phenotype observed in NSP1 and NSP2 mutants also suggests that *SIN1* would act at later steps of the interaction. The expression of ERN (a target of the NSP1-NSP2 heterodimer) and other early nodulins was not affected by silencing of *SIN1*. The association of a GRAS protein of the PAT1 subfamily with root symbiosis suggests that transcriptional networks governing root nodule formation involve a sequential activation of different and specific members of this large family of transcription factors. On the other hand, *SIN1* and *NF-YC1* control, directly or indirectly, the expression of cell cycle genes, which are necessary to trigger the division of cortical cells (Savouré et al., 1994; Yang et al., 1994). The fact that expression of *NF-YA1* is affected by knockdown of *SIN1*, together with the requirement of *NF-YA1* for cortical cell divisions (Soyano et al., 2013), points to a strong connection between *SIN1* and NF-Y transcription factors. Expression of *NF-YA1/MtHAP2-1* during nodule formation is controlled, in part, at posttranscriptional level by the action of the microRNA169 (Combié et al., 2006). An *in silico* analysis of microRNA putative targets in common bean identified *NF-YA1* as a target of miR169 (Peláez et al., 2012). In this context, *SIN1* might be required either for transcriptional activation of *NF-YA1* or stabilization of its mRNAs upon rhizobial inoculation.

Our results showed that *SIN1* is located mainly in the nucleus but also in the cytoplasm of *N. benthamiana* leaves. Other GRAS proteins were found to locate in the nucleus or in the cytoplasm or to be distributed between different subcellular compartments (Bolle, 2004). For example, the two GRAS proteins involved in legume-rhizobia symbiosis showed different localizations inside the cell; NSP1 is located in the nucleus, whereas NSP2 is visualized in the nuclear membrane and the endoplasmic

reticulum, and it is translocated to the nucleus of epidermal root cells after Nod Factor perception (Kaló et al., 2005; Smit et al., 2005). BiFC experiments indicated that SIN1 and NF-YC1 are able to form a complex mainly in the nuclei of *N. benthamiana* cells, as expected for two transcriptional regulators forming a complex that modulates gene expression. Based on the yeast two-hybrid assays, both the C and N termini of NF-YC1 seem to be required for an efficient interaction with SIN1. Considering that NF-YC1 localization is predominantly nuclear (Zanetti et al., 2010), our results suggest that the molecular complex between both proteins is formed directly and stabilized in the nucleus. However, it is not known whether SIN1 is rapidly translocated to the nucleus upon interaction with NF-YC1 or Nod Factor perception.

SIN1 is expressed at higher levels in roots than aerial tissue, with maximum levels at late steps of nodule formation. However, mRNA levels did not change during early time points of the interaction with rhizobia. This expression pattern is comparable to *NSP1*, which is constitutively expressed in roots and remained unchanged upon rhizobia inoculation, but it is different from *NSP2*, which is induced 2-fold in *M. truncatula* roots at 24 hpi with rhizobia or after Nod Factor treatment according to Affymetrix and reverse transcription-PCR data (Kaló et al., 2005). On the other hand, *NF-YC1* is induced at very early time points after rhizobium inoculation, but its expression is sustained during later stages of the interaction. In addition to transcript accumulation, a recent report showed that genes involved in the nodulation signaling pathway are regulated at translational level upon rhizobia inoculation (Reynoso et al., 2012). For this reason, an increase of protein levels of SIN1 at early time points cannot be excluded. The phenotypic analysis presented here suggests that the biological action of the complex formed by SIN1 and NF-YC1 would take place at the time of cortical cell divisions and IT growth but also at later time points, when nodules are developing and actively growing.

Several genes involved in the nodulation signaling pathway have been identified by forward genetics, transcriptomic analysis followed by reverse genetics, or identification of partners by two-hybrid screenings. This report constitutes an example of how new components of the root nodule symbiotic pathway can be identified based on the physical interaction with a protein already known to be involved in this process. The screen for proteins that are part of the same transcriptional complex as NF-YC1 led us to identify SIN1 as a new player of root biology of common bean, a species that is emerging as a new model for grain legumes that are important for human alimentation.

MATERIALS AND METHODS

Biological Material and Plant Transformation

Plant growth and transformation were performed essentially as previously described (Blanco et al., 2009; Zanetti et al., 2010). *Rhizobium etli* strain SC15 was previously reported (Aguilar et al., 2004). The *R. etli* strain expressing

the DsRed protein was generated by electroporation with the plasmid pBHRDsRED T3 (Smit et al., 2005).

Yeast Two-Hybrid Screening

A cDNA library in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*; AH109 strain, MAT α) was constructed in pGADT7-Rec using the Matchmaker Library Construction and Screening Kit (Clontech). cDNA from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris*) inoculated with *R. etli* for 24 h was prepared using oligo(dT) and random primers in separated reactions and then pooled for yeast transformation. The library titer was estimated in 6.4.10⁶ clones. Bait vectors were obtained by cloning the complete ORF and truncated versions of NF-YC1 in pGBKT7 and introduced in Y187 (MAT α). Primers for each construct are detailed in Supplemental Table S1. The complete ORF of SIN1 was obtained by amplification with SIN1 ORF yeast two-hybrid primers (Supplemental Table S1) and recombined in pGADT7-Rec as indicated (Clontech). Activation of reporter genes and growth of yeast containing bait or empty plasmid were tested following manufacturer's instruction. Screening of the library was performed by mating and plating in synthetic defined media lacking Leu, Trp, His, and adenine. Approximately 10⁷ colonies were tested for interactions. Plasmids were purified from yeast using the Yeastmaker Yeast Plasmid Isolation Kit (Clontech). To test interactions between SIN1 and different versions of NF-YC1, and to obtain positive and negative controls, haploid yeasts were mated in a small scale as described by the kit manufacturer. The liquid β -galactosidase assay using *ortho*-Nitrophenyl- β -galactoside as substrate was performed according to the Yeast Protocols Handbook (Clontech).

Plasmid Construction

To create a construct for RNAi-mediated silencing of *SIN1*, a fragment of 397 bp corresponding to the C terminus of the coding region of this gene was amplified by PCR using the primers SIN1 RNAi (Supplemental Table S1) and cDNA from common bean roots as template. The PCR product was cloned into the pENTR/D-TOPO entry vector following manufacturer's instructions (Invitrogen) and recombined into the Gateway compatible destination vector pK7GW1WG2D(II) (Karimi et al., 2002) to produce the RNAi construct. The *GUS* RNAi plasmid was previously generated (Blanco et al., 2009). For sub-cellular localization, the complete ORF of SIN1 was amplified with primers SIN1 stop (Supplemental Table S1), cloned into pENTR/D-TOPO, and recombined into the Gateway compatible vector pMDC43 for the construction of the 2X35S:GFP6-SIN1 fusion (Curtis and Grossniklaus, 2003). For BiFC assays, the ORF of *NF-YC1* and *SIN1* were amplified with M13 primers from the corresponding pENTR/D-TOPO vectors and then recombined into the pGPTVII.Bar.YN-GW, pGPTVII.Bar.YC-GW, and pGPTVII.Hyg.GW-YC for fusion to N and C termini of the N fragment of split YFP and the C terminus of the C fragment of split YFP, respectively (Hirsch et al., 2009).

Phenotypic Analysis

Composite plants were generated as described (Blanco et al., 2009). Root length was measured from the tip to the site of hairy root emergence on the stem 10 d after transplantation to boxes. Lateral root length was measured as the distance between the primary root and the tip of the lateral root as described (Rípodas et al., 2013). Lateral and emerging roots were counted and normalized by lineal centimeter of root. Five roots per plant were selected from 10 independent plants for each construct (*GUS* or *SIN1* RNAi). Statistical significance was evaluated by unpaired two-tailed Student's *t* tests. Length of root hairs was measured as previously reported (Blanco et al., 2009). Wild-type or transgenic roots were inoculated with *R. etli* strains as described (Meschini et al., 2008). Phenotypic analysis of nodules, quantification, and classification of infection structures were performed as previously described (Zanetti et al., 2010). The total number of infection events recorded was 58 for *GUS* RNAi and 64 for *SIN1* RNAi at 4 dpi and 60 for *GUS* and *SIN1* RNAi at 8 dpi.

Quantitative Reverse Transcription-PCR Assays

RNA extraction, cDNA synthesis, and RT-qPCR assays in common bean were performed as described (Meschini et al., 2008). For each primer pair, the presence of a unique product of the expected size was verified on ethidium bromide-stained agarose gels after PCR reactions. Absence of contaminant genomic DNA was confirmed in reactions with DNase-treated RNA as template. Amplification of common bean elongation factor 1 α (EF1 α) was used to

normalize the amount of template cDNA. At least three biological replicates were performed per condition. Conditions and primers used to quantify *EF1 α* , *ENOD40*, *ERN*, *NF-YC1*, *CDC2*, *CYCB*, and *RIP* from common bean were previously described by Zanetti et al. (2010). Primers for amplification of *NF-YA1*, *SIN1*, and homolog genes are listed in Supplemental Table S2. RT-qPCR experiments in *Medicago truncatula* were performed as in Moreau et al. (2011).

Sequence Analysis

DNA sequences of common bean were obtained from the Dana-Farber Cancer Institute gene index (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>) and the 1.0 version of the genome produced by the U.S. Department of Energy Joint Genome Institute, available at Phytozome (<http://www.phytozome.org/>), by a TBLASTN search. Sequences from *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) and *M. truncatula* were retrieved from public databases (<http://www.arabidopsis.org> and <http://www.medicagohapmap.org>). Phylogenetic analysis and sequence alignment were performed as described (Ripodas et al., 2013). *Lotus japonicus* sequences were retrieved from the Kasuza DNA Research Institute Web site (<http://www.kazuza.or.jp/lotus/index.html>) and expression data from the *L. japonicus* Gene Expression Atlas at the Noble Foundation (<http://lgea.noble.org/v2/>).

Agroinfiltration of *Nicotiana benthamiana* Leaves

The *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 was transformed by electroporation. Overnight cultures of the strains carrying each construct or the p19 silencing suppressor plasmid (Voinnet et al., 2003) were centrifuged and pellets resuspended in 5 mL of Agromix (10 mM MgCl₂, 10 mM MES/KOH, pH 5.6, and 150 mM acetosyringone) and incubated at room temperature for 2 h. Suspensions were brought to an optical density at 600 nm of 1 with Agromix. Different construct combinations were prepared by mixing equal volumes of each culture, diluted to obtain a final optical density at 600 nm of 0.25. The *Agrobacterium tumefaciens* mixture was infiltrated into *N. benthamiana* leaves as described previously (Voinnet et al., 2003). The fluorescence was observed 50 to 70 h after agroinfiltration.

Microscopy and Imaging

Optical microscopy of nodule section was performed as previously described (Zanetti et al., 2010). Imaging of IT formation and nodule occupancy by the DsRed-labeled *R. etli* strain was performed with an Olympus IX51 inverted microscope using white and UV light with appropriated filters. Images were captured using a Q-Color3 high-resolution camera (Olympus Corporation). An inverted SP5 microscope (Leica Microsystems) was used for confocal microscopy.

SDS-PAGE and Immunoblots

Proteins were separated on 12% (w/v) SDS-PAGE and detected by immunoblotting as described (Zanetti et al., 2005) using an anti-GFP antibody (1:1,000; BD Bioscience).

Supplemental Data

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

Supplemental Figure S1. Analysis of SIN1 sequence.

Supplemental Figure S2. Negative interaction of NF-YC1 and SIN1 with NSP1 and NSP2.

Supplemental Figure S3. Relative expression of Phvul.006G141700 in different organs.

Supplemental Figure S4. Expression of the best homolog of SIN1 in *M. truncatula*.

Supplemental Figure S5. Expression of the best homologs of SIN1 in *L. japonicus*.

Supplemental Figure S6. Posttranscriptional gene silencing of *SIN1*.

Supplemental Figure S7. Biological replicates of the effect of *SIN1* RNAi on the expression of early nodulins and cell cycle genes.

Supplemental Table S1. Primer sequences used for cloning.

Supplemental Table S2. Primer sequences used for quantitative PCR.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sandra Moreau for sharing RT-qPCR data, Giles Oldroyd for providing the BiFC vectors and control constructs, and Silvana Tongiani, Paula Giménez, Claudio Mazo, and Diana Lauff for technical assistance.

Received October 21, 2013; accepted January 12, 2014; published January 14, 2014.

LITERATURE CITED

- Aguilar OM, Riva O, Peltzer E (2004) Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 13548–13553
- Blanco FA, Meschini EP, Zanetti ME, Aguilar OM (2009) A small GTPase of the Rab family is required for root hair formation and preinfection stages of the common bean-*Rhizobium* symbiotic association. *Plant Cell* **21**: 2797–2810
- Bolle C (2004) The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* **218**: 683–692
- Bolle C, Koncz C, Chua NH (2000) PAT1, a new member of the GRAS family, is involved in phytochrome A signal transduction. *Genes Dev* **14**: 1269–1278
- Catoira R, Galera C, de Billy F, Penmetsa RV, Journet EP, Maillat F, Rosenberg C, Cook D, Gough C, Dénarié J (2000) Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell* **12**: 1647–1666
- Combier JP, de Billy F, Gamas P, Niebel A, Rivas S (2008) Trans-regulation of the expression of the transcription factor MĤAP2-1 by a uORF controls root nodule development. *Genes Dev* **22**: 1549–1559
- Combier JP, Frugier F, de Billy F, Boualem A, El-Yahyaoui F, Moreau S, Vernié T, Ott T, Gamas P, Crespi M, et al (2006) MĤAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes Dev* **20**: 3084–3088
- Cui H, Levesque MP, Vernoux T, Jung JW, Paquette AJ, Gallagher KL, Wang JY, Bilou I, Scheres B, Benfey PN (2007) An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants. *Science* **316**: 421–425
- Curtis MD, Grossniklaus U (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* **133**: 462–469
- Dolfini D, Gatta R, Mantovani R (2012) NF-Y and the transcriptional activation of CCAAT promoters. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **47**: 29–49
- Gobbato E, Marsh JF, Vernié T, Wang E, Maillat F, Kim J, Miller JB, Sun J, Bano SA, Ratet P, et al (2012) A GRAS-type transcription factor with a specific function in mycorrhizal signaling. *Curr Biol* **22**: 2236–2241
- Hirsch S, Kim J, Muñoz A, Heckmann AB, Downie JA, Oldroyd GED (2009) GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **21**: 545–557
- Högslund N, Radutoiu S, Krusell L, Voroshilova V, Hannah MA, Goffard N, Sanchez DH, Lippold F, Ott T, Sato S, et al (2009) Dissection of symbiosis and organ development by integrated transcriptome analysis of lotus japonicus mutant and wild-type plants. *PLoS ONE* **4**: e6556
- Horton P, Nakai K (1997) Better prediction of protein cellular localization sites with the it k nearest neighbors classifier. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **5**: 147–152
- Kaló P, Gleason C, Edwards A, Marsh J, Mitra RM, Hirsch S, Jakab J, Sims S, Long SR, Rogers J, et al (2005) Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* **308**: 1786–1789
- Karimi M, Inzé D, Depicker A (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* **7**: 193–195
- Laloum T, De Mita S, Gamas P, Baudin M, Niebel A (2013) CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many? *Trends Plant Sci* **18**: 157–166

- Lee MH, Kim B, Song SK, Heo JO, Yu NI, Lee SA, Kim M, Kim DG, Sohn SO, Lim CE, et al (2008) Large-scale analysis of the GRAS gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **67**: 659–670
- Liu JX, Howell SH (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
- Liu W, Kohlen W, Lillo A, Op den Camp R, Ivanov S, Hartog M, Limpens E, Jamil M, Smaczniak C, Kaufmann K, et al (2011) Strigolactone biosynthesis in *Medicago truncatula* and rice requires the symbiotic GRAS-type transcription factors NSP1 and NSP2. *Plant Cell* **23**: 3853–3865
- Masiero S, Imbriano C, Ravasio F, Favaro R, Pelucchi N, Gorla MS, Mantovani R, Colombo L, Kater MM (2002) Ternary complex formation between MADS-box transcription factors and the histone fold protein NF-YB. *J Biol Chem* **277**: 26429–26435
- Moreau S, Verdenaud M, Ott T, Letort S, de Billy F, Niebel A, Gouzy J, de Carvalho-Niebel F, Gamas P (2011) Transcription reprogramming during root nodule development in *Medicago truncatula*. *PLoS ONE* **6**: e16463
- Oldroyd GE, Downie JA (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 519–546
- Oldroyd GE, Long SR (2003) Identification and characterization of *nodulation-signaling pathway 2*, a gene of *Medicago truncatula* involved in Nod actor signaling. *Plant Physiol* **131**: 1027–1032
- Oldroyd GE, Murray JD, Poole PS, Downie JA (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet* **45**: 119–144
- Peláez P, Trejo MS, Iñiguez LP, Estrada-Navarrete G, Covarrubias AA, Reyes JL, Sanchez F (2012) Identification and characterization of microRNAs in *Phaseolus vulgaris* by high-throughput sequencing. *BMC Genomics* **13**: 83
- Peltzer Meschini E, Blanco FA, Zanetti ME, Beker MP, Küster H, Pühler A, Aguilar OM (2008) Host genes involved in nodulation preference in common bean (*Phaseolus vulgaris*)-*Rhizobium etli* symbiosis revealed by suppressive subtractive hybridization. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 459–468
- Petroni K, Kumimoto RW, Gnesutta N, Calvenzani V, Fornari M, Tonelli C, Holt BF III, Mantovani R (2012) The promiscuous life of plant NUCLEAR FACTOR Y transcription factors. *Plant Cell* **24**: 4777–4792
- Pysh LD, Wysocka-Diller JW, Camilleri C, Bouchez D, Benfey PN (1999) The GRAS gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J* **18**: 111–119
- Reinhardt A, Hubbard T (1998) Using neural networks for prediction of the subcellular location of proteins. *Nucleic Acids Res* **26**: 2230–2236
- Reynoso MA, Blanco FA, Bailey-Serres J, Crespi M, Zanetti ME (2012) Selective recruitment of mRNAs and miRNAs to polyribosomes in response to rhizobia infection in *Medicago truncatula*. *Plant J* **73**: 289–301
- Rípodas C, Via VD, Aguilar OM, Zanetti ME, Blanco FA (2013) Knock-down of a member of the isoflavone reductase gene family impairs plant growth and nodulation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol Biochem* **68**: 81–89
- Savouré A, Magyar Z, Pierre M, Brown S, Schultze M, Dudits D, Kondorosi A, Kondorosi E (1994) Activation of the cell cycle machinery and the isoflavonoid biosynthesis pathway by active *Rhizobium meliloti* Nod signal molecules in *Medicago microcallus* suspensions. *EMBO J* **13**: 1093–1102
- Smit P, Raedts J, Portyanko V, Debellé F, Gough C, Bisseling T, Geurts R (2005) NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* **308**: 1789–1791
- Soyano T, Kouchi H, Hirota A, Hayashi M (2013) Nodule inception directly targets NF-Y subunit genes to regulate essential processes of root nodule development in *Lotus japonicus*. *PLoS Genet* **9**: e1003352
- Sun X, Jones WT, Rikkerink EHA (2012) GRAS proteins: the versatile roles of intrinsically disordered proteins in plant signalling. *Biochem J* **442**: 1–12
- Tian C, Wan P, Sun S, Li J, Chen M (2004) Genome-wide analysis of the GRAS gene family in rice and *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **54**: 519–532
- Torres-Galea P, Huang LF, Chua NH, Bolle C (2006) The GRAS protein SCL13 is a positive regulator of phytochrome-dependent red light signaling, but can also modulate phytochrome A responses. *Mol Genet Genomics* **276**: 13–30
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* **33**: 949–956
- Yamamoto A, Kagaya Y, Toyoshima R, Kagaya M, Takeda S, Hattori T (2009) *Arabidopsis* NF-YB subunits LEC1 and LEC1-LIKE activate transcription by interacting with seed-specific ABRE-binding factors. *Plant J* **58**: 843–856
- Yang WC, de Blank C, Meskiene I, Hirt H, Bakker J, van Kammen A, Franssen H, 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**: 1415–1426
- Zanetti ME, Blanco FA, Beker MP, Battaglia M, Aguilar OM (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
- Zanetti ME, Chang IF, Gong F, Galbraith DW, Bailey-Serres J (2005) Immunopurification of polyribosomal complexes of *Arabidopsis* for global analysis of gene expression. *Plant Physiol* **138**: 624–635

Annexe 2: Article scientifique

- Auteurs: Rípodas, C., Clua, J., Battaglia, M., **Baudin, M.**, Niebel, A., Zanetti, M.E., and Blanco, F.
- Date de publication: Avril 2014
- Titre: Transcriptional regulators of legume-rhizobia symbiosis: Nuclear Factors Ys and GRAS are two for tango
- Journal: Plant signaling & behavior

Transcriptional regulators of legume-rhizobia symbiosis

Nuclear Factors Ys and GRAS are two for tango

Carolina Rípodas¹, Joaquín Clúa¹, Marina Battaglia^{1,†}, Maël Baudin², Andreas Niebel², María Eugenia Zanetti¹, and Flavio Blanco^{1*}

¹Instituto de Biotecnología y Biología Molecular; Facultad de Ciencias Exactas; Universidad Nacional de La Plata; CCT-La Plata; CONICET; La Plata, Argentina; ²INRA; Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM); UMR441; F-31326; CNRS; Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM); UMR2594; F-31326 Castanet-Tolosan, France

[†]Current address: Departamento de Biología Molecular de Plantas; Instituto de Biotecnología; Universidad Nacional Autónoma de México; Cuernavaca, Morelos, Mexico

Keywords: root development, nitrogen fixation, nodulation, transcription factors, Nuclear Factor Y, legume

Transcription factors are DNA binding proteins that regulate gene expression. The nitrogen fixing symbiosis established between legume plants and soil bacteria is a complex interaction, in which plants need to integrate signals derived from the symbiont and the surrounding environment to initiate the developmental program of nodule organogenesis and the infection process. Several transcription factors that play critical roles in these processes have been reported in the past decade, including proteins of the GRAS and NF-Y families. Recently, we reported the characterization of a new GRAS domain containing-protein that interacts with a member of the C subunit of the NF-Y family, which plays an important role in nodule development and the progression of bacterial infection during the symbiotic interaction. The connection between transcription factors of these families highlights the significance of multimeric complexes in the fabulous capacity of plants to integrate and respond to multiple environmental stimuli.

The interaction between legumes and rhizobia has been the focus of intensive research over the last years. This symbiotic association is responsible for the majority of the nitrogen incorporation into biological systems and has the potential to reduce the chemical fertilization used in agricultural systems. In addition to the economical and social importance of the biological nitrogen fixation, this interaction between a eukaryotic and a prokaryotic organism is a fascinating biological system, in which mutual recognition leads to developmental changes in both symbionts. Low nitrogen availability in the soil, combined with the presence of compatible bacteria, triggers the development of a new root organ, the nodule, where nitrogen

fixation takes place. Rhizobia reach the nodule through a tubular structure called the infection thread, where bacteria progress toward the cortical cells. These two genetic programs -nodule organogenesis and infection- are independent but strongly coordinated.¹ Attempts to decipher the mechanisms underlying the mutualistic symbiosis between legume plants and rhizobia have resulted in the identification of a significant number of transcription factors that are required for nodulation, helping to understand the exquisite complexity of the plant response to nitrogen availability. In this work, we will briefly review the transcription factors already described in the genetic programs that are involved in the infection and nodule organogenesis, with emphasis in the recent discovery of a new GRAS regulator that participates in both, nitrogen-fixing symbiosis and lateral root growth.²

Transcriptional Regulators Involved in Symbiosis

Signal molecules secreted by rhizobia (like an oligopolysaccharide called Nod Factor) can activate a signal transduction pathway that ultimately results in the activation of transcription factors in the nuclei of epidermal and cortical cells. These regulatory proteins recognize and bind to specific sequences of DNA located in the promoter of certain genes, controlling gene activity in response to environmental cues. Based on sequence similarity and the characteristics of their DNA-binding motifs, transcription factors have been classified into different families, which generally are conserved among eukaryotic organisms. Even though several transcription factors were identified by their capacity to bind to nodulin promoters, the most significant advances have arisen from genetic approaches by positional cloning of genes whose mutation altered infection or nodule development. The first transcription factor cloned in this way was *NODULE INCEPTION (NIN)*.³ Other genes, such as *Astray*,⁴ *Ethylene Response Factor Required for Nodulation 1 (ERN1)* and *ERN2*,^{5,6} *RRI*,⁷ *CYCLOPS*,⁸ *Nodulation Signaling Pathway 1 (NSP1)* and *NSP2*,^{9,10} *Nuclear Factor Y (NF-Y) A1* (formerly *MtHap2-1*)¹¹ and *NF-YC1*¹² were later added to the list (Fig. 1). The last ones belong to the GRAS

*Correspondence to: Flavio A Blanco; Email: fablanco@biol.unlp.edu.ar
Submitted: 03/19/2014; Revised: 04/09/2014; Accepted: 04/10/2014;
Published Online: 04/15/2014
Citation: Rípodas C, Clúa J, Battaglia M, Baudin M, Niebel A, Zanetti ME, Blanco F. Transcriptional regulators of legume-rhizobia symbiosis: Nuclear Factors Ys and GRAS are two for tango. *Plant Signaling & Behavior* 2014; 9:e28847; PMID: 24736593; <http://dx.doi.org/10.4161/psb.28847>

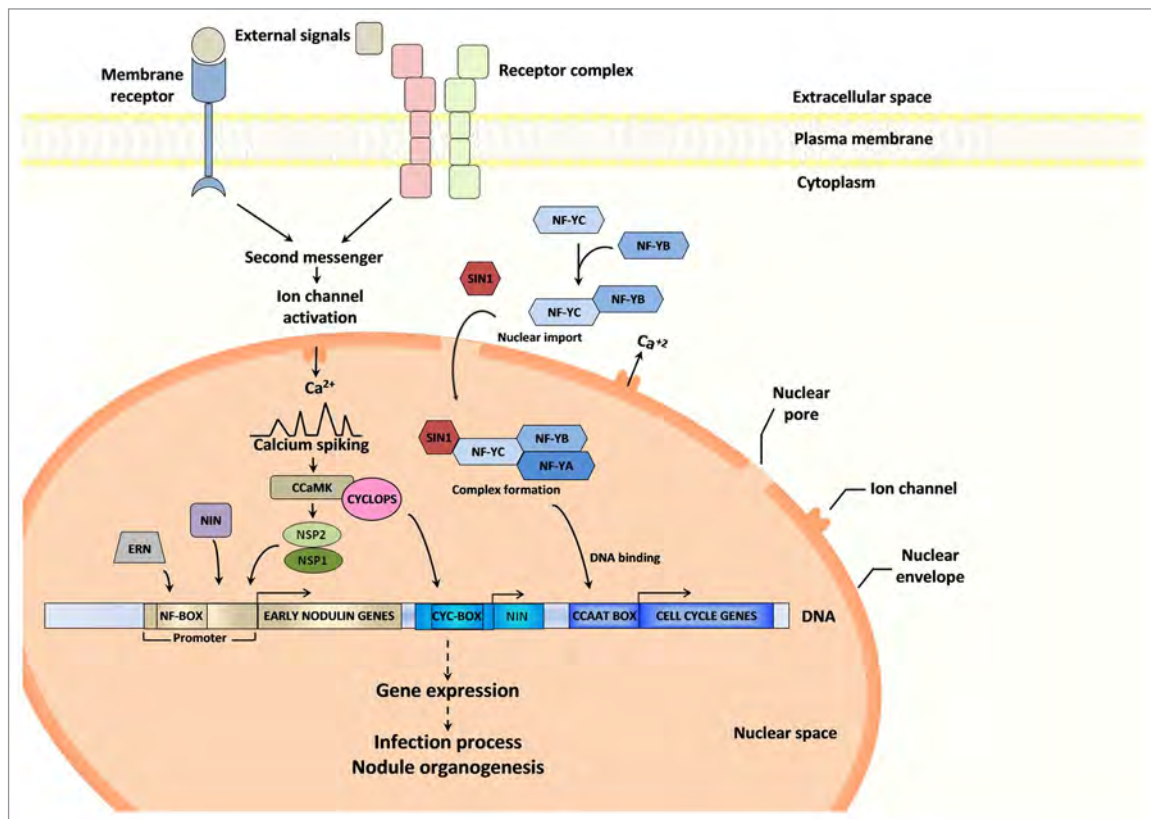


Figure 1. Transcription factors involved in nodulation. The nodulation signaling pathway is triggered when receptors located in the plasma membrane sense rhizobia derived signals. Upon receptor activation, oscillations of calcium concentration (calcium spiking) are produced in and around the nucleus. A nuclear located calcium and calmodulin dependent protein kinase (CCaMK) has been proposed as the protein that deciphers the calcium signal. Downstream from CcAMK, several transcriptional regulators are required for symbiosis establishment. CYCLOPS interacts and is phosphorylated by CcAMK, activating its capacity to recognize the *NIN* promoter. Nodulation signaling 1 (NSP1) and NSP2 both encode GRAS transcription factors that are essential for nodulation and activate the expression of early nodulation genes (nodulins). NIN and ERN are also involved in the transcriptional regulation of nodulins. Members of the NF-Y gene family are also required for nodulation. NF-YB would interact with NF-YC subunit in the cytoplasm prior to the nuclear import of the heterodimer. Once inside the nucleus, they interact with NF-YA to form the functional heterotrimer that binds with high affinity to CCAAT elements. SIN1 (a member of the GRAS family) physically interacts with the C subunit of the NF-Y transcription factor in the nucleus. This putative multimeric complex participates, directly or indirectly, in the transcriptional control of cell cycle genes.

(*NSP1* and *NSP2*) and NF-Y (*NF-YA* and *NF-YC*) families of transcriptional regulators.

NF-Y Transcriptional Regulators Involved in Symbiosis

NF-Ys are heterotrimeric complexes that bind to CCAAT boxes. They are composed by the NF-YA, NF-YB and NF-YC subunits. Whereas each subunit of NF-Y is encoded by one or two members in yeasts and mammals, these gene families have several members in plants. It is an open question whether this expansion has resulted in a functional diversification to cope with plant-specific responses. Individual NF-Y subunits have been shown to be involved in multiple developmental events and/or responses to environmental cues. In legumes, members of each subunit of NF-Y genes families have been implicated in the development of indeterminate (*MtNF-YA1* in *Medicago truncatula*) and determinate nodules (*LjNF-YA1* in *Lotus japonicus* and *PvNF-YC1* in *Phaseolus vulgaris*). *MtNF-YA1* was characterized as a symbiosis-specific transcription factor

that plays a key role during nodule development by controlling meristem persistence.¹¹ *MtNF-YA1* gene expression is restricted to the meristematic zone of indeterminate nodules by a regulatory mechanism of mRNA decay involving miRNA169 at early stages of symbiosis. More recently, it was shown that expression of *MtNF-YA1* is strongly upregulated during early stages of the symbiotic interaction, particularly in the root hairs of the infection zone. Moreover, mutant plants carrying a premature stop codon in the *MtNF-YA1* gene form aberrant (i.e., thick and branched) infection threads that fail to progress to the cortical cells.¹³ On the other hand, Soyano et al. described that knockdown of *LjNF-YA1* inhibited root nodule organogenesis, but not the infection process in *L. japonicus*.¹⁴ This report also showed that NIN is a direct regulator of the *LjNF-YA1* and *LjNF-YB1* genes. Interestingly, a recent report has shown that CYCLOPS is phosphorylated by the protein kinase CcAMK, exposing its DNA binding domain. In this conformation, CYCLOPS can recognize and bind to a specific region in the *NIN* promoter, initiating a transcriptional cascade that involves NF-YA1 and leads to nodule organogenesis.⁸

Reverse genetic studies performed in common bean (*P. vulgaris*) revealed that the NF-YC1 subunit is required for nodule organogenesis and rhizobial infection.^{12,15} Overexpression of NF-YC1 was sufficient to improve nodulation efficiency of a relatively poor competitive rhizobium strain, possibly through activation of the G2/M transition cell cycle genes.¹²

The number of genes that encodes for each subunit of the NF-Y complex in plants results in a wide number of potential trimeric complexes (1690 in *Arabidopsis*).¹⁶ In addition, NF-Y complexes or individual subunits have been shown to associate with other transcriptional regulators, like SIN1 or transcription factors of the bZIP¹⁷ or MAD box families,¹⁸ further expanding the number of putative multimeric complexes that can be formed. This modular system provides an amazing versatility for the plant to integrate developmental programs with different environmental stimuli.

GRAS-Domain Transcription Factors and Their Roles in Symbiosis

The GRAS-type transcription factors constitute an important family of plant-specific proteins, whose initials come from the three members initially identified: Gibberellic-ACID INSENSITIVE (GAI), repressor of GAI (RGA) and SCARECROW (SCR).¹⁹ They play different roles in the development of stem and root, in the gibberellic acid signaling and in the signal transduction pathways of phytochromes A and B.²⁰ In *M. truncatula* and *L. japonicus*, two proteins of this family, NSP1 and NSP2, were shown to be required for nodulation. They mediate different Nod Factor induced responses, such as root hair deformation, infection thread formation, cortical cell divisions and expression of nodulation genes known as nodulins.^{9,10,21} Interestingly, NSP1 and NSP2 can form homo- and hetero- dimers and associate to promoters of early induced nodulins.²² The complex formed by NSP1 and NSP2 can enhance the action of ERN on the transcriptional activity of the early nodulin 11 (*ENOD11*) during the progression of rhizobia infection.⁶ Both proteins are also involved in mycorrhization, a symbiotic interaction with fungi that is present in the majority of land plants.²³ More recently, another GRAS protein, called RAM1 (Required for Arbuscular Mycorrhization 1), was shown to play a specific role in the formation of arbuscular mycorrhiza through its interaction with NSP2.²⁴

A New Connection Between GRAS and NF-Ys

In a recent work, we identified a new GRAS-domain containing protein, named Scarecrow like 13 (SCL13) Involved in Nodulation (SIN1), which physically interacts with the C subunit of the NF-Y complex from common bean.² The GRAS family has been divided into eight subfamilies. Unlike NSP1 and NSP2, which belongs to the SHORT ROOT (SHR) and HAIRY MERISTEM (HAM) subfamilies, respectively, SIN1 is part of the PAT1 subfamily and highly similar to *Arabidopsis* SCL13. Both *in yeast* and *in planta* experiments have established that the NF-YC1 subunit physically interacts with SIN1. *SIN1* is expressed in aerial and root tissues, reaching higher levels in

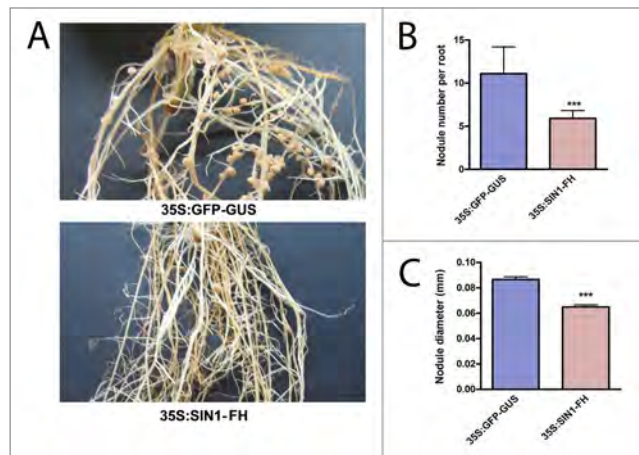


Figure 2. Overexpression of SIN1 resulted in the reduction of the number and size of root nodules. (A) Representative pictures illustrating the reduced nodule density and size found in 35S:SIN1-FH (FLAG-HIS) roots (upper panel) as compared with the control roots 35S:GFP-GUS (lower panel) at 17 dpi with *R. etli*. The complete open reading frame of SIN1 was cloned in the p35S:FH vector.²⁸ Nodule number per root (B) and nodule size (C) developed in 35S:GFP-GUS or 35S:SIN1-FH roots at 17 dpi with *R. etli*. Error bars represent the SEM. Asterisks indicate significant differences with the control in an unpaired two-tailed *t* test with $P < 0.001$.

roots and mature nodules. Post-transcriptional gene silencing of *SIN1* using RNA interference (RNAi) showed that the product of this gene plays a critical role in lateral root elongation and the establishment of successful symbiosis between *P. vulgaris* and *Rhizobium etli*.² The symbiotic phenotype was similar to that observed in *NF-YC1* silenced root, but the effect on nodule development and infection thread progression was comparatively milder.^{12,15} Interestingly, *SIN1* silenced roots failed to upregulate mRNA levels of G2/M cell cycle genes and NF-YA1 in response to rhizobia infection. This suggests that SIN1 can act through its interaction with the NF-Y complex, but also might have a positive feedback on NF-Y gene regulation during nodule formation.

In addition to its role in nodulation, SIN1 showed to play a role during the elongation of lateral roots. This transcription factor with a dual role is an interesting connection between the developmental programs of two root organs, nodules and lateral roots. When *LjNF-YA1* was overexpressed, the tips of lateral roots showed malformations, an effect that was enhanced by the co-expression with *LjNF-YBI*.¹⁴ This phenotype was accompanied by an increment of cell division in non-meristematic tissue, suggesting that the A1 and B1 subunits of *LjNF-Y* can modulate the activity of cell cycle genes. It would be interesting to explore the possible connections between NF-Y and GRAS transcription factors with the auxin/cytokinin balance, which are critical to initiate both lateral roots and nodules.^{25,26,27}

Overexpression of SIN1 Affects Nodulation in Common Bean

As a complementary strategy to the post-transcriptional silencing, a fusion of *SIN1* with the FLAG and HIS tags was

ectopically expressed under the control of the CaMV 35S promoter. The nodulation phenotype of transformed roots was compared with control plants transformed with the plasmid p35S:GFP:GUS (Fig. 2A). Unexpectedly, plants overexpressing *SINI* showed a reduced number of nodules per root as compared with control plants (Fig. 2B). Overexpression of *SINI* also affected the diameter of the nodules (Fig. 2C), producing a growth impair similar to that observed in RNAi roots. These results support the role of SIN1 in the nodulation process, specifically in the nodule organogenesis, and suggest that a fine-tuned balance between individual components of the same transcriptional complex is critical to maintain its function.

Concluding Remarks and Perspectives

The fact that plants of *P. vulgaris* with reduced or ectopic expression of *SINI* exhibited a significant reduction in the number and size of nodules formed by rhizobia raises the hypothesis that fine-tuned levels of SIN1 are required for an efficient performance of NF-YC1. NF-YC1 controls, directly or indirectly, the expression of G2/M transition cell cycle genes.¹² SIN1 is also required for upregulation of these cell cycle genes in response to rhizobia.² A key question is whether the complex formed by SIN1 and NF-YC1 can bind to promoters of these genes to regulate cell proliferation during nodule formation. Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

experiments followed by high throughput sequencing of isolated DNA fragments would certainly help to reveal downstream genes controlled by this complex during the interaction of legume roots with nitrogen fixing bacteria.

In addition to the role described in the plant response during symbiosis, SIN1 is also involved in lateral root elongation, suggesting that this is a shared component of two different root developmental programs. On the other hand, as previously mentioned, NF-Y subunits also have been implicated in these two developmental processes. It will be interesting to characterize at global scale the overlapping transcriptional networks governed by GRAS and NF-Y proteins during lateral root and nodule formation.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

This work was financially supported by grants from ANPCyT, Argentina (PICT 2008/0443 and 2010/2431) and by the ANR-09-BLAN-0033-01 HAPIHUB project. AN and MBaudin are part of 'Laboratoire d'Excellence' (LABEX) entitled TULIP (ANR-10-LABX-41). CR, JC, OMA, MEZ and FAB are funded by CONICET. MBaudin is funded by an INRA CJS (Contrat Jeune Scientifique) contract.

References

- Oldroyd GE, Downie JA. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* 2008; 59:519-46; PMID:18444906; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>
- Battaglia M, et al. The NF-YC1 interacting protein SIN1, a member of the GRAS family, is required for nodule organogenesis, infection thread progression and lateral root growth. *Plant Physiol* 2014; 164:1430-42; PMID:24424321; <http://dx.doi.org/10.1104/pp.113.230896>
- Schauser L, Roussis A, Stiller J, Stougaard J. A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* 1999; 402:191-5; PMID:10647012; <http://dx.doi.org/10.1038/46058>
- Nishimura R, Ohmori M, Kawaguchi M. The novel symbiotic phenotype of enhanced-nodulating mutant of *Lotus japonicus*: astray mutant is an early nodulating mutant with wider nodulation zone. *Plant Cell Physiol* 2002; 43:853-9; PMID:12198187; <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcf098>
- Middleton PH, Jakab J, Penmettsa RV, Starker CG, Doll J, Kaló P, Prabhu R, Marsh JF, Mitra RM, Kereszt A, et al. An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for Nod factor signal transduction. *Plant Cell* 2007; 19:1221-34; PMID:17449807; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.106.048264>
- Cerri MR, Frances L, Laloum T, Auric MC, Niebel A, Oldroyd GE, Barker DG, Fournier J, de Carvalho-Niebel F. *Medicago truncatula* ERN transcription factors: regulatory interplay with NSP1/NSP2 GRAS factors and expression dynamics throughout rhizobial infection. *Plant Physiol* 2012; 160:2155-72; PMID:23077241; <http://dx.doi.org/10.1104/pp.112.203190>
- Plet J, Wasson A, Ariel F, Le Signor C, Baker D, Mathesius U, Crespi M, Frugier F. MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant J* 2011; 65:622-33; PMID:21244535; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04447.x>
- Singh S, Katzer K, Lambert J, Cerri M, Parniske M. CYCLOPS, a DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development. *Cell Host Microbe* 2014; 15:139-52; PMID:24528861; <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.011>
- Kaló P, Gleason C, Edwards A, Marsh J, Mitra RM, Hirsch S, Jakab J, Sims S, Long SR, Rogers J, et al. Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* 2005; 308:1786-9; PMID:15961668; <http://dx.doi.org/10.1126/science.11110951>
- Smit P, Raedts J, Portyanko V, Debelle F, Gough C, Bisseling T, Geurts R. NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* 2005; 308:1789-91; PMID:15961669; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1111025>
- Combiér JP, Frugier F, de Billy F, Boualem A, El-Yahyaoui F, Moreau S, Vernié T, Ott T, Gamas P, Crespi M, et al. MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes Dev* 2006; 20:3084-8; PMID:17114582; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.402806>
- Zanetti ME, Blanco FA, Beker MP, Battaglia M, Aguilar OM. 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* 2010; 22:4142-57; PMID:21139064; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.110.079137>
- Laporte P, Lepage A, Fournier J, Catrice O, Moreau S, Jardinaud MF, Mun JH, Larrainzar E, Cook DR, Gamas P, et al. The CCAAT box-binding transcription factor NF-YA1 controls rhizobial infection. *J Exp Bot* 2014; 65:481-94; PMID:24319255; <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ert392>
- Soyano T, Kouchi H, Hirota A, Hayashi M. Nodule inception directly targets NF-Y subunit genes to regulate essential processes of root nodule development in *Lotus japonicus*. *PLoS Genet* 2013; 9:e1003352; PMID:23555278; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1003352>
- Mazziotta L, Reynoso MA, Aguilar OM, Blanco FA, Zanetti ME. Transcriptional and functional variation of NF-YC1 in genetically diverse accessions of *Phaseolus vulgaris* during the symbiotic association with *Rhizobium etli*. *Plant Biol (Stuttg)* 2013; 15:808-18; PMID:23126265; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00683.x>
- Laloum T, De Mita S, Gamas P, Baudin M, Niebel A. CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many? *Trends Plant Sci* 2013; 18:157-66; PMID:22939172; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2012.07.004>
- Liu JX, Howell SH. 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* 2010; 22:782-96; PMID:20207753; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.109.072173>
- Masiero S, Imbriano C, Ravasio F, Favaro R, Pelucchi N, Gorla MS, Mantovani R, Colombo L, Kater MM. Ternary complex formation between MADS-box transcription factors and the histone fold protein NF-YB. *J Biol Chem* 2002; 277:26429-35; PMID:11971906; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M202546200>

19. Pysh LD, Wysocka-Diller JW, Camilleri C, Bouchez D, Benfey PN. The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J* 1999; 18:111-9; PMID:10341448; <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00431.x>
20. Bolle C. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* 2004; 218:683-92; PMID:14760535; <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-004-1203-z>
21. Heckmann AB, Lombardo F, Miwa H, Perry JA, Bunnewell S, Parniske M, Wang TL, Downie JA. *Lotus japonicus* nodulation requires two GRAS domain regulators, one of which is functionally conserved in a non-legume. *Plant Physiol* 2006; 142:1739-50; PMID:17071642; <http://dx.doi.org/10.1104/pp.106.089508>
22. Hirsch S, Kim J, Muñoz A, Heckmann AB, Downie JA, Oldroyd GE. GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 2009; 21:545-57; PMID:19252081; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.108.064501>
23. Liu W, Kohlen W, Lillo A, Op den Camp R, Ivanov S, Hartog M, Limpens E, Jamil M, Smaczniak C, Kaufmann K, et al. Strigolactone biosynthesis in *Medicago truncatula* and rice requires the symbiotic GRAS-type transcription factors NSP1 and NSP2. *Plant Cell* 2011; 23:3853-65; PMID:22039214; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.111.089771>
24. Gobbato E, Marsh JF, Vernié T, Wang E, Mailler F, Kim J, Miller JB, Sun J, Bano SA, Ratet P, et al. A GRAS-type transcription factor with a specific function in mycorrhizal signaling. *Curr Biol* 2012; 22:2236-41; PMID:23122845; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.09.044>
25. Mathesius U. Goldacre paper: Auxin: at the root of nodule development? *Funct Plant Biol* 2008; 35:651-68; <http://dx.doi.org/10.1071/FP08177>
26. Lavenus J, Goh T, Roberts I, Guyomarç'h S, Lucas M, De Smet I, Fukaki H, Beeckman T, Bennett M, Laplaze L. Lateral root development in Arabidopsis: fifty shades of auxin. *Trends Plant Sci* 2013; 18:450-8; PMID:23701908; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.04.006>
27. Oldroyd GE, Murray JD, Poole PS, Downie JA. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet* 2011; 45:119-44; PMID:21838550; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549>
28. Zanetti ME, Chang IF, Gong F, Galbraith DW, Bailey-Serres J. Immunopurification of polyribosomal complexes of Arabidopsis for global analysis of gene expression. *Plant Physiol* 2005; 138:624-35; PMID:15955926; <http://dx.doi.org/10.1104/pp.105.059477>

Annexe 3 Extraction d'ARN et synthèse de cDNA

**Extraction
ARN (kit
Macherey-
Nagel)**

1. Prélever le matériel dont on veut extraire l'ARN. Dans le cas de nombreux échantillons et/ou de peu de matériel disponible, utiliser des tube de 2mL + 3 billes verres et broyer au broyeur à billes au froid (support à -80°C et échantillons dans l'azote liquide) 2 x 30 sec à 30 bps. Sinon broyer au mortier (beaucoup de matériel et peu d'échantillons).

Note : Avant de commencer, il est conseillé de préparer 1 NucleoSpin Filter (colonne violette) avec un collection tube + 1 tube de 2mL RNase free avec 450µL d'EtOH 70% et un NucleoSpin RNA II Column (colonne bleue) par échantillons.

2. Lyse : ajout d'un mélange de 450uL de buffer RA1 + 4.5uL de B-mercaptoethanol, faire éventuellement un pré-mix (sous hotte en salle des produits chimiques) et vortexer vigoureusement (10-15 sec) le temps que toute la poudre se mélange.

Note : Dans le cas d'échantillons broyés au mortier, déposer ~0.3mL de poudre dans un tube de 2mL RNase free.

3. Filtration lysat : Mettre le NucleoSpin Filter dans un « collection tube » de 2mL, et transvaser le contenu des tubes vortexés dans le « NucleoSpin Filter » pour retirer les plus gros débris.

4. Centrifugation 1min à 11 000g puis jeter le NucleoSpin Filter, les ARN se trouve dans le collection tube.

5. Transférer le contenu du collection tube dans le tube de 2mL avec 450mL de d'EtOH et mélanger en faisant des allers et venus avec la pipette.

6. Charger le lysat + EtOH dans la NucleoSpin RNA II Column en 2 fois car le volume est trop grand puis centrifugation 30sec 11000rpm

7. Ajout de 350uL MDB (Membrane Desalting Buffer) et centrifugation 1 min 11000rpm

8. Lavage : Ajouter 200uL de RA2 Buffer dans la colonne puis centrifuger 30sec 11000rpm

9. Ajouter 600uL de RA3 Buffer puis centrifuger 30sec à 11000rpm, vider le collection tube et recommencer avec 250uL de Buffer RA3 puis centrifuger 2min à 11000rpm

10. Placer la colonne dans un tube stérile de 1.5mL RNase free et éluer les ARN dans 50µL RNase-free H₂O (boîte chez les YM) et attendre au moins une minute puis centrifugation 1min à 11000rpm → glace ou congélo à -80°C

**Traitement
DNase(kit
Ambion)**

Note : Uniquement si on n'a pas fait le traitement du kit Macherey-Nagel.

1. Ajouter 0,1 volume (5µL pour 50 µL d'ARN) de tampon 10x de Turbo DNase Buffer et mélanger doucement, ajouter ensuite 1µL de DNase turbo, mélanger doucement.
2. Incuber 20 à 30 min au bain marie à 37°C
3. Tapoter le tube de DNase inactivation reagent pour resuspendre la solution. Ajouter 0,1 volume de solution d'inactivation resuspendu et bien mélanger
4. Incuber 2min à température ambiante en retournant le tube pour bien mélanger
5. Centrifuger à vitesse max pendant 2min, prélever le surnageant et le transférer dans un tube nase free frais.

**Dosage et
contrôle de
la qualité des
ARN**

Note : Pour cette étape, il est conseillé de prélever 3µL d'ARN de chaque échantillon et de le déposer dans un tube de 0.5mL RNase free. Cela servira à la fois pour le dosage au nanodrop et l'Agilent. Placer le reste des ARN à -80°C en attendant.

1. Doser les ARN au nanodrop (LRSV) mot de passe LIPM_PG.
2. Agilent : réserver l'appareil (~2H / puce) et rassembler le matériel : puce RNA NanoChip, le kit Agilent (gel + dye) stocker à 4°C et à sortir au moins 30min avant la manip et le

marqueur de taille (aliquote à -80).

3. Préparation du Gel : mettre 550 μ L de RNA 6000 Nano gel matrix (bouchon rouge) sur la colonne « spin filter », centrifuger 10min à 1500g, jeter la colonne dans le bidon déchet solide. Aliquoter le filtrat par 65 μ L dans des tubes de 1,5mL RNase free. Stocker à 4°C et utiliser dans le mois.

Note : il est possible que cela soit déjà fait, il suffit donc de l'utiliser

4. Vortexer le RNA 6000 Nano dye (bouchon bleu) pendant 10sec et centrifuger (quick spin). Ajouter 1 μ L de dye au 65 μ L de gel filtré. Vortexer et observer une bonne homogénéisation dye. Centrifuger la préparation pendant 10min à 13 000g.

Note : le Dye est dans du DMSO (gants) et est sensible à la lumière donc le protéger dans du papier alu par exemple.

5. Dénaturer ces échantillons et le marqueur de taille (si ce n'est pas déjà fait) à 70°C pendant 2min et les placer immédiatement dans la glace après.

6. Décontaminer les électrodes avec les electrode cleaner (puce blanches). Premièrement remplir la première avec 350 μ L de RNaseZAP, la placer dans le bioanalyseur et fermer doucement le couvercle, laisser agir 1min. Ensuite remplir la puce eau avec 450 μ L d'H₂O RNase free et la placer dans le bioanalyseur pendant 30sec. Laisser ensuite sécher les électrodes.

7. Sur la puce RNA nano chip, déposer 9 μ L de gel + dye dans le puit G (noir). Placer la puce sur son support et régler la seringue sur 1mL. Mettre la pression jusqu'au premier cran et attendre 1min. relacher ensuite doucement la pression puis aider la seringue à revenir sur 1mL. Remettre 9 μ L dans les

deux autre puis G. Distribuer 5 μ L de matrice (bouchon vert) dans chacun des puits (1 à 12) et dans le puits échelle). Déposer ensuite 1 μ L d'échantillon dénaturé dans chacun des puits et 1 μ L de marqueur de taille dans le puits echelle. Enfin vortexer la puce 30 sec a 2400tours/min. Placer la puce dans le bio-analyseur et lancer le programme adéquat.

**Synthèse de
cDNA**

(RT roche)

1. Ajuster la concentration des ARN (1 μ g) dans 25.5 μ L total
2. Ajouter 2 μ L d'amorce oligo dT(17)V à 50 μ M par échantillon
3. Dénaturer le mix 15min a 65°C et mettre immédiatement sur glace
4. Ajouter 0,5 μ L d'enzyme, 2 μ L, 4 μ L de dNTP a 10mM, 8 μ L de tampon 5X
5. Dans le thermocycleur, lancer le programme RT roche (55°C pendant 40minutes et 85°C pendant 5minutes.
6. Mettre les échantillons sur galce
7. Eventuellement ajouter de la RNAsine

Annexe 4: Bimolecular Fluorescence Complementation

1 Cloning

BiFC vectors from Giles Oldroyd :

pGPTVII.Hyg.GW-YC

pGPTVII.Hyg.YC-GW

pGPTVII.Bar.GW-YN

pGPTVII.Bar.YN-GW

- 1- Clone your candidate in a gateway donor vector (pK207) with AttL1 and AttL2 with and without stop codon for the two types of fusion.
- 2- Performed the LR recombination in each BiFC vectors.
- 3- Transform E.coli dH5 α with this construct
- 4- Check colonies by PCR using 35S Forward primer and specific reverse primer in your gene
- 5- Extract plasmid from positive clone and check the sequence with 35SF
- 6- Transform the plasmid in *A. tumefaciens* GV3101
- 7- Check the clone by PCR (same primers)

2 Agro-infiltration

Agromix solution:

	Final concentration	Stock solutions	100ml
MgCl ₂	10 mM	1M	1mL
MES/KOH pH5.6	10mM	1M	1mL
Acetosyringone in DMSO (catalog no. D13440-6, Sigma-Aldrich)	150 μ M	0.5M aliquoted at 20°C (about 100mg/mL DMSO)	30 μ L

- 1- **Plate** your Agro from glycerol stock at least 4 days before the infiltration (for example Friday), don't forget the P19 (silencing suppressor).
- 2- **1 day** before the infection (for example Monday) Agro strains are inoculated in LB medium and grown for 24h at 28°C under ATB selection (genta (15mg/ml) + kana (50mg/ml) for BiFC vector, Kana for P19 and genta Carbe for pampat). 25ml in 100ml erlens
- 3- **Tuesday** Bacteria cultures (25ml in 50 ml falcon tubes) are centrifuged at 5500 rpm for 10 min, and respective pellets are resuspended in 5ml of Agromix

- 4- **Incubation** of bacteria in agromix at room temperature for at least 2 hours. Take the OD using 20 μ L of suspension for 980 μ L of Agromix) Adjust the suspensions to 1OD in about 10mL. Prepare the combinations (for example: P19+vector 1+vector2+ vector 3) by mixing equal volumes of each Agro cultures to obtain a final OD of 0.25/construct. (follow the .xlsx)
- 5- **Tuesday** afternoon Infiltration into leaves of 3 week-old *N.bentamiana* plants is done using a 1 ml needless syringe (first make some holes with needle) 2 plants/combinations and 2 leaves(3 and 4)/plants.
- 6- *N. bentamiana* are store in culture room for 2 days
- 7- **First observation** Thursday afternoon (about 5 PM) Cut one big disk in the leave 4 and 1 smaller disk in leave 3. Make water infiltration using depression (in syringe) Put the 2 disk between slides in water.
- 8- **Second observation** on Friday morning

3 Microscopique observations

Physic: Close

Device status:close

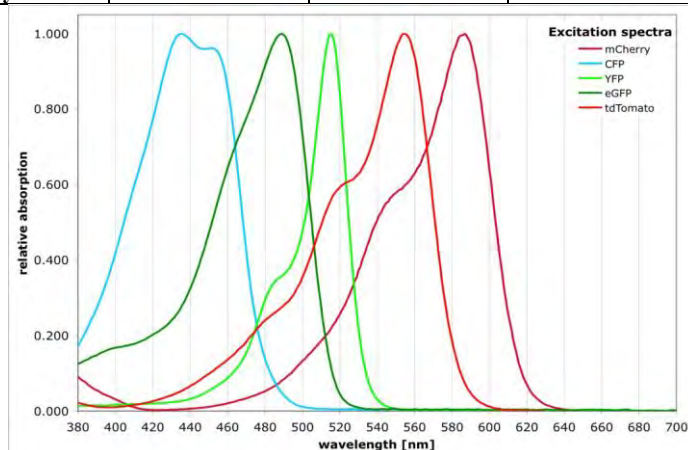
Once Metavue is opened:

Acquire \rightarrow aquire

-Journal-Taskbars-load taskbar

-Devices-configure illumination-restore-data LIPM-ouvrir

	<u>excitati</u> <u>on</u>	<u>emissio</u> <u>n</u>		<u>filter</u> <u>loupe</u>	<u>filter</u> <u>Mo</u>
GFP	395/475	509	green	GFP3	44
YFP	514	527	yellow		42
CFP	439	476	cyan		42
DsRED	558	583	red	B	
mcherr					
y	587	610	red	"autre"	15



Take 1 picture 1 bright field and 1 in fluorescence without moving the field for each slide.

Post treatments in Image J:

1. Open your picture
2. Convert in Tiff 8bit : Image→type→8-bit
3. Adjust brightness/contrast: Image→Adjust→ brightness/contrast
4. Merge picture: Image→Color→Merge channels→ green layer = fluorescence picture
gray layer = BF picture. → Keep the original pictures.
5. Save all your picture and export the Merge in jpg

Annexe 5: Western Blot

1. Préparation des échantillons

- Equilibrer le poids des échantillons (1 disque)
- Broyer dans l'azote avec broyeur à bille si beaucoup d'échantillons ou dans le tampon avec un pilon.
- Ajouter du tampon Laemli 2x (150µL pour un disque de 1cm de diamètre) → Conserver les échantillons dans la glace.
- Quand tous les échantillons sont prêts : Dénaturer les prot à 95°C pendant 3min : conserver à température ambiante pour que le SDS ne précipite pas.
- Avant le dépôt : une centri à max speed pendant 5min.
- Possibilité de conserver les extraits de prot a -20°C (avant réutilisation porter à 95°C quelques secondes et centri)

2. Préparation des Gels

- Monter les supports de gels (attention à la régularité des bords en contact avec le tampon)
- Préparer en parallèle les 2 solutions (**SANS LES POLYMERISATEURS**) recette pour 1gel :

	Resolving 10%	Stacking	Remarques
Mix Gel 10%	5	-	
Mix Stacking	-	2.5	
Acrylamide/Bisacrylamide 30%	2.5	0.5	salle des produit chimique (sous la sorbonne ou au frigo)
APS 20%	0.075	0.03	Polymérisateur
TEMED	0.0025	0.00325	(Ajouter juste avant de couler !)

- Couler le resolving 10% en premier (ajouter au dernier moment les polymérisateurs) sur environ 80% du gel (±. 7mL) sans faire de bulles
- Ajouter 1 mL d'eau + bleu de bromophénol (pour isoler le gel de l'air et obtenir une surface bien plane)
- Attendre 15-20 min incliner le support pour vérifier la polymérisation
- Retirer l'eau et enlever le surplus avec un papier Watman.
- Couler le stacking (ajouter au dernier moment les polymérisateurs) en prenant garde à ne pas faire de bulles notamment entre les peignes
- Pendant la polymérisation faire attention au niveau qui a tendance à baisser, ne pas hésiter à en rajouter.
- Attendre 15-20min (vérifier la polymérisation du surplus dans le bécher)

- Enlever le système de son support puis retirer délicatement le peigne (éventuellement sous l'eau pour ne pas collapser les puits)

3. Migration

- Disposer les gels dans la cuve de migration avec du TGS 1x (Biorad)
- Nettoyer délicatement les puits avec une pipette ou seringue par aspiration refoulement
- Charger les puits (10 μ L pour les échantillons et 5 μ L pour le protein ladder) Charger les puits vide avec 10 μ L de Laemli 2x
- Faire migrer à 80V +/- 20min jusqu'à l'entrée dans le resolving (séparation du marqueur)
- Puis migrer à 100-120V jusqu'à amener le front de migration au bas du gel (+/- 3H)
- petit trick argentin : faire migrer à ampère constant à 25mA/gel (augmentation du voltage auto)

4. Transfert

Tampon de transfert	20x (1L)	1x (2L)
Tris	116,4 g	100mL de 20x 400mL d'EtOH 96% 1500mL H2O
Glycine	58,6 g	
SDS 20%	37,5 mL	
H2O distillée	Qsp 1L	

- Sortir les gels du tampon de migration, soulever la plaque de verre (sans la casser, à l'aide d'un scalpel par exemple)
- Retirer le stacking
- Mettre les gels dans le tampon de transfert pour les équilibrer
- En parallèle découper 2 morceaux de papier watman et un morceau de membrane de nitrocellulose de la taille du gel (**PORTER DES GANTS POUR MANIPULER LA MEMBRANE !!**).
- Imbiber les watman dans du tampon de transfert
- Laisser la membrane quelques minutes dans l'eau avant de la mettre dans le tampon de transfert aussi.
- Réaliser un sandwich en suivant le schéma suivant :

- Les protéines sont uniformément chargées négativement par le SDS et vont migrer du gel vers l'électrode + et s'imprimer sur la membrane.
- Prendre garde à ne pas faire de bulles, spécialement entre la membrane et le gel
- Réaliser le transfert pendant 1H sous 100-120V (entre 200 et 250 mA) dans du tampon de transfert avec un glaçon (ou la cuve dans la glace)
- Défaire le sandwich, si la migration s'est bien passée, le marqueur est imprimé sur la membrane.
- Tremper la membrane quelques secondes dans le rouge ponceau.
- Décolorer légèrement la membrane à l'eau pour qu'uniquement les protéines soient colorées
- Scanner entre deux feuilles transparentes (pochette plastique A4 découpé)

5. Blocage et Incubation Ac primaires

TBS-Tween	10x (1L)	1x (500mL)
Tris HCl pH 7,5 10mM	Qsp 1L	50mL
NaCl	8,7 g (150mM)	
Tween	-	500µL
H2O distillée	-	Qsp 500mL

- Laisser la membrane dans du TBS-T + 5% de lait (poudre écrémé) sous agitation à RT pendant au moins 1H (possible en ON à 4°C)
- Sans rincer la membrane, l'incuber avec les anticorps primaires dilué dans 10 ou 15 mL de TBS-T (dilution en fonction de l'anticorps utilisé (1/2000 à 1/15000) laisser sous agitation en ON à 4°C ou 3 H à 25°C.

6. Rinçage et révélation

- Rincer 4x5-10min avec du TBS-T sous agitation à RT
- Incuber avec les Ac secondaires (si nécessaire) dans du TBS-T 1h30 à RT
- Faire la révélation au G box
- Mélanger volume à volume les 2 réactifs (frigo chez laurent)
- Les disposer sur la membrane et lancer immédiatement l'acquisition (5 images par intervalle de 30sec cumulatif) puis si nécessaire un temps plus long (signal faible)
- Ne pas oublier de faire une image en BF.

Annexe 6: Co-Immunopurification

- Cross-link**
1. Harvest leaves at 1–3 days post agroinfiltration. Cut leaf material off. Weigh out 1 g (~10x1cm disk) of tissue for each combination and place in a tube with 0.1% formaldehyde under vacuum during 15min a room temperature.
 2. Add Glycine solution to a final concentration of 0.125M (to stop the fixation). 5min under vacuum.
 3. Wash the samples twice with water and dry them with a paper.
- Protein extraction**
1. Extract proteins using prechilled materials. Add 2-mL of NEB extraction buffer to each mortar. Grind tissue in extraction buffer for 1–2 min until it becomes a consistent slurry.
 3. Pour the slurry from each sample into a 2-mL Eppendorf tubes and incubate with for 20 min at 4°C.
 4. Centrifuge at 5000 rpm in a refrigerated microcentrifuge for 15 min. Transfer 1mL supernatant to a new 1.5-mL Eppendorf tube and spin for an additional 5 min.
- Note: Be sure not to drag anything from the precipitate. If required, centrifuge again the supernatant and put it in a new tube.*
- Immunopurification**
1. Perform a blocking step of the α -FLAG agarose beads to avoid unspecific binding with 1 mg/mL BSA in extraction buffer lacking polyvinylpyrrolidone. Incubate end-over-end in a rotating microtube mixer at 4°C for 5 min. One wash and then centrifugate (facultative)
- Note: Manipulate the affinity gel agarose beads using a pipette tip that has had the bottom ~3 mm cut off with a razor blade. For each reaction we need 40 μ L of α -FLAG agarose beads (Sigma-Aldrich). Remember to do the right dilution of the beads.*
2. To the supernatant, add 40 μ L of the anti-FLAG affinity gel agarose beads.
 3. Incubate end-over-end for 1.5-2 hs at 4°C with constant rotation.
 5. Spin 5000rpm in a microcentrifuge for 5min at 4°C. Discard supernatant (or collect it and keep the unbound fraction) and add 1 mL of wash buffer. Repeat the washes 3 to 6 times use special tips to avoid removing the beads. After the last wash, spin again

to remove any liquid on the sides of the tube.

Note: The Immunopurification can be also performed using kit such as μ MACS of Miltenyi Biotec.

6. Reverse cross link by resuspend the beads 40 μ L of NEB buffer. First 2H at 50°C and then ON at RT. Do the same with a part of the input.

7. Add 40 μ L of 4x laemli buffer. Incubate at 95°C for 3min.

8. Spin full-speed in a microcentrifuge for 2 min and collect the supernatant (about 80 μ l) in a new sterile Eppendorf tube. Use immediately or store at -20°C.

Note: Keep also the beads and store at -20°C.

9. Run the eluted fractions and crude extracts in SDS-PAGE and subject to immunoblots with the corresponding antibodies.

EXTRACTION AND WASH BUFFER

	Final concentration (wash)	Stock solutions	25ml (wash)	NEB (10mL)
Tris-HCl, pH 7.5	10 mM	1M	L 2.5m	L 0.25m
NaCl	150mM	1M	mL 3.75	5mL
glycerol	10%	50%	5 mL	2mL
EDTA	1 mM	0.5M	mL 0.05	-
Triton X-100	0.1%	100%	mL 0.025	L 0.02m
DTT	5 mM	0.5M	mL 0.25	L 0.02m
protease inhibitors [Sigma-Aldrich]	1x (33 μ L/gr of tissue)	100x	Add 165 μ L to 10 mL of the extraction buffer	Add 165 μ L to 10 mL of the extraction buffer
polyvinylpyrrolidone	2%			Add 0.2 gr to 10 mL

ELUTION BUFFER (for 1 rx)

95 μ L extraction buffer

1 μ L protease inhibitor of 100x solution

4 μ L 3X FLAG peptide (Sigma-Aldrich) (200-250 mg/ μ L final)

NEB Extraction Buffer (from B. Lefebvre)

25mM Tris pH 7.5

500mM NaCl

1mM DTT

10% Glycerol

0.2% Triton

5mM CaCl₂

Remarque: to extract nuclear proteins, it is better to use the NEB buffer (to blow the nucleus)

Annexe 7: Transformation de levure au LiAC

1. Démarrer une culture over-night de levure dans du YPD (+50mg/L d'Adénine) liquide (SD-T si plasmide BD déjà dedans). 5mL dans un erlenmeyer de 50mL sur la table agitante a 28-30°C
2. Le lendemain, mesurer la DO ($\lambda=600\text{nm}$) d'une dilution au 1/10 de la culture ON. Commencer une nouvelle culture dans 50mL d'YPDA dans un erlenmeyer de 250mL. Commencer la culture à DO=0.2 et attendre qu'elle rejoigne DO=0.6 (0.5 ça marche aussi). A peu près 5 heures à 28°C sous agitation
3. Lorsque la culture atteint DO0.6, centrifuger la culture à 3500 rpm 5min.
4. Enlever le milieu et resuspendre les levures dans 25mL d'eau stérile
5. Centrifuger les levures 5min à 3500 rpm.
6. Resuspendre les levures dans 1mL de Lithium Acétate (LiAC 0.1M fraîchement dilué) et transférer les levures dans un tube ependorf de 2mL stérile
7. Centrifuger les levures (minicentri) a vitesse max (13500 rpm) pendant 15sec. Enlever le surnageant et resuspendre les levures dans 500 μL de LiAC 0.1M. (ne garder les levures que 30min max dans cette solution)
8. Pour chaque transfo, distribuer 50 μL de cellules compétentes dans un ependorf de 2mL, ajouter le ou les plasmides (1 μg dans 34 μL) et ajouter 326 μL de transfo mix.
9. Vortexer chaque échantillon 30seconds
10. Incuber 30min à 30°C (inverser toutes 10min) et ensuite 30min a 42°C.
11. Centrifuger ensuite la préparation à 7000 rpm pendant 15 sec.
12. Eliminer le surnageant et ajouter doucement 200 μL d'eau stérile. Laisser les levures se resuspendre 10 à 15 min à RT avant de les étaler sur milieu sélectif (2 x 100 μL)
- 13.

- Milieu YPDA

Bactopeptone	20g/L	→ BD
Yeast extract	10g/L	
Glucose	20g/L	→ Si autoclave à 120°C, ajouter après en solution
Adenine hemisulfate	50mg/L	→ Sigma (A3159)

- ⇒ Ajuster le pH à 5.8 avec de l'HCl dilué
- ⇒ Agar 1,5-2% Bacto agar ou microbiological

- Milieu SD

Yeast Nitrogen base without amino acids	6.7g/L
DropOut	0.62g/L
Glucose	20g/L

- ⇒ Ajuster le pH à 5.8 avec du KOH dilué
- ⇒ Agar 1,5-2% Bacto agar ou microbiological

Annexe 8: Transformation transitoire de *M. truncatula*

1. Scarifier les graines avec de l'acide sulfurique concentré 95% (3 à 5 minutes) surveiller la dégradation des téguments (apparition de taches sombres).
2. Enlever un maximum d'acide avant d'ajouter une grande quantité d'eau (risque de projections)
3. Faire 4 à 5 lavages a l'eau
4. Stériliser les graines avec de l'hypochlorite de sodium a 12° (Chlore actif) pendant 1min30
5. Faire 7 lavages (minimum) à l'eau stérile
6. Laisser les graines gonfler dans l'eau du dernier lavage pendant 30 à 60 min
7. Déposer les graines (espacées) sur une gélose (agar 1%) ou milieu bactérien (type C) dilué au demi.
8. Laisser les graines (boîte retournées) à 4°C à l'obscurité pendant 7 jours (vérifier la croissance des radicules)
9. La veille de la transformation, lancer une culture over-night des Agro et vérifier la croissance des radicules, si < 3mm mettre à 20°C si <5mm mettre à 15°C.
10. Pour la transformation, couper l'extrémité de la racicule (1 à 2 mm) et disposer les graines germées sur milieu F + 25mg/L de kanamycine
11. Déposé une goutte de solution bactérienne (DO=1 dans l'eau stérile) à l'extrémité coupé de la racine
12. Laisser les plantes 10 jours à 20°C (photopériode de 16H)
13. Les transférer à 25°C (photopériode de 16H) pendant 10 jours supplémentaires, vérifier la croissance racinaire
14. Transférer les plante en fonction de l'usage (sépiolite, caisson, F + papier...) contrôler la fluorescence si marqueur disponible.