



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Cotutelle internationale avec :

Présentée et soutenue par :
Violaine HERRBACH

Le mardi 17 décembre 2013

Titre :

Stimulation du développement des racines latérales par des lipochitooligosaccharides (LCOs) symbiotiques chez *Medicago truncatula*

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED SEVAB : Interactions plantes-microorganismes

Unité de recherche :

Laboratoire des Interactions Plantes Microorganismes (LIPM)

Directeur(s) de Thèse :

Clare GOUGH - Directrice de recherches CNRS, LIPM Toulouse (France)

Sandra BENSMIHEN - Chargée de recherches CNRS, LIPM Toulouse (France)

Rapporteurs :

Valérie LEGUÉ - Professeur, Université Clermont-Ferrand II (France)

Pascal RATET - Directeur de recherches CNRS, ISV Gif-sur-Yvette (France)

Autre(s) membre(s) du jury :

Anne DIEVART - Chargée de recherches CIRAD, AGAP Montpellier (France)

Florian FRUGIER - Directeur de recherches CNRS, ISV Gif-sur-Yvette (France)

Guillaume BÉCARD - Professeur, UPS Toulouse III (France)

Remerciements

Je souhaite avant tout remercier Sandra pour son encadrement. D'ailleurs je trouve ce dernier mot plutôt péjoratif : tu m'as accompagnée, dans les réussites et d'autant plus dans les échecs, soutenue et secourue si nécessaire, orientée avec discernement, tout en me laissant une grande liberté dans les décisions à prendre et les propositions à amener. Tu m'as appris que « ce qui tue pas nous rend plus forts » ! Pour tout cela, mais aussi pour ta patience, ton dévouement et tes grandes qualités scientifiques, je te remercie de tout cœur.

Clare, je voudrais te remercier pour ta grande rigueur, ta bonne humeur et tes conseils plus qu'appréciables. Merci de te monter toujours disponible pour une discussion sur mes résultats, pour relire des rapports, pour apporter ton expertise sur le projet, et des propositions lors de l'écriture et la relecture critique de l'article, ou juste papoter. Merci enfin de m'avoir encouragée quand le moral diminuait, et d'avoir toujours cru en la réussite de ce projet.

Je voudrais remercier toutes les personnes du LIPM qui ont pris part à ce projet : Céline R. pour le développement des lignées transgéniques, Ton, Marie-Christine, Olivier pour les études cytologiques et microscopiques, Brice et Luis pour leur expertise dans l'obtention d'ARN, Sandra et Axelle pour leur aide dans les tests pharmacologiques, et tout ceux que j'oublie.

Je souhaite aussi remercier Stew Smith et Yaowei Kang (Novozymes) pour leur intérêt et celui de leur entreprise pour mon projet de thèse, et pour l'avoir supporté financièrement. J'ai beaucoup apprécié nos réunions régulières où la discussion scientifique était toujours très fructueuse. Merci également aux membres de mon comité de thèse : Soizic Rochange, Nemo Peeters et Florian Frugier pour les discussions et conseils sur le projet de thèse.

Céline C. et Delphine, mes sœurs de labo, merci d'avoir été à mes côtés pendant une grande partie de ma thèse. J'ai beaucoup appris à votre contact, tant sur le plan scientifique qu'humain. Maintenant que vous êtes parties vers d'autres horizons, je suis heureuse de savoir que j'ai conservé la plus importante et irremplaçable des récompenses : votre amitié.

À mes colocs de bureau et de labo, Fabienne, Sarah, Chrystel, Pauline, Vincent, et toutes les sympathiques âmes de passage, qui ont contribué à rendre les moments passés au boulot très agréables... Entre discussions, potins, éclats de rire, et réserve de gâteaux, l'ambiance est loin de manquer dans le gynécée !

Merci aussi à tous les membres du groupe CGJC, et en particulier Clare et Julie de m'avoir accueillie dans l'équipe, à Fred et à Charles pour les agréables moments à papoter à la cantine, à Stéphanie, Marie, Luis, et *al.*

Je remercie toutes les personnes du LIPM avec qui j'ai eu l'occasion d'échanger. Aux joyeux drilles non-permanents, pour nos apéros sur la pelouse du labo, très appréciés après une journée de manip, et en particulier mes compagnons de galère en thèse, Céline M.D., Justine, David et les autres. Toujours un plaisir de se dire qu'on n'est pas seuls.

À mes potes ingénieurs « aéro », parce que ça fait du bien de parler d'autres choses que de plantes parfois. Pour nos débats électroniques hilarants, nos sorties et randonnées qui m'ont fait apprécier la vie toulousaine et midi-pyrénéenne. À Laura, Rénald, Paul, et mes amis dispersés en France et ailleurs.

Pour finir par le plus important, il va sans dire que je dois beaucoup au soutien de ma famille, qui a su garder une proximité épistolaire et téléphonique malgré l'éloignement géographique. Merci aussi à papa de m'avoir donné le goût de la recherche !

Maxime, il est difficile de m'imaginer réussir cette thèse sans toi. Parce qu'on n'a pas besoin de longs discours et que tu sais déjà tout, je me contenterai de dire : Merci.

SOMMAIRE

Liste des figures et des annexes _____	4
Liste des abreviations _____	6
Introduction _____	10
Partie A – Les symbioses _____	14
1. Les symbioses dans le monde végétal _____	14
2. <i>Medicago truncatula</i> , une plante modèle des symbioses _____	20
3. Contrôle et régulation des symbioses chez <i>Medicago truncatula</i> _____	34
4. Conclusions _____	48
Partie B – La racine latérale _____	50
1. La ramification racinaire _____	50
2. Etapes cellulaires du développement de la racine latérale chez <i>Arabidopsis thaliana</i> _____	50
3. L'auxine : le régulateur clé du développement de la racine latérale _____	56
4. Autres facteurs influençant la formation des racines latérales _____	66
5. Conclusions _____	74
Partie C – Développement de la racine latérale dans un contexte symbiotique _____	76
1. Origine et avantages évolutifs de la ramification pour les symbioses _____	76
2. Particularités du développement des racines latérales chez <i>Medicago truncatula</i> _____	78
3. Influence des symbiotes sur la racine latérale chez <i>Medicago truncatula</i> _____	82
4. Objectifs du projet de thèse _____	86
Matériel et méthodes _____	92
1. Préparation des molécules _____	94
2. Matériel végétal _____	94
3. Analyse de la ramification racinaire _____	100
4. Développement de marqueurs histochimiques _____	104
5. Observations de la racine latérale _____	108
6. Analyse transcriptomique _____	112

Résultats	118
Partie - Etude du développement de la racine latérale chez <i>Medicago truncatula</i>	120
1. Développement de lignées marqueurs de la racine latérale	120
2. Description de la formation et de l'organisation des racines latérales chez <i>Medicago truncatula</i> (article)	130
3. Organisation spatio-temporelle des RL sur la racine primaire (complément à l'article)	134
4. Conclusions	136
Partie B - Effet des lipo-chitooligosaccharides sur la formation des racines latérales	138
1. Effets des lipo-chitooligosaccharides : mises au point préliminaires	138
2. Les facteurs Nod agissent sur les étapes précoces de la formation des RL	146
3. Conclusions	152
Partie C - Interactions entre les lipo-chitooligosaccharides et les voies hormonales	156
1. Approche pharmacologique	156
2. Approche génétique	164
3. Approche transcriptomique	170
4. Conclusions	176
Discussion	178
1. Caractéristiques de la formation des racines latérales chez <i>M. truncatula</i>	180
2. Adaptations de l'organisation des racines latérales chez <i>M. truncatula</i>	190
3. Les facteurs Nod interagissent avec les voies hormonales lors de la formation de la racine latérale	196
4. La détection des primordia de racine latérale	208
5. Conclusions générales et perspectives	210
Annexes	214
Références	216

LISTE DES FIGURES ET DES ANNEXES

INTRODUCTION

Figure 1.1 • Effet des symbioses sur la biomasse végétale	17
Figure 1.2 • La légumineuse modèle <i>Medicago truncatula</i> (luzerne tronquée)	19
Figure 1.3 • Dialogue moléculaire entre <i>M. truncatula</i> et son symbionte rhizobien <i>S. meliloti</i>	21
Figure 1.4 • Etapes précoces de l'infection rhizobienne et de l'organogenèse de la nodosité fixatrice d'azote	23
Figure 1.5 • Structures des nodosités indéterminées et déterminées	25
Figure 1.6 • Le cordon d'infection et la nodosité chez <i>M. truncatula</i>	25
Figure 1.7 • Échange moléculaire entre <i>M. truncatula</i> et son symbionte fongique <i>Rhizophagus irregularis</i>	29
Figure 1.8 • Etapes d'infection et de colonisation par le champignon mycorhiziens à arbuscules chez <i>M. truncatula</i>	29
Figure 1.9 • Les arbuscules dans la racine de <i>M. truncatula</i>	31
Figure 1.10 • Structure chimique des facteurs Nod de <i>S. meliloti</i> et des Myc-LCOs de <i>R. irregularis</i>	33
Figure 1.11 • Modèle de perception et de signalisation précoce des facteurs Nod et des Myc-LCOs chez <i>M. truncatula</i>	35
Figure 1.12 • Morphologie de la racine principale d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	51
Figure 1.13 • Divisions anticlines asymétriques dans le péricycle chez <i>A. thaliana</i>	51
Figure 1.14 • Etapes successives de formation du primordium de racine latérale chez <i>A. thaliana</i>	53
Figure 1.15 • Forme tridimensionnelle du primordium de racine latérale chez <i>A. thaliana</i>	53
Figure 1.16 • Accumulation d'auxine lors de la formation de la racine latérale	55
Figure 1.17 • Métabolisme général de l'auxine.....	55
Figure 1.18 • Biosynthèse de l'auxine	57
Figure 1.19 • Le transport d'auxine au niveau de la racine principale d' <i>A. thaliana</i>	57
Figure 1.20 • Schéma général de la perception et la signalisation de l'auxine	59
Figure 1.21 • Spécification des cellules fondatrices de la racine latérale chez <i>A. thaliana</i>	61
Figure 1.22 • Effet de l'auxine sur l'émergence du primordium de racine latérale chez <i>A. thaliana</i>	63
Figure 1.23 • Influence de facteurs biotiques et abiotiques sur le métabolisme de l'auxine permettant la formation des racines latérales	67
Figure 1.24 • Structure de la racine chez <i>A. thaliana</i> et <i>M. truncatula</i>	77
Figure 1.25 • Régulation hormonale différentielle des organes racinaires chez <i>A. thaliana</i> et <i>M. truncatula</i>	77
Figure 1.26 • Influence des LCOs sur le développement des racines latérales chez <i>M. truncatula</i>	81
Figure 1.27 • Voie de signalisation commune menant à la stimulation de la ramification racinaire.....	83

MATERIEL ET METHODES

Figure 2.1 • Système de culture en boîte de Petri	95
Figure 2.2 • Méthode de traitement en milieu liquide	97
Tableau 2.3 • Composition du tampon de révélation GUS	107
Figure 2.4 • Exemple de résultat d'une analyse d'ARN Agilent	113

RESULTATS

Figure 3.1 • Lignées transgéniques <i>DR5:GUS</i> et <i>DR5:VENUS-N7</i> et leur réponse à l'auxine (ANA)	123
Figure 3.2 • Profil d'expression de <i>DR5:GUS</i> et <i>DR5:VENUS-N7</i> chez <i>M. truncatula</i>	125
Figure 3.3 • Expression du marqueur <i>DR5:GUS</i> dans la zone jeune de la racine de <i>M. truncatula</i>	127
Figure 3.4 • Expression des marqueurs <i>pSCR1:GUS</i> et <i>pSCR2:GUS</i> dans la racine de <i>M. truncatula</i>	129
Figure 3.5 • Développement macroscopique de la racine latérale chez <i>M. truncatula</i>	133

Figure 4.1 • Stimulation de la formation des racines latérales par un traitement court de LCOs en milieu liquide	139
Figure 4.2 • Stimulation de la formation des racines latérales par un traitement des graines aux facteurs Nod	139
Figure 4.3 • Efficacité d'une application locale de facteurs Nod sur la stimulation de la formation des racines latérales.....	141
Figure 4.4 • Cinétique d'apparition des racines latérales chez les géotypes A17 et 2HA de <i>M. truncatula</i> en réponse aux facteurs Nod	143
Figure 4.5 • Cinétique d'apparition des primordia de racines latérales (LRP) et des racines latérales émergées	145
Figure 4.6 • Apparition et émergence des LRP en réponse aux facteurs Nod	147
Figure 4.7 • Effet d'une application locale précoce de facteurs Nod sur la répartition des stades de développement de la RL chez des plantes <i>DR5::GUS</i>	149
Figure 4.8 • Test de l'étanchéité d'une application locale précoce de facteurs Nod sur la position des LRP au long de la racine primaire	151
Figure 5.1 • Influence de l'auxine (ANA) sur la ramification racinaire et la racine primaire chez les lignées A17 et 2HA de <i>M. truncatula</i>	157
Figure 5.2 • Effets et interaction de l'auxine et des facteurs Nod sur la ramification racinaire et la racine primaire chez <i>M. truncatula</i> A17	159
Figure 5.3 • Effets et interaction de l'auxine et des Myc-LCOs et facteurs Nod sur la ramification racinaire et la racine primaire chez <i>M. truncatula</i> 2HA	161
Figure 5.4 • Effets et interaction des facteurs Nod et de l'éthylène sur la ramification racinaire chez <i>M. truncatula</i> A17	163
Figure 5.5 • Réponse du mutant <i>Mtsickle</i> aux facteurs Nod pour la stimulation de la formation des racines latérales.....	165
Figure 5.6 • Réponse du mutant <i>Mtcre1</i> aux facteurs Nod pour la stimulation de la formation des racines latérales	165
Figure 5.7 • Réponse du mutant <i>Mtccd7</i> aux facteurs Nod pour la stimulation de la formation des racines latérales	167
Figure 5.8 • Synchronisation de la formation des racines latérales par prétraitement au NPA	169
Figure 5.9 • Effets cellulaires de la synchronisation de la formation des racines latérales par prétraitement au NPA.....	173
Tableau 5.10 • Concentrations des molécules et solvants contenus dans les milieux utilisés pour l'analyse transcriptomique	175

DISCUSSION

Tableau 6.1 • Comparaison des tissus racinaires contribuant à la racine latérale chez différentes plantes.....	179
Figure 6.2 • Modèle proposé pour les étapes de spécification et d'initiation de la racine latérale chez <i>M. truncatula</i>	181
Figure 6.3 • Modèle proposé pour les étapes cellulaires précoces de développement de la racine latérale chez <i>M. truncatula</i>	183
Figure 6.4 • Modèle proposé du développement de la racine latérale et de l'intervention des facteurs Nod	209

ANNEXES

Annexe A • Composition du milieu M	214
Annexe B • Composition du milieu Fähræus.....	215

LISTE DES ABBREVIATIONS

°C	Degré Celsius
ABA	<i>Abscissic acid</i> ou acide abscissique
ABC/PGP	<i>ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER-LIKE/PHOSPHOGLYCOPROTEIN</i>
ABI	<i>ABSCISSIC ACID INSENSITIVE</i>
ABP	<i>AUXIN BINDING PROTEIN</i>
ACC	Acide aminocyclopropane carboxilique
ACR	<i>ARABIDOPSIS CRINCLY</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFB	<i>AUXIN SIGNALING F-BOX</i>
AHK	<i>ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE</i>
AIA	Acide indole acétique
AIB	Acide indole butyrique
ALF	<i>ABERRANT LATERAL ROOT FORMATION</i>
ANA	Acide naphthalène acétique
ANOVA	Analyse de variance
AP	<i>APETALA</i>
ARF	<i>AUXIN RESPONSE FACTOR</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARR	<i>TYPE-A RESPONSE RECEPTOR</i>
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AUX	<i>AUXINE RESISTANT</i>
Aux/IAA	<i>AUXINE/INDOLE ACETIC ACID</i>
AuxRE	<i>Auxin response element</i> ou élément de réponse à l'auxine
BAP	Benzyl aminopurine
BDL	<i>BODENLOS</i>
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
CCaMK	<i>Calcium and calmoduline-dependent kinase</i>
Ccd	<i>carotenoid cleavage dioxygenases</i>
CERMAV	Centre de recherches sur les macromolécules végétales
CF	Cellules fondatrices
cf.	Confère
CHS	<i>Chalcone synthase</i>
CK	Cytokinines
cm, mm, µm, nm	Centimètre, millimètre, micromètre, nanomètre
CNRS	Centre national de recherches scientifiques
COCH	<i>COCHLEATA</i>
coll.	Collaborateurs
CRE	<i>CYTOKININ RECEPTOR</i>
CSSP	<i>Common symbiotic signaling pathway</i> ou voie de signalisation symbiotique commune
CWR	<i>Cell wall remodelling enzyme</i> ou enzyme de remodelage de la paroi
Cy	Cyanine
DII	Domaine II des Aux/IAA
DMI	<i>DOES NOT MAKE INFECTIONS</i>
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
DNase I	Enzyme de dégradation de l'ADN I

DR5	Répétitions d'AuxRE mutés à l'extrémité 5'
EDM	<i>Embryo differentiation medium</i>
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EIM	<i>Embryo-inducing medium</i>
EIN	<i>ETHYLENE INSENSITIVE</i>
ENOD	<i>EARLY NODULIN</i>
ERN	<i>ETHYLENE RESPONSE ELEMENT (ERE) BINDING FACTOR (ERF) REQUIRED FOR NODULATION</i>
F. Nod	Facteurs de nodulation
Facteurs Myc	Facteurs de mycorhization
Facteurs Nod	Facteurs de nodulation
g, mg, µg, ng	gramme, milligramme, microgramme, nanogramme
G1, G2, M, S	Phases du cycle cellulaire (<i>Gap 1, Gap 2, Mitosis, DNA synthesis</i>)
GA	Acide gibbérellique
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GLM	<i>General linear model</i> ou modèle linéaire général
GRAS	<i>GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE/REPRESSOR OF GAI/SCARECROW</i>
GUS	Enzyme β-glucuronidase
h, min	Heure, minute
HD-Zip	<i>Homeodomain-leucine zipper</i>
IAA	<i>INDOLE ACETIC ACID</i>
IAA/AXR	<i>INDOLE ACETIC ACID/AUXINE RESPONSIVE</i>
ICK/KRP	<i>INHIBITOR-INTERACTOR OF CDK (CYCLIN-DEPENDENT KINASE)/KIP-RELATED PROTEIN</i>
INRA	Institut national de recherches agronomiques
IPT	<i>ISOPENTENYL TRANSFERASE</i>
ISV	Institut des sciences du végétal
KOH	Hydroxyde de potassium
l, ml, µl	Litre, millilitre, microlitre
La	<i>Lupinus albus</i>
LAX	<i>LIKE-AUX1</i>
LBD	<i>LOB BINDING DOMAIN</i>
LCO	Lipo-chitooligosaccharide
LIPM	Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes
LOB	<i>LATERAL ORGAN BOUNDARY</i>
LR	Légumineuse-rhizobium
LRI	Initiation de la racine latérale
LRP	Primordium de racine latérale
LRR-RLK	<i>Leucine-rich repeat receptor-like kinase</i>
LRSV	Laboratoire de recherche en sciences végétales
LYK	<i>Group 1 lysine motif receptor-like kinase</i>
LYR	<i>Group 2 lysine motif receptor-like kinase</i>
LysM	<i>Lysine motif</i>
LysM-RLK	<i>Lysine motif receptor-like kinase</i>
M, mM, µM, nM	molaire, millimolaire, micromolaire, nanomolaire
MA	mycorhizienne à arbuscules
max	<i>more axillary growth</i>
Milieu M	Milieu minimal
MiSSP	<i>MYCORRHIZAL INDUCED SMALL SECRETED PROTEIN</i>
miR	micro-ARN

MIZ	<i>MIZU-KUSSEI</i>
MNS	Myc-LCOs non-sulfatés
Mpb	Mega paires de bases
MS	Myc-LCOs sulfatés
Mt	<i>Medicago truncatula</i>
Myc-LCOs	Lipo-chitoooligosaccharides produits par <i>Rhizophagus irregularis</i>
NAC	<i>NO APICAL MERISTEM/ARABIDOPSIS THALIANA TRANSCRIPTION ACTIVATION FACTOR/CUP-SHAPED COTYLEDON</i>
NCR	<i>Nodule-specific cysteine-rich peptides</i>
NFP	<i>NOD FACTOR PERCEPTION</i>
NIN	<i>NODULE INCEPTION</i>
NodD	Nodulation D
NOOT	<i>NODULE ROOT</i>
NPA	Naphtylphthalamique acid ou acide naphtylphthalamique
NRT	<i>NITRATE TRANSPORTER</i>
NSP	<i>NODULATION SIGNALING PATHWAY</i>
P	Promoteur
PDM	<i>Plant-development medium</i>
PG	Polygalacturonase
pH	Potentiel hydrogène
Pi	Phosphate inorganique
PIN	<i>PIN-FORMED</i>
PLA	Pectate lyase
PPT	Phosphinothricine
p-value	Valeur de probabilité
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RAM	<i>REQUIRED FOR ARBUSCULAR MYCORRHIZATION</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RL	Racine latérale
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAi	Interférence/inhibition de l'ARN
RNAse	Enzyme de dégradation de l'ARN
RPG	<i>RHIZOBIUM-DIRECTED POLAR GROWTH</i>
SCF	<i>SKP1/CULLINI/F-box receptor</i>
SCR	<i>SCARECROW</i>
SEM	<i>Standard error or the mean</i>
SHY	<i>SHORT-HYPOCOTYL</i>
SL	Strigolactones
SI	<i>Solanacearum lycopersicum</i>
SLM	<i>SMOOTH LEAF MARGIN</i>
SLR	<i>SOLITARY ROOT</i>
T1, T2, etc.	Première, seconde génération transgénique, etc.
TIR	<i>TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE</i>
UMR	Unité mixte de recherche
WT	<i>Wild-type</i> ou sauvage
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>

Introduction

Introduction

Afin de débiter cette introduction, il semble important de dire que la thématique de cette thèse se trouve au carrefour de deux domaines scientifiques bien distincts : les interactions plantes-microorganismes, et le développement des plantes. Notre thématique vise en effet à comprendre les mécanismes permettant à des molécules symbiotiques exogènes d'interférer avec des programmes développementaux endogènes de la plante chez la légumineuse *Medicago truncatula*.

L'un des problèmes que j'ai rencontrés lors des recherches sur cette thématique est le manque d'études réalisées spécifiquement sur le développement de la racine chez les légumineuses, dès que l'on sort du contexte symbiotique. Inversement, si de nombreux travaux décrivent le développement racinaire chez des espèces modèles, comme *Arabidopsis thaliana*, ils ne peuvent que difficilement être placés dans un contexte symbiotique, étant donné qu'*A. thaliana* n'établit pas les endosymbioses de *M. truncatula*, et est dépourvu de plusieurs gènes symbiotiques clés.

En conséquence, et puisque la littérature est riche dans les domaines de la symbiose et du développement racinaire, je vais focaliser cette revue bibliographique sur les connaissances des symbioses chez *M. truncatula* utiles à mon projet (Partie A) ; puis je m'axerai précisément sur le domaine du développement de la racine latérale, en m'appuyant majoritairement sur la plante *A. thaliana* (Partie B) ; et enfin, je tâcherai de faire le bilan des connaissances sur les particularités du développement racinaire chez *M. truncatula*, afin de collecter des informations utiles à cerner la problématique de la thèse (Partie C).

Partie A – LES SYMBIOSES

1. Les symbioses dans le monde végétal

Les relations entre deux organismes vivants sont définies d'après l'effet que l'un a sur l'autre, et l'aspect obligatoire ou non de cette interaction. Il existe toute une gradation d'interactions possibles entre deux organismes vivants, mais les relations les plus communes sont le neutralisme (pas d'interaction), la compétition (les deux espèces se disputent une ressource insuffisante), le parasitisme (une espèce vit aux dépens de l'autre), le commensalisme (une espèce tire profit de l'autre sans lui nuire) ou le mutualisme (les deux espèces tirent un bénéfice réciproque de leur interaction). La symbiose est une forme particulière du mutualisme, qui peut être obligatoire pour au moins l'un des deux organismes. Un exemple de symbiose est le lichen, qui résulte de l'association entre une algue unicellulaire et un champignon : l'algue retire de la relation un apport important en eau et en sels minéraux et un abri hors du milieu aquatique, tandis que le champignon y gagne les sucres que produit l'algue par la photosynthèse.

Dans le règne végétal, les symbioses sont très répandues. Les plus communes sont les symbioses entre les racines des plantes et certains microorganismes du sol, tels des bactéries ou des champignons. Ces derniers sont nommés symbiontes, tandis que la plante est appelée l'hôte. Les symbioses racinaires de plantes sont classées en deux grands groupes : les ectosymbioses et les endosymbioses.

Les ectosymbioses ne concernent que 2% des plantes et se produisent surtout avec certains champignons du sol (Dickie et al., 2013). Le mycélium de ces derniers entoure la racine et y pénètre en formant un réseau dans les espaces intercellulaires de la racine, sans entrer dans les cellules. Au contraire, les endosymbioses racinaires concernent une grande majorité des plantes terrestres. Leur particularité est que les microorganismes symbiotiques pénètrent les cellules racinaires afin d'entrer en symbiose avec la plante. Au cours de cette thèse, nous allons plus particulièrement nous intéresser aux endosymbioses racinaires.

1.1. Les endosymbioses racinaires

1.1.a. La mycorhization à arbuscules

Très tôt au cours de l'évolution, les plantes ont acquis la capacité de s'associer de façon symbiotique avec des champignons du sol. Le processus d'association de champignons avec les racines de plantes est appelé la mycorhization (du grec champignon-racine). La plus commune des mycorhizations est la symbiose mycorhizienne à arbuscules (MA), qui concerne environ 74% des plantes terrestres, notamment des angiospermes, des gymnospermes, des ptéridophytes, quelques bryophytes et des plantes ancestrales

telles que les hépatiques (Brundrett, 2009). Comme son nom l'indique, cette association conduit à la formation de structures fongiques ramifiées dans la cellule de l'hôte, appelées arbuscules. Les premiers signes de la présence d'arbuscules remontent à 400 millions d'années (Redecker et al., 2000), et la symbiose MA est même considérée comme l'un des principaux processus ayant permis l'adaptation des plantes au milieu terrestre (Humphreys et al., 2010).

Les champignons MA font partie de l'embranchement des Glomeromycètes, réunissant notamment les genres *Gigaspora* et *Rhizophagus*. La symbiose MA est indispensable pour le champignon, biotrophe obligatoire, qui ne peut pas compléter son cycle de vie en l'absence d'une plante hôte. Toutefois, il présente un large spectre d'hôtes végétaux possibles, et peut se développer dans presque tout type de milieu colonisé par des plantes.

1.1.b. Les symbioses fixatrices d'azote

L'azote (N) est l'un des principaux atomes dont les plantes dépendent pour se développer et se multiplier. La plupart des plantes ne peuvent bénéficier de l'azote que sous forme minérale, c'est-à-dire sous forme de nitrates (NO_3^-), ou d'ion ammonium (NH_4^+), présents dans le sol en quantité variable. Pourtant, la plus grande réserve d'azote est l'atmosphère, qui contient 78% d'azote sous forme de N_2 .

Au cours de l'évolution, certains organismes procaryotes ont acquis la faculté biologique de fixer l'azote atmosphérique. Cette capacité, appelée diazotrophie, nécessite chez le procaryote la présence de l'enzyme nitrogénase, qui transforme le N_2 en NH_3 . Ces organismes peuvent fixer l'azote à l'état libre, ce qui est le cas des bactéries du genre *Azotobacter*, ou en association avec des racines de plante, auquel cas ils font profiter celle-ci de l'azote. Lorsque ces associations sont réciproquement profitables, elles sont appelées symbioses fixatrices d'azote. Ce type de symbiose semble être apparu dans un contexte de sols carencés en azote (Sprent and James, 2007).

Parmi ces symbioses, la plus répandue dans le règne végétal (20% des plantes sont concernées) est l'interaction symbiotique entre des plantes de la famille des légumineuses (pois, haricot, soja, arachide, trèfle, luzerne, *etc.*), et des bactéries fixatrices d'azote réunies sous le nom de rhizobia. Cette symbiose Légumineuse-Rhizobium (LR) est apparue il y a 60 millions d'années, et est donc beaucoup plus récente que la symbiose mycorhizienne (Sprent and James, 2007). Les rhizobia réunissent 70 espèces et sont des bactéries gram-négatives. Ces bactéries possèdent, contrairement aux champignons MA, une très haute spécificité d'hôte. Ainsi, chaque espèce de rhizobia s'associe plus ou moins spécifiquement avec une espèce de plante. Quelques rares espèces non-légumineuses sont capables de s'associer de façon symbiotique avec des rhizobia : il s'agit de plantes du genre *Parasponia*, appartenant à la famille des Cannabacées (Vessey et al., 2005).

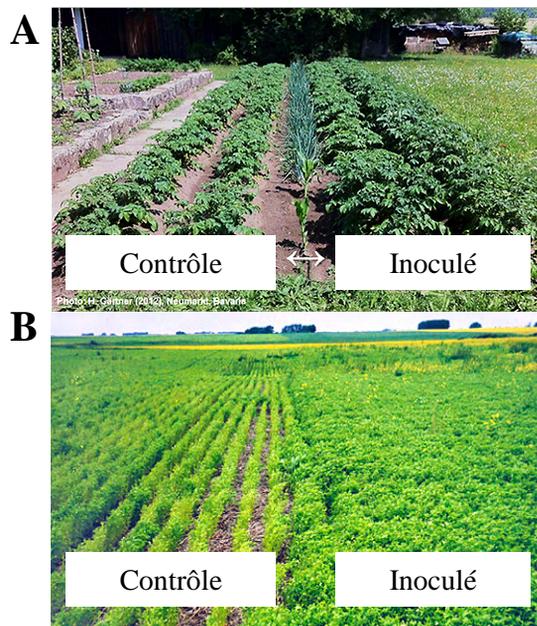


Figure 1.1 • Effet des symbioses sur la biomasse végétale

(A) L'inoculation de champignons symbiotiques mycorhiziens à arbuscules (MA) sur des plants de pomme de terre permet d'obtenir des plantes plus grandes et mieux développées que les plantes non inoculées (contrôle). Elles sont également plus résistantes aux pathogènes et leur rendement est amélioré de 5 à 15%. (Source: H. Gartner , 2012, Neumarkt, Bavaria, www.symyc.de/en/about-mycorrhiza/mycorrhiza-research/)

(B) Des cultures de lentilles ayant bénéficié d'une inoculation de rhizobia (bactéries symbiotiques) permet aux cultures de produire une plus importante biomasse que les plantes non-inoculées (contrôle).

(Source : <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/cm/review/2004/legume/>)

Lors de la symbiose LR, les rhizobia interagissent généralement avec les racines des plantes via un organe racinaire particulier : la nodosité¹. Cet organe, dont l'organogénèse est induite par la présence des rhizobia, est une interface d'échange entre les deux partenaires. Les bactéries pénètrent dans la nodosité, et y réalisent la fixation de l'azote, tandis que la plante les pourvoit en carbone. Ce phénomène symbiotique est appelé la nodulation.

Il existe un autre type de symbiose fixatrice d'azote, appelée symbiose actinorhizienne. Il s'agit d'une association entre une bactérie actinomycète de type gram-positif appartenant au genre *Frankia* (Benson and Silvester, 1993), et certains arbres tropicaux, appelés plantes actinorhiziennes. Celles-ci regroupent 200 espèces, dont par exemple *Casuarina glauca*. Parmi ces espèces, toutes ne sont pas capables de former une nodosité, et celles qui sont formées présentent des différences avec la nodosité formée lors de la symbiose LR (Peret et al., 2007), et ressemblent plus à une racine latérale.

Il est suggéré que les symbioses plantes-bactéries soient issues de l'évolution de la symbiose MA, et que la capacité des plantes et des champignons MA puisse avoir été cooptée par les légumineuses et les rhizobia, ainsi que par les plantes et les bactéries actinorhiziennes. En effet, certains gènes de la voie de signalisation de la symbiose MA sont activés par les rhizobia (Parniske, 2008).

1.2. Intérêts agronomiques et environnementaux des symbioses

Les avantages des symbioses, quelles qu'elles soient, pour l'agriculture et l'environnement sont nombreuses : elles contribuent à la stabilisation du sol, permettent d'augmenter la croissance de la plante de par la disponibilité en nutriments et éventuellement une action sur la balance hormonale, et permettent la fixation de l'azote et un meilleur accès aux nutriments et à l'eau. En parallèle, les symbioses augmentent la tolérance des plantes aux stress, réduisent les taux de maladies des plantes par compétition ou activation des défenses systémiques, et améliorent la protection contre les nématodes, herbivores, insectes, *etc.* (Andrews et al., 2010). L'amélioration du rendement et de la biomasse des plantes est visible après inoculation de celles-ci avec des symbiotes (Figure 1.1).

Nos systèmes de culture actuels impliquent l'emploi de beaucoup de fertilisants inorganiques (azote, phosphore, potassium). L'usage de ces fertilisants est un réel problème car beaucoup d'énergie est nécessaire pour réduire le N₂ en nitrates (Olivares et al., 2013), tandis que le phosphate et le potassium sont des ressources limitées. De plus, l'utilisation d'engrais azotés cause un déséquilibre de l'état des sols entraînant une perte de biodiversité dans les milieux agricoles et affectés par l'agriculture (Moss, 2008), ce qui est aussi le cas de l'arrosage intensif pour lutter contre la sécheresse. Parallèlement, le changement climatique global entraîne un réchauffement, qui a lui aussi un effet drastique sur les niches écologiques et l'état des sols (*Intergovernmental Panel on Climate Change*²).

¹ Remarque : la nodosité est également appelée *nodule*, d'après sa dénomination anglo-saxonne.

² Plus d'informations sur www.ipcc.ch

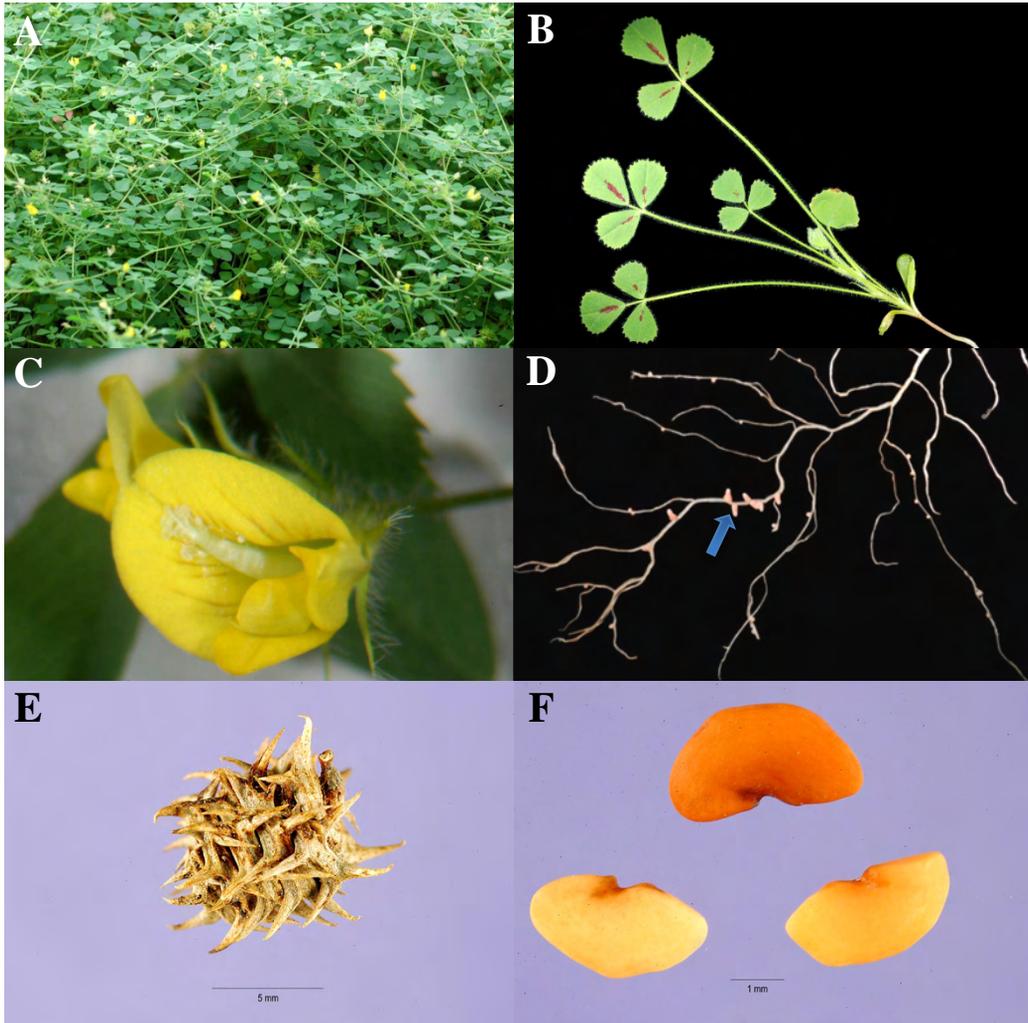


Figure 1.2 • La légumineuse modèle *Medicago truncatula* (luzerne tronquée)

M. truncatula en culture (A) présente des feuilles trilobées avec, selon le génotype, de petites taches marron sur les nervures centrales (B), des fleurs plutôt petites (C), un système racinaire comportant de nombreuses ramifications (D), où des nodosités symbiotiques sont observables (flèche) après une inoculation par le symbionte rhizobien *S. meliloti*. Les gousses (E) renferment les graines (F). Le cycle graine à graine est de 3 mois environ.

Source : Ninjatacoshell (A à D) et Tracey Slotta @ USDA-NRCS PLANTS Database (E et F).

De ce fait, se pose la question de la durabilité de la production de nourriture et de la santé de l'environnement, dans le contexte d'une population humaine en constante augmentation. En effet, celle-ci devrait atteindre 9 milliards d'individus en 2050, et les besoins en nourriture et en eau douce des populations humaines augmentent en conséquence (Lal, 2010).

Afin de s'adapter au besoin croissant en nourriture tout en préservant l'environnement, et en faisant face à la diminution des énergies fossiles, il est nécessaire de trouver des stratégies alternatives à l'agriculture intensive. Entre autres stratégies, l'exploitation de la capacité des légumineuses à la fixation symbiotique de l'azote est très intéressante, afin de cultiver des espèces qui ne nécessitent pas ou peu d'apport azoté (tels que le soja, le pois, la luzerne, *etc*) ou encore d'ajouter des cultures de légumineuses dans les rotations agricoles afin de récupérer un taux d'azote naturel dans des sols appauvris. De la même façon, favoriser les interactions entre les plantes cultivées et les champignons MA est une bonne façon d'augmenter le rendement de ces cultures sans passer par des apports nutritionnels importants ou de l'arrosage intensif. Ainsi, des entreprises internationales telles que Novozymes³ ont compris la nécessité de mettre au point des bio-fertilisants efficaces et respectueux de l'environnement, en s'appuyant sur les capacités symbiotiques des plantes et des microorganismes, ainsi que sur les signaux symbiotiques produits par ces microorganismes.

2. *Medicago truncatula*, une plante modèle des symbioses

2.1. Intérêts scientifiques

Medicago truncatula (Figure 1.2) est une plante annuelle de la famille des légumineuses (Fabacées), généralement appelée luzerne tronquée (*barrel medic* en anglais). Cette plante méditerranéenne se retrouve surtout à l'état sauvage, elle est peu cultivée à l'exception de son usage en tant que fourrage protéagineux en Australie. Toutefois, elle est proche de *Medicago sativa*, la luzerne cultivée sous nos latitudes, et de certaines autres légumineuses d'intérêt agronomique, comme le pois (*Pisum sativum*).

En outre, *M. truncatula* présente des atouts scientifiques non négligeables : son génome est relativement petit (500 Mpb), soit 7 fois plus petit que celui de *P. sativum*, et a été récemment séquencé et annoté (Young et al., 2011). Des banques de mutants et des cartes génétiques sont disponibles, ce qui apporte de nombreux outils pour l'étudier. Par ailleurs, *M. truncatula* est une espèce autogame et diploïde, ce qui facilite sa culture, les croisements entre génotypes et les analyses génétiques. Son cycle reproducteur est d'environ trois mois graine à graine. Elle se révèle également facile à transformer génétiquement par les bactéries *Agrobacterium rhizogenes* et *A. tumefaciens*.

D'autre part, *M. truncatula*, tout comme la plupart des légumineuses, s'associe avec les rhizobia et bénéficie de la fixation de l'azote. Elle établit aussi la symbiose MA avec des champignons de la classe

³ Plus d'informations à propos de Novozymes sur www.bioag.novozymes.com

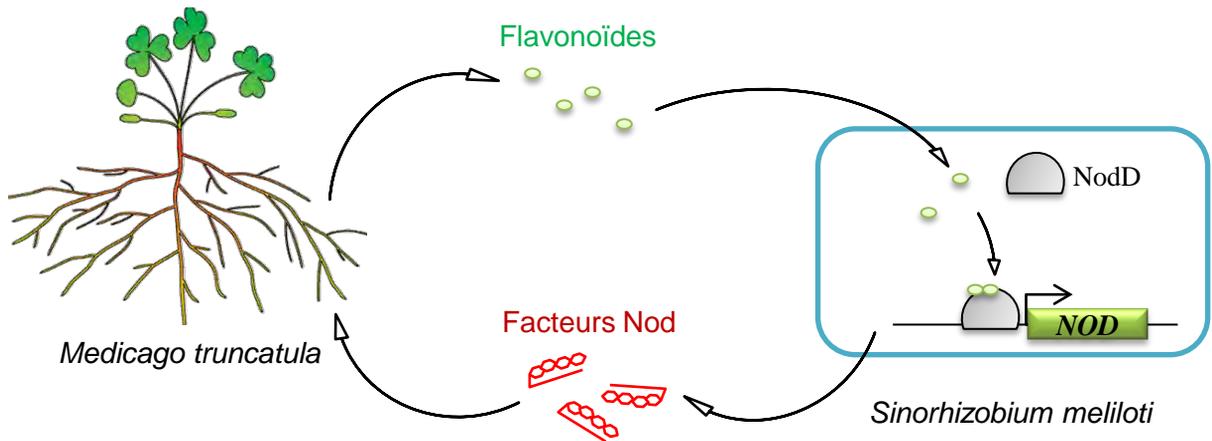


Figure 1.3 • Dialogue moléculaire entre *M. truncatula* et son symbionte rhizobien *Sinorhizobium meliloti*

Lors de la phase pré-symbiotique, les racines des plantes produisent des flavonoïdes qui sont perçus par la bactérie. Ces flavonoïdes permettent, avec la protéine NodD, d'activer la transcription de gènes de biosynthèse des facteurs Nod. Ceux-ci sont sécrétés dans la rhizosphère par la bactérie et perçus par la racine de la plante.

des Gloméromycètes. Cette capacité de mettre en place ces deux symbioses, ainsi que ses avantages scientifiques, font de cette plante un excellent modèle d'étude des interactions symbiotiques (Cook, 1999). En effet, la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, couramment utilisée pour étudier de nombreux phénomènes et mécanismes physiologiques chez les plantes, ne peut s'associer ni avec les rhizobia, ni avec les champignons MA.

2.2. La symbiose rhizobienne chez *Medicago truncatula*

2.2.a. Les symbiontes rhizobiens de *Medicago truncatula*

L'association symbiotique entre les légumineuses et les rhizobia est soumise à une grande spécificité d'hôte. Ainsi, *M. truncatula* ne peut s'associer qu'avec très peu d'espèces de rhizobia. Le symbionte rhizobien avec lequel *M. truncatula* s'associe de façon préférentielle est *Sinorhizobium meliloti*. Il a été observé plus rarement que cette plante pouvait également s'associer avec *Sinorhizobium medicae*. Ces bactéries sont aérobies de type gram-négatives, et font partie du groupe des α -protéobactéries (Masson-Boivin et al., 2009; Sprent and James, 2007).

2.2.b. La reconnaissance hôte-rhizobia

La mise en place de l'association entre *M. truncatula* et *S. meliloti* requiert un dialogue moléculaire préalable aux étapes développementales de la symbiose LR : il s'agit de la phase pré-symbiotique (Figure 1.3).

En premier lieu, les rhizobia présents dans la rhizosphère de façon libre perçoivent des molécules émises par les racines des plantes. Ces molécules sont des métabolites secondaires appartenant pour la plupart à la famille des flavonoïdes. Les flavonoïdes les plus courants émis par les plantes sont les chalcones, les flavanones, les flavones ou encore les isoflavones (Taylor and Grotewold, 2005). Toutefois, il a été montré que seul un (ou quelques) type(s) de flavonoïdes étaient reconnus par le partenaire rhizobien spécifique, ce qui induit un premier niveau de spécificité entre l'hôte et le symbiote. Ainsi, le flavonoïde le mieux reconnu par *S. meliloti* est la lutéoline (Peck et al., 2006; Peters et al., 1986).

Celle-ci induit chez la bactérie l'activation du gène NodD (Nodulation D), qui régule positivement la transcription de plusieurs gènes de biosynthèse, appelés gènes *Nod* (Perret et al., 2000), regroupés sur un plasmide symbiotique de la bactérie. Ces gènes sont responsables de la synthèse de molécules de type lipo-chitoooligosaccharidiques (LCO), appelées facteurs Nod (Lerouge et al., 1990), indispensables à la mise en place de la symbiose LR. Un autre niveau de spécificité est dû à la combinaison particulière de gènes *Nod* sur le plasmide, qui conditionne la structure précise du facteur Nod de *S. meliloti*. Seule la reconnaissance spécifique de la structure des facteurs Nod par la plante permet l'établissement de la symbiose LR (Roche et al., 1991). Les facteurs Nod peuvent donc être considérés comme une clé qui permet la spécificité d'hôte entre les rhizobia et les légumineuses (cf. point 3.1 de cette partie).

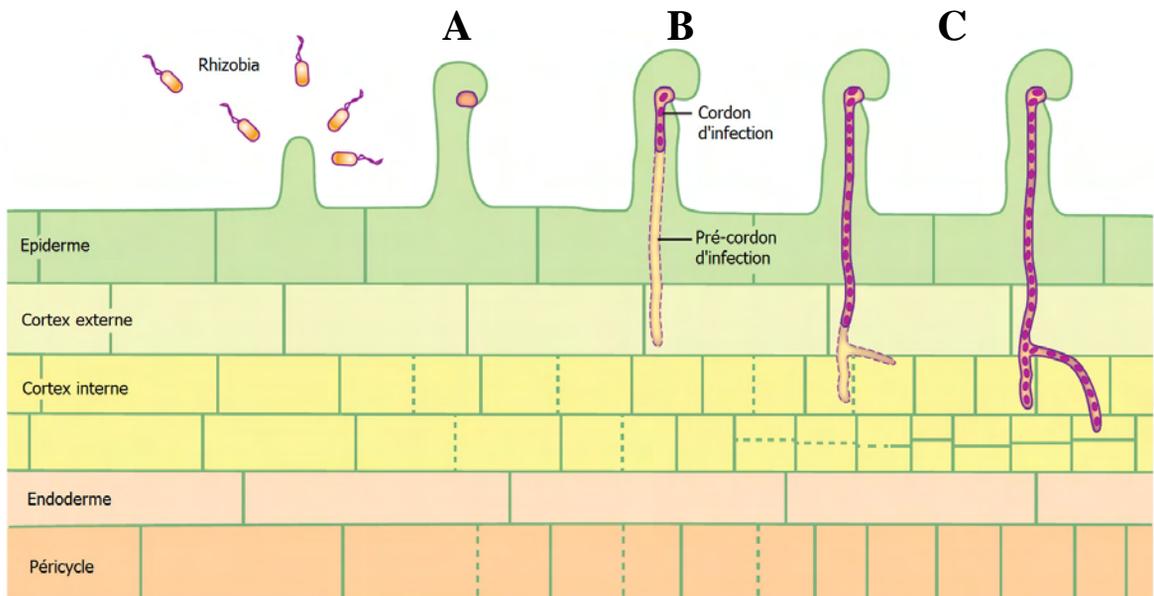


Figure 1.4 • Etapes précoces de l’infection rhizobienne et de l’organogénèse de la nodosité fixatrice d’azote

(A) Les rhizobia forment une micro-colonie au niveau d’un poil racinaire. Au même moment, des divisions anticlines (perpendiculaires à l’axe de la racine) se produisent dans le péricycle, l’endoderme (pas montré sur le schéma) et le cortex interne.

(B) Puis le pré-cordon d’infection se forme et traverse les couches d’épiderme et de cortex externe, rapidement suivi par le cordon d’infection contenant les rhizobia. Les divisions du cortex interne se poursuivent.

(C) Le cordon d’infection se ramifie et permet aux bactéries de coloniser les cellules du cortex interne. En parallèle, des division périclines (parallèles à l’axe de la racine) se produisent dans le cortex interne, formant le primordium de nodosité qui sera ensuite colonisé par les rhizobia pour y fixer l’azote.

D’après Oldroyd et al., 2011.

Lorsque les facteurs Nod de *S. meliloti* sont perçus par la racine de *M. truncatula*, ils induisent différentes réponses symbiotiques au niveau de celle-ci. En particulier, les facteurs Nod déclenchent deux processus parallèles, l'infection rhizobienne et l'organogénèse de la nodosité, qui doivent être parfaitement coordonnées (Oldroyd and Downie, 2008).

2.2.c. L'infection rhizobienne

L'infection permet aux rhizobia d'atteindre le primordium de la nodosité qui se développe en parallèle. Chez certains couples de plantes-rhizobia considérés comme plus ancestraux, l'infection peut se produire au niveau d'une blessure dans la racine (Goormachtig et al., 2004). Cependant, chez *M. truncatula*, l'infection se déroule par un processus plus complexe, le cordon d'infection.

Les réponses symbiotiques induites par les facteurs Nod produits par *S. meliloti* ont d'abord lieu dans l'épiderme (Figure 1.4), où l'on observe une déformation des poils absorbants au bout d'une heure en contact avec la bactérie. *S. meliloti* se fixe dans une courbure de poils en formant une micro-colonie. Le poil infecté s'enroule autour de cette micro-colonie, en formant la structure bien reconnaissable de la « crosse de berger ». Au niveau de la micro-colonie, la membrane du poil racinaire s'invagine et forme une structure tubulaire appelée cordon d'infection, au long duquel les bactéries vont progresser dans la cellule (Figure 1.4). Précédant le cordon d'infection, un pont cytoplasmique prépare l'élongation du cordon d'infection et le passage des bactéries (Fournier et al., 2008). Ce pont cytoplasmique, appelé pré-cordon d'infection, se prolonge dans le cortex et permet au cordon d'atteindre le cortex interne où il se ramifie (Figure 1.4 A) et colonise plusieurs cellules (Oldroyd and Downie, 2008). En parallèle du processus d'infection, des divisions ont eu lieu dans le cortex interne, formant le primordium de la nodosité (Figure 1.4).

Ensuite, les bactéries pénètrent individuellement dans le cytoplasme des cellules de ce primordium par un mécanisme d'endocytose. Ainsi enveloppées dans une membrane végétale, les bactéries vont progressivement se différencier en bactéroïdes, une forme qui leur permettra de fixer l'azote. Cette différenciation implique des modifications métaboliques, l'endoréduplication du génome, ainsi que l'expression de gènes liés à leur nouvelle fonction, notamment des gènes contrôlant la biosynthèse de l'enzyme nitrogénase (Kereszt et al., 2011). Chez *S. meliloti*, ce processus de différenciation est irréversible, les bactéries perdant alors leur capacité à se diviser. L'ensemble du (des) bactéroïde(s) fixateur(s) d'azote, entouré(s) par une membrane végétale à l'intérieur de la cellule végétale, est appelée symbiosome. Le développement des symbiosomes est en partie régulé par la plante, grâce à la production de peptides appelés NCR (*Nodule-specific Cysteine-Rich peptides*) dans le nodule, essentiels pour la différenciation des bactéries en bactéroïdes (Mergaert et al., 2003). Les peptides NCR servent également de filtre anti-microbien afin de favoriser uniquement le développement des bactéries symbiotiques et non d'éventuelles bactéries pathogènes. En effet, les rhizobia sont dotées du gène *BacA*, qui est nécessaire pour la résistance aux NCR (Haag et al., 2013).

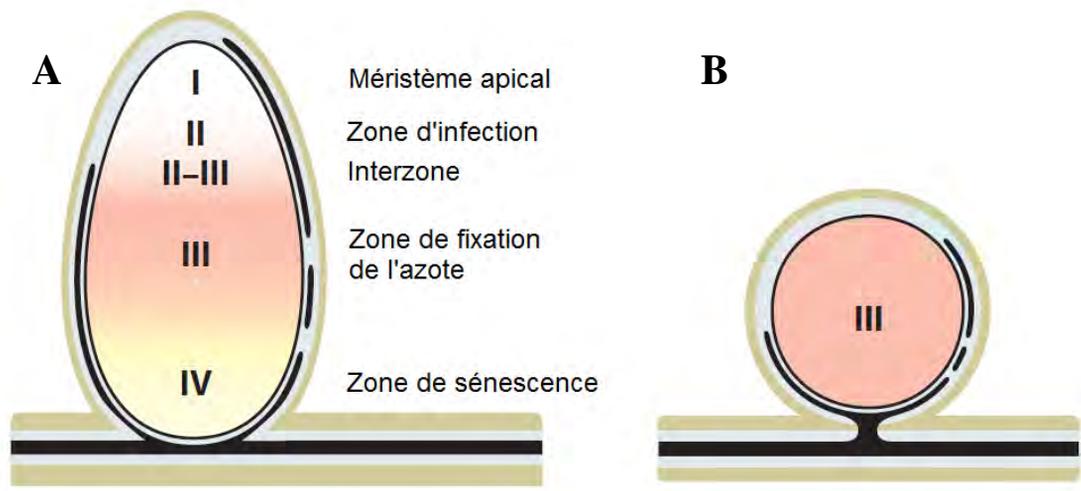


Figure 1.5 • Structures des nodosités indéterminées et déterminées

Shéma de coupes longitudinales de nodosité indéterminée (A) et déterminée (B). Les deux types de nodosité sont composés d'un système vasculaire périphérique (bandes noires).

(A) La nodosité indéterminée se compose de 5 zones : le méristème apical (I), la zone d'infection (II), l'interzone entre zone d'infection et de fixation (II-III), la zone de fixation de l'azote (III) et la zone de sénescence (IV).

(B) La nodosité déterminée présente une structure plus simple, comprenant uniquement une zone de fixation de l'azote. Elle ne présente pas de méristème.

D'après Kondorosi et al., 2013.

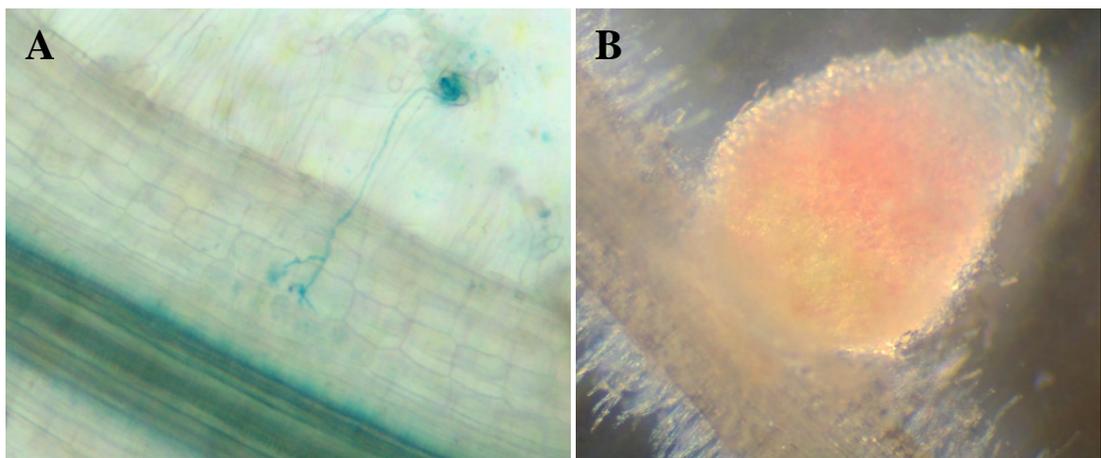


Figure 1.6 • Le cordon d'infection et la nodosité chez *M. truncatula*

(A) Photo de racine de *M. truncatula* présentant un cordon d'infection ramifié pénétrant dans la racine par un poil absorbant, observé au microscope.

(B) Photo d'une coupe longitudinale de racine de *M. truncatula* portant une nodosité mature (Source : Ninjatacoshell).

2.2.d. La nodosité fixatrice d'azote

Au sein des différentes associations légumineuses-rhizobia, différents types de nodosités peuvent se former. En général, elles sont réparties en deux groupes en fonction de leurs caractéristiques développementales : les nodosités déterminées et indéterminées. Les nodosités indéterminées conservent un méristème actif, et continuent de se développer jusqu'à leur sénescence. Elles présentent une forme allongée (Figures 1.5 A et 1.6 B). En revanche, dans les nodosités déterminées, le méristème cesse son activité dès les premiers stades de formation. Ces nodosités ont une structure plus simple et sont de forme sphérique (Figure 1.5 B). L'interaction entre *M. truncatula* et *S. meliloti* mène à la formation de nodosités indéterminées, c'est donc ce type de nodosités qui sera décrit.

• *Organogénèse*

Tandis que l'infection commence dans les tissus racinaires externes, les rhizobia produisant les facteurs Nod induisent également la dé-différentiation de cellules du péricycle, de l'endoderme et du cortex interne qui se divisent afin de former la nodosité, qui sera ensuite colonisée par les bactéries.

Le premier tissu de la racine activé par les facteurs Nod est le péricycle, situé au cœur de la racine, autour du cylindre central. Certaines cellules du péricycle, en face d'un pôle de protoxylème, présentent un réarrangement du cytosquelette (Timmers et al., 1999), puis entament des divisions anticlines⁴. Par la suite, quelques cellules de l'endoderme se divisent, puis des cellules du cortex interne sont activées et commencent à se diviser de façon anticline et péricline⁵, sous le site d'infection par les rhizobia (Complainville et al., 2003; Timmers et al., 1999). La prolifération des cellules corticales s'étend progressivement au cortex central, puis certaines cellules à ce niveau subissent plusieurs cycles de divisions formant une couche séparant les cellules contributrices du primordium de celles qui laisseront passer la nodosité lors de son émergence.

• *Structure*

La nodosité mature chez *M. truncatula* présente une vascularisation périphérique, rattachée aux vaisseaux conducteurs de la racine qui la porte. La nodosité est entourée de plusieurs assises cellulaires, dont l'endoderme et le cortex externe. Toutefois, au niveau de l'apex, seule une couche de cortex recouvre la nodosité. Cette dernière couche cellulaire correspond à la couche la plus externe de la nodosité. L'intérieur de la nodosité peut être décomposé en plusieurs zones (Figure 1.6 A). La partie la plus apicale (Zone I) correspond au méristème et donc à la zone de division de la nodosité. Dans la zone d'infection (Zone II), les bactéries sont libérées du cordon d'infection dans les cellules végétales par endocytose et commencent leur différenciation en bactéroïdes, puis les symbiosomes ainsi formés se retrouvent dans la

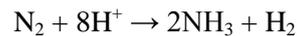
⁴ Division anticline : division dont l'axe est perpendiculaire à celui de l'organe dans lequel elle se produit, ici la racine primaire.

⁵ Division péricline : division dont l'axe est parallèle à celui de l'organe dans lequel elle se produit.

zone III, où se déroule la fixation de l'azote. La dernière partie de la nodosité (Zone IV) est appelée zone de sénescence, car les symbiosomes âgés y sont dégradés (Hirsch, 1992).

2.2.e. Les échanges de nutriments

La nodosité peut être assimilée à une interface à travers laquelle les deux partenaires symbiotiques procèdent à des échanges métaboliques. Les rhizobia, différenciés en bactéroïdes au cœur des symbiosomes mettent en œuvre la fixation de l'azote, c'est-à-dire la réduction de l'azote atmosphérique sous forme moléculaire (N_2) en le transformant en ammoniac NH_3 selon la réaction suivante :



Cette réaction est catalysée par l'enzyme nitrogénase, un complexe protéique composé de sous-unités de dinitrogénase et de dinitrogénase réductase. Ce complexe est dénaturé par le dioxygène, pourtant nécessaire à la respiration des rhizobia qui sont des organismes aérobies. Afin de fournir aux bactéries une réserve de dioxygène sans risquer de compromettre l'activité de la nitrogénase, la plante met en place des mécanismes. En particulier, elle produit une protéine fixatrice du dioxygène, la leghémoglobine, proche de l'hémoglobine humaine (Debilly et al., 1991). Cette dernière donne aux nodosités une couleur rose bien visible, qui atteste que les nodosités sont bien fixatrices.

En contrepartie, les rhizobia bénéficient dans la nodosité d'un micro habitat favorable, la plante leur procurant un apport en substrats carbonés issus de la photosynthèse. Ces substrats sont acheminés vers la nodosité via les vaisseaux conducteurs qui la relie à la racine de la plante.

2.3. La symbiose mycorhizienne à arbuscules (MA)

2.3.a. Les symbiontes mycorhiziens de *Medicago truncatula*

En plus de la symbiose LR, *M. truncatula* est capable de s'associer avec des champignons mycorhiziens à arbuscules (MA) appartenant au clade des Gloméromycètes. Étant donné que ces champignons possèdent un spectre d'hôte très large, de nombreuses espèces de plantes peuvent être colonisées par une même espèce de champignon. De même, différentes espèces peuvent s'associer avec *M. truncatula*. Parmi ces différents symbiontes fongiques, *Rhizophagus irregularis*⁶ sert généralement de modèle d'étude.

R. irregularis est un biotrophe obligatoire, et se trouve sous forme de spores lorsqu'il se retrouve dans le sol sans hôte végétal. Ses hyphes (cellules de mycélium fongique) ont la caractéristique d'être multi-nucléés, ce qui complexifie grandement l'étude de son génome, et la compréhension des mécanismes qui régissent l'interaction symbiotique. Toutefois, d'importantes avancées ont été réalisées ces dernières années sur l'étude du génome de ce champignon (Formey et al., 2012; Tisserant et al., 2012).

⁶ *Rhizophagus irregularis* était anciennement appelé *Glomus intraradices*

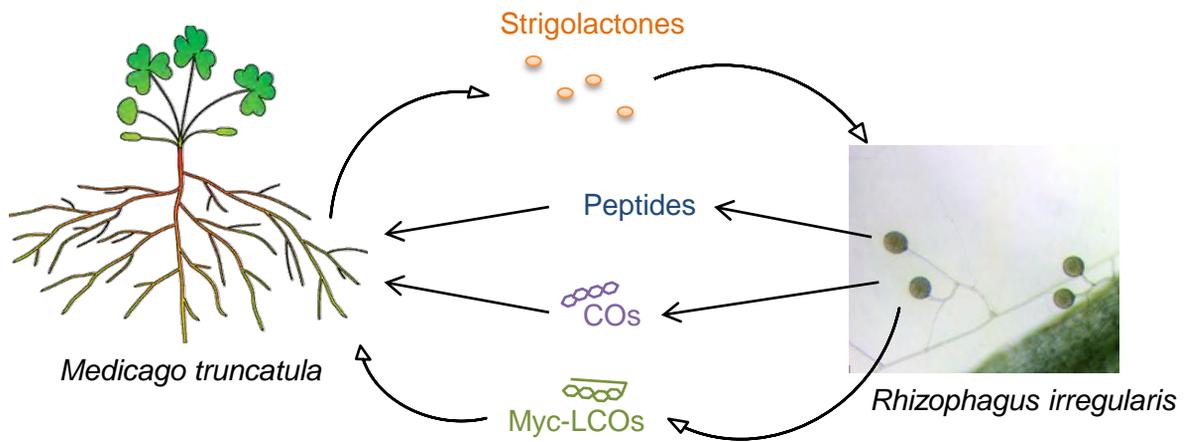


Figure 1.7 • Échange moléculaire entre *M. truncatula* et son symbiote fongique *Rhizophagus irregularis*

Des strigolactones produites par la racines de la plante activent le métabolisme et la ramification des hyphes des champignons MA, améliorant les conditions pour la symbiose MA. Le champignon *Rhizophagus irregularis* produit des facteurs Myc appelés Myc-LCOs, qui sont perçus pas la plante et améliorent la mycorhization et stimulent la ramification racinaire. On ignore pour le moment si les strigolactones stimulent la production de Myc-LCOs par le champignon. Des peptides et des chitoooligo-saccharides (COs) microbiens sont également responsables de réponses de la plante.

Photo (B) : F. Maillet.

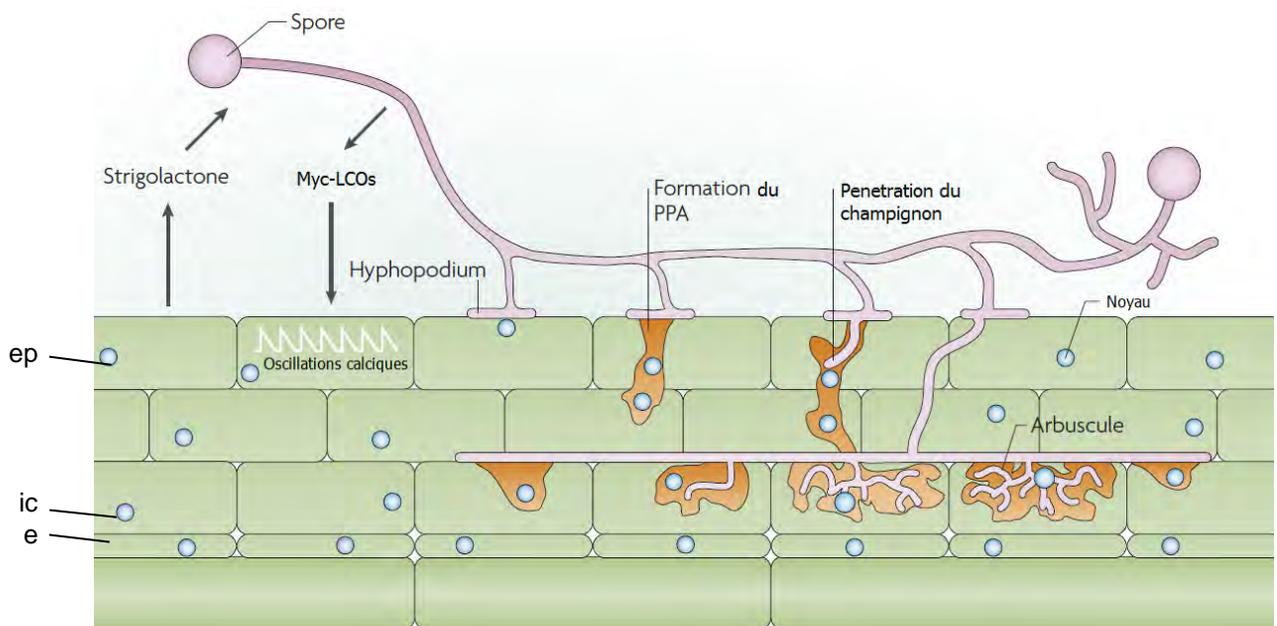


Figure 1.8 • Etapes d'infection et de colonisation par les champignon mycorhiziens à arbuscules chez *M. truncatula*

Après la phase pré symbiotique (effets des strigolactones et des Myc-LCOs), les champignons MA colonisent la surface de la racine, puis leurs hyphes se spécialisent en formant un organe d'infection, l'hyphopodium. Le noyau de la cellule infectée migre vers l'hyphopodium puis contribue à la formation d'un pont cytoplasmique appelé appareil de pré-pénétration (*Pre-Penetration Apparatus*, PPA). Ce PPA permet de guider l'hyphe du champignon à travers l'épiderme et le cortex. L'hyphe y entre par une invagination de la membrane plasmique. Puis l'hyphe colonise l'espace intercellulaire du cortex interne et se ramifie en formant des arbuscules, centre des échanges de nutriments dans les cellules corticales internes. ep: épiderme, ic: inner cortex, e: endoderme.

Adapté de Parniske, 2008.

2.3.b. La communication hôte-champignon mycorhizien à arbuscule

Tout comme pour la symbiose LR, il a été démontré qu'un échange de signaux préalable à l'établissement de la symbiose MA se déroule lors de la phase pré-symbiotique (Figure 1.7).

Il est démontré que la racine de la plante exsude des strigolactones, des molécules dérivées des caroténoïdes, qui jouent un rôle de médiation avec le champignon mycorhizien : elles activent le métabolisme du champignon et induisent la ramification de ses hyphes (Akiyama et al., 2005; Besserer et al., 2006). L'ensemble de ces réactions a pour effet indirect d'augmenter les chances de contact entre les hyphes du champignon et les racines de la plante. Les strigolactones sont également connues en tant qu'hormone végétale. En effet, elles régulent la ramification des parties aériennes (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008) et semblent impliquées dans la formation des racines latérales (*cf.* Introduction, partie 2). Les strigolactones sont par ailleurs connues depuis longtemps pour favoriser la germination des graines de plantes parasites des genres *Striga* et *Orobanche* (famille des Orobanchacées) (Cook et al., 1966).

Le champignon mycorhizien produit quant à lui des molécules diffusibles, appelés facteurs Myc, qui sont perçus par la plante. Parmi eux, les Myc-LCOs récemment identifiés présentent une structure moléculaire très similaire à celle des facteurs Nod, les signaux émis par les rhizobia (Maillet et al., 2011). Ils sont également des lipo-chitoooligosaccharides (LCOs). On ignore pour le moment si la synthèse de ces molécules est provoquée par les strigolactones, ou par un autre signal provenant de la plante. Les champignons MA produisent d'autres molécules proches, les chitoooligosaccharides (COs), également perçus par la plante, qui pourraient jouer un rôle dans la mycorhization et dont la production est stimulée par les strigolactones (Genre et al., 2013). Parallèlement à ces molécules, des peptides sécrétés par les champignons MA (appelés SP7 pour *Secreted Protein 7*) sont des signaux permettant de contrecarrer les mécanismes de défense de la plante afin de favoriser son interaction avec celle-ci (Kloppholz et al., 2011). De façon intéressante, il est également montré qu'un peptide similaire, MiSSP7 (MYCORRHIZAL INDUCED SMALL SECRETED PROTEIN 7) est produit par le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor*, et joue un rôle d'effecteur sur la plante (Plett et al., 2011) : l'absence de ce peptide est délétère pour la mise en place de la symbiose ectomycorhizienne entre *L. bicolor* et ses hôtes *Populus sp.* (Peuplier).

Les Myc-LCOs induisent des réponses au niveau de la racine. Particulièrement, ils stimulent la mycorhization et la formation des racines latérales (Maillet et al., 2011). Toutefois, on ne sait pas s'ils sont indispensables à la mise en place de la symbiose MA, comme c'est le cas des facteurs Nod pour la symbiose LR, en raison des difficultés à réaliser des études génétiques chez le champignon MA.

2.3.c. L'infection par le champignon mycorhizien à arbuscule

Les premières étapes de l'infection de la racine par le champignon MA sont une colonisation de la surface de la racine par le mycélium (Figure 1.8). Au niveau de la zone d'infection, les hyphes

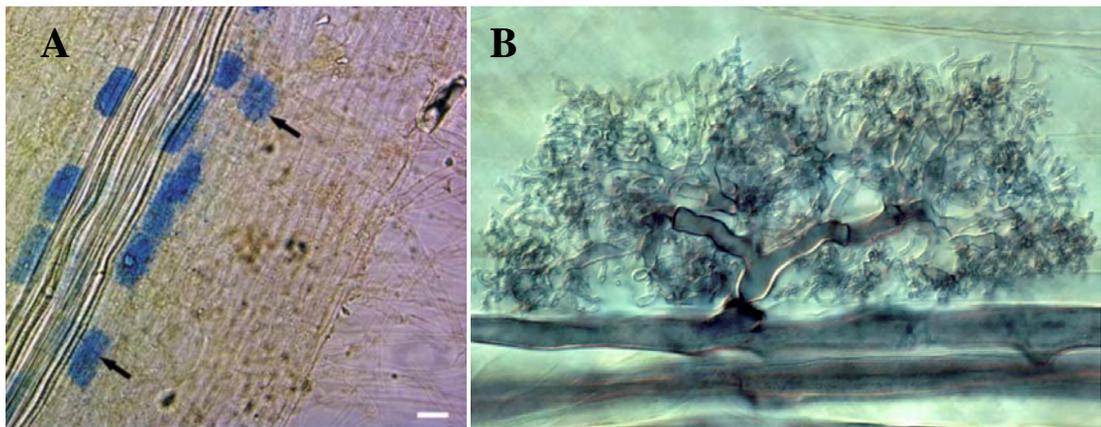


Figure 1.9 • Les arbuscules dans la racine de *M. truncatula*

(A) Observation microscopique d'une racine de *M. truncatula* infectée par un champignon MA. Les arbuscules, colorées en bleu, sont visibles dans le cortex interne de la racine.

(B) Photo au microscope d'une arbuscule, correspondant à un hyphe ayant subi beaucoup de ramifications, formant une structure très fine, en intime contact avec la membrane de la cellule végétale.

Sources photos : Harrison et al., 2005 (A), MC Brundrett (B)

s'élargissent en longeant les cellules de l'épiderme et forment un appressorium (organe de pénétration), appelé aussi hyphopodium (Genre et al., 2005). Ensuite peut être observée une invagination de la cellule épidermique en contact avec l'hyphopodium, et l'apparition dans celle-ci d'une structure constituée d'un squelette de microtubules formant un pont cytoplasmique. Ce dernier, appelé « appareil de pré-pénétration » précède le passage de l'hyphe qui pourra ainsi pénétrer l'épiderme, puis les couches externes du cortex (Genre et al., 2005). Il est intéressant de constater la similarité de l'appareil de pré-pénétration et du pré-cordon d'infection permettant la pénétration des rhizobia dans les cellules (Parniske, 2008), un signe du recrutement des mécanismes de la symbiose MA par la symbiose LR.

Lorsque le champignon atteint les cellules corticales internes, les hyphes se ramifient et colonisent l'espace intercellulaire (Figure 1.8). Une fois que la colonisation des tissus interne est assez importante, les hyphes pénètrent dans les cellules corticales internes par invagination de la membrane végétale, en formant des structures très fines ramifiées appelées arbuscules (Figure 1.9). Ces structures sont une interface d'échange métabolique entre la plante et le champignon. Le développement des arbuscules est un processus dynamique et contrôlé par la plante. Au bout de quelques jours, les arbuscules entrent en sénescence et sont dégradées. La cellule infectée reprend un fonctionnement normal et peut à nouveau être infectée.

2.3.d. Les échanges de nutriments

Les arbuscules sont séparés de la cellule végétale par un espace péri-arbusculaire qui permet les échanges métaboliques entre les deux partenaires symbiotiques. Le mycélium du champignon MA continue de se développer dans la rhizosphère, et y prélève des nutriments et de l'eau, les transporte, puis les transfère à la plante via les arbuscules, ce qui a pour effet d'élargir le volume de sol disponible pour la plante (Parniske, 2008). Le champignon permet notamment à la plante de bénéficier de phosphate et d'azote. En contrepartie, la plante transfère au champignon une partie des substrats carbonés issus de sa photosynthèse : Il est estimé que 20% du carbone produit par la plante est transmis au champignon (Bago et al., 2000).

L'assimilation du phosphate est le bénéfice principal que la plante retire de la symbiose MA. Elle met en jeu un gène de *M. truncatula*, *PT4* (*PHOSPHATE TRANSPORTER 4*), exprimé dans les cellules contenant des arbuscules. Il code pour un transporteur de phosphate, présent dans la membrane péri-arbusculaire (Harrison et al., 2002; Pumplin et al., 2012). Par ailleurs, le champignon est capable de puiser dans les ressources d'azote du sol, notamment sous forme d'ammoniac (NH_3), et de le transférer à la plante, via l'arbuscule (Guether et al., 2009).

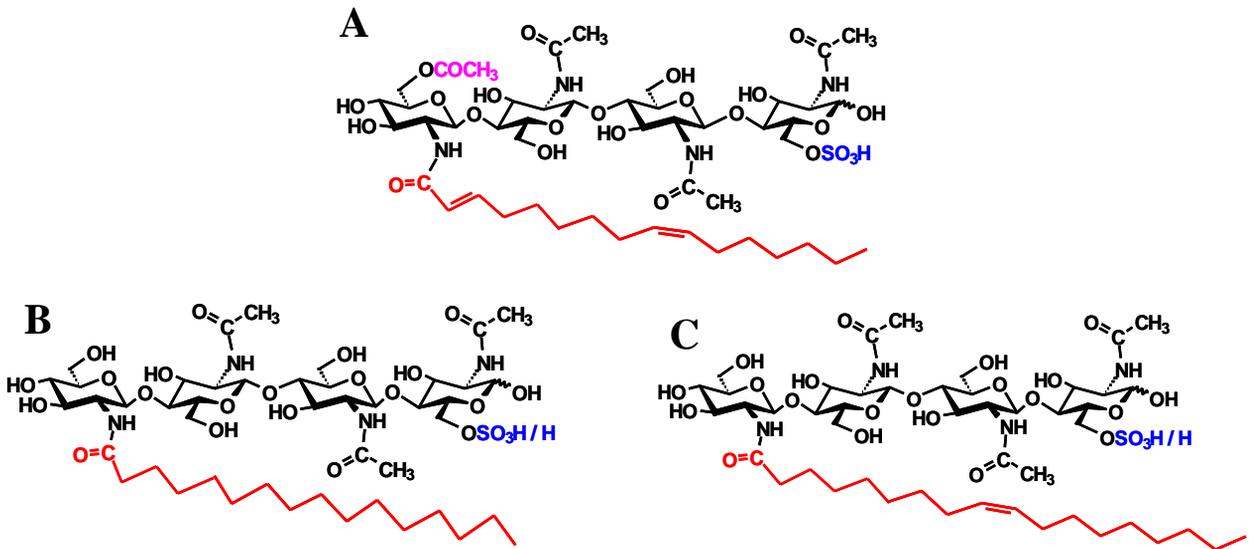


Figure 1.10 • Structure chimique des facteurs Nod de *S. meliloti* et des Myc-LCOs de *R. irregularis*

Structure schématique des facteurs symbiotiques Nod et Myc-LCOs, composés d'un tétramère (plus rarement d'un pentamère) de N-acétyl-glucosamine et d'un chaîne d'acide gras (rouge).

(A) Facteurs Nod majoritaires produits par *Sinorhizobium meliloti*, portant un groupe sulfate (bleu), un groupe acétate (rose) et un acide gras C16:2.

(B et C) Formes majoritaires de Myc-LCOs produits par *Rhizophagus irregularis*, portant ou non un groupe sulfate (bleu), avec un acide gras C16:0 (B) ou C18:1 (C).

D'après Gough et Cullimore, 2011 et Maillet et al., 2011.

3. Contrôle et régulation des symbioses chez *Medicago truncatula*

3.1. Les facteurs symbiotiques de type lipo-chitooligosaccharidiques (LCO)

3.1.a. Historique

Lors de la symbiose entre *M. truncatula* et *S. meliloti*, les facteurs symbiotiques émis par les rhizobia en réponse à la lutéoline, les facteurs Nod, déterminent la spécificité de reconnaissance entre les deux partenaires. Depuis 1990, il est connu que la structure de ces molécules lipo-chitooligosaccharidiques (LCOs), et particulièrement les substitutions des sucres réducteur et non-réducteur, contribuent de façon stringente à cette spécificité (Roche et al., 1991). Plus tard, il a été découvert que ces molécules, en plus de stimuler des réponses symbiotiques, entraînaient également des réponses développementales. En effet, il s'est avéré que les facteurs Nod, appliqués purs en l'absence du symbionte rhizobien, stimulaient la formation des racines latérales chez *M. truncatula* (Olàh et al., 2005) (*cf.* Partie C de cette introduction).

Dans les mêmes travaux, il a également été remarqué qu'un facteur diffusible, émis par les champignons MA, permet de stimuler la mycorhization et possède, comme les facteurs Nod, la faculté de stimuler la formation des racines latérales. En attendant de découvrir la nature de ces signaux, ils ont été appelées facteurs Myc, par analogie avec les facteurs Nod.

Récemment, Maillet et coll. ont isolé des LCOs produits par le champignon MA *Rhizophagus irregularis*, possédant les effets décrits des facteurs Myc sur *M. truncatula*. Ces molécules, les Myc-LCOs, présentent une structure moléculaire très similaire à celle des facteurs Nod (Figure 1.10) (Maillet et al., 2011). Ces Myc-LCOs se composent de plusieurs types de molécules aux substitutions différentes.

L'extraction des Myc-LCOs est réalisée à partir d'exsudats de spores du champignon *R. irregularis* ou de racines mycorhizées. En raison des faibles quantités de Myc-LCOs produits, et pour faciliter les études sur ces molécules, des Myc-LCOs ont été synthétisés à l'aide de la bactérie facilement manipulable *Escherichia coli*, ainsi que de rhizobia génétiquement modifiés pour produire des molécules similaires aux Myc-LCOs (Maillet et al., 2011). Un mélange a été constitué afin de mimer au mieux les proportions des Myc-LCOs naturels produits par le champignon.

3.1.b. Structure chimique et spécificité d'hôte

Les facteurs Nod majoritaires produits par *S. meliloti* (Figure 1.10 A) sont constitués d'un tétramère (4 groupements) de N-acétyl-glucosamine formant une chaîne courte de chitine. Ils sont caractérisés par la présence d'un acide gras de type C16:2 (16 carbones et deux insaturations) et d'un groupement acétyle sur le sucre non réducteur, et par un groupement sulfate sur le sucre réducteur.

Ces facteurs Nod permettent d'établir la symbiose entre *S. meliloti* et son hôte *M. truncatula*. Il a été démontré que la présence du groupement sulfate était indispensable à la perception des facteurs Nod par la plante (Roche et al., 1991). Chez les rhizobia, les facteurs Nod sont pourvus d'un acide gras différent

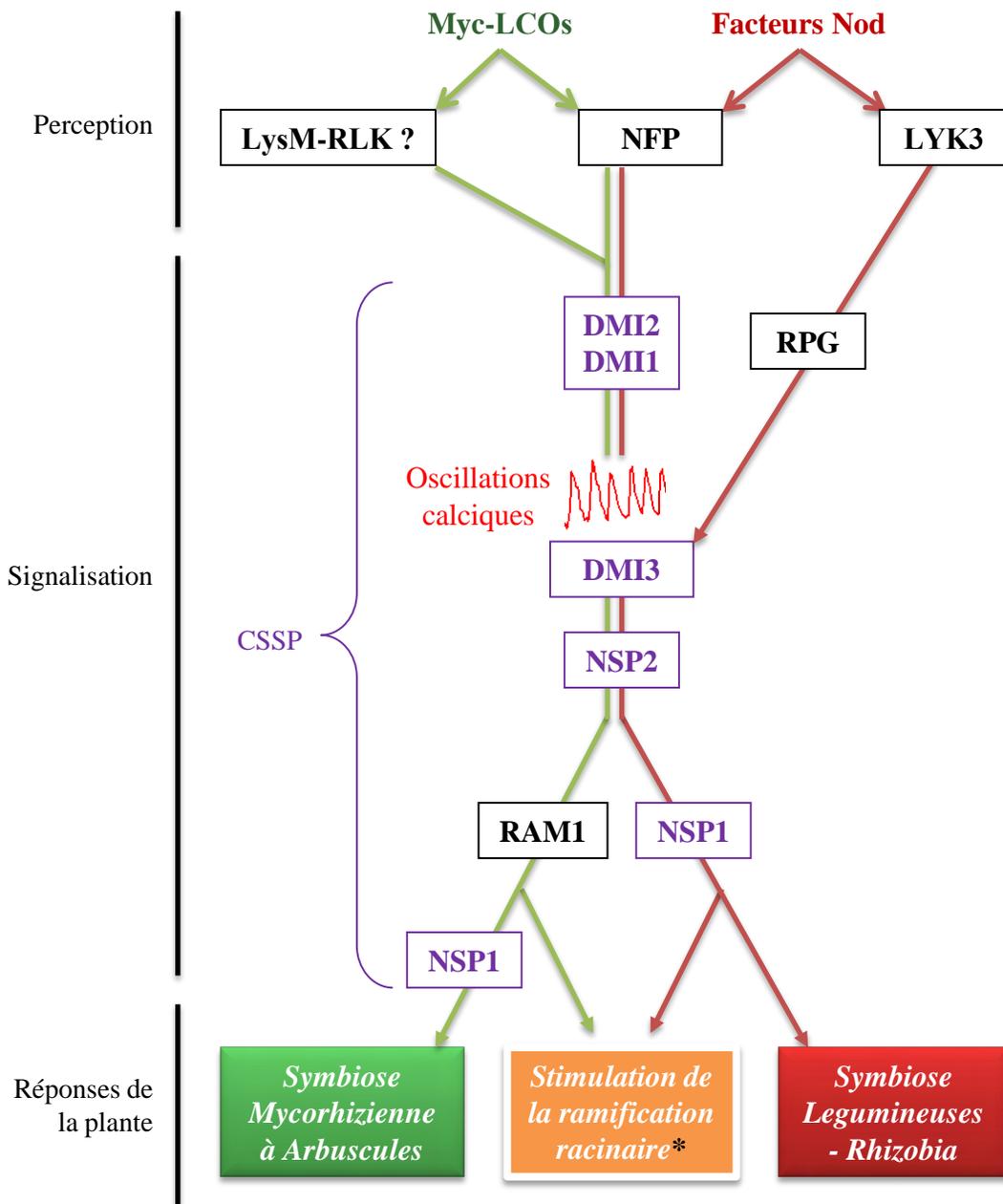


Figure 1.11 Modèle de perception et de signalisation précoce des facteurs Nod et des Myc-LCOs chez *M. truncatula*

Des protéines de type LysM-RLK jouent le rôle de perception (NFP, LYK3, et une protéine inconnue percevant les Myc-LCOs). La transduction du signal se fait par DMI2 et DMI1, nécessaires à la production d'oscillation calciques dans le noyau (rouge). Celles-ci sont décodées par la protéine DMI3. Après l'intervention des facteurs de transcription NSP2 et NSP1, les voies menant aux deux symbioses divergent, mais conduisent toutes deux à la stimulation de la ramification racinaire. La voie DMI-NSP est appelée CSSP, et les gènes qui sont supposés y appartenir sont en violet. Une voie parallèle mène à l'infection rhizobienne au cours de la symbiose LR, et est contrôlée par le récepteur LYK3 et la protéine RPG. D'autres protéines sont impliquées dans la réponse symbiotique aux facteurs Nod et aux Myc-LCOs, mais ne sont pas incluses dans ce modèle.

*Les éléments génétiques concernant la régulation de la ramification racinaire seront détaillés dans la partie C de cette Introduction

(longueur et/ou saturation), et de substitutions variées (groupes acétyle, méthyle, sulfate, fucosyle, carbamyle, *etc.*) permettant la spécificité de reconnaissance hôte-rhizobia (Denarie et al., 1996; Perret et al., 2000).

Chez d'autres couples hôte/symbionte, les rhizobia sont pourvus d'un spectre d'hôte plus large, permettant leur association avec un plus grand nombre d'espèces de plantes (Pueppke and Broughton, 1999). Dans de rares cas, la symbiose LR peut être indépendante de l'action des facteurs Nod, ce qui suggère la présence d'autres voies de signalisation. C'est le cas de plantes du genre *Aeschynomene* avec leur symbionte *Bradyrhizobium sp.* (Giraud et al., 2007).

Les Myc-LCOs identifiés jusqu'à présent rassemblent plusieurs molécules, avec une chaîne de N-acétyle glucosamine tétra- ou pentamérique, sulfatés ou non sulfatés, donc l'acide gras peut être oléique (C18:1) ou palmitique (C16:0). Étant donné que le groupement sulfate semble être importante pour la reconnaissance d'un large éventail de plantes hôtes, et notamment pour *M. truncatula* (Gough and Cullimore, 2011), les Myc-LCOs synthétiques sont divisés en deux groupes : les Myc-LCOs sulfatés et non-sulfatés (Figure 1.10 B et C).

3.1.c. Perception des LCOs

Les premières réponses observables au niveau de la plante en réponse aux symbiontes bactériens ou fongiques sont un influx de calcium dans les poils absorbants racinaires, suivis d'oscillations calciques dans le noyau (Sieberer et al., 2012; Sieberer et al., 2009). Afin de stimuler ces réponses, les rhizobia sont perçus dans une zone particulière de la racine, qui correspond à la zone où des poils racinaires sont en croissance (Bhuvaneswari et al., 1981).

Chez *M. truncatula*, deux gènes de la famille des LysM-RLK (*Lysine Motif Receptor-Like Kinase*) ont été mis en évidence comme indispensables à la perception des facteurs Nod (Figure 1.11) : *NFP* (*NOD FACTOR PERCEPTION*) et *LYK3* (*LysM-RLK 3*) (Amor et al., 2003; Arrighi et al., 2006; Catoira et al., 2000; Smit et al., 2007). Les protéines NFP et LYK3 sont toutes deux constituées d'un domaine kinase intracellulaire, d'un domaine transmembranaire, et de trois domaines LysM extracellulaires. NFP présente une kinase inactive, contrairement à LYK3. Récemment, il a été montré que NFP et LYK3 interagissent de façon fonctionnelle chez *Nicotiana bentamiana* (Pietraszewska-Bogiel et al., 2013). Par ailleurs, une étude a montré l'importance du second domaine LysM de NFP dans l'infection rhizobienne (Bensmihen et al., 2011). En ce qui concerne LYK3, il a été montré que ce récepteur participe à la reconnaissance de l'acide gras des facteurs Nod (Smit et al., 2007). Pour le moment, aucune de ces protéines n'a démontré de liaison directe avec les facteurs Nod. En revanche, la protéine LYR3, également un récepteur de type LysM-RLK, a été récemment montrée comme capable de lier les facteurs Nod avec une haute affinité (Fliegmann et al., 2013).

Étant donnée la forte similarité de structure entre les facteurs Nod et les Myc-LCOs, il est probable que ces derniers soient également perçus par des récepteurs de type LysM-RLK. Les mutants *nfp* et *lyk3* ne sont pas affectés dans la mycorhization, ce qui montre que la voie de signalisation menant à la

symbiose MA ne dépend pas de *NFP* ou de *LYK3*. Toutefois, la stimulation de la formation des RL en réponse aux Myc-LCOs est absente chez les mutants *nfp* (Maillet et al., 2011), ce qui indique qu'*NFP* pourrait tout de même être impliqué dans la voie de réponse aux Myc-LCOs, mais laisse supposer qu'un autre récepteur joue ce rôle de manière redondante. Des études sont actuellement en cours dans l'équipe afin de mettre en évidence ce ou ces récepteur(s).

3.1.d. Signalisation et réponse aux LCOs

Grâce à des cribles génétiques, plusieurs gènes ont été découverts comme étant requis dans la transduction du signal en réponse aux facteurs Nod menant à la symbiose LR (Catoira et al., 2000; Duc and Messenger, 1989). De façon intéressante, plusieurs de ces gènes sont également requis pour la symbiose MA (Ané et al., 2002; Catoira et al., 2000; Sagan et al., 1995), ce qui a mené à la description d'une voie de signalisation symbiotique commune (CSSP pour *Common Symbiotic Signalling Pathway*), appuyant l'hypothèse selon laquelle les légumineuses ont recruté un ancien mécanisme symbiotique déjà existant pour la symbiose MA.

La CSSP comprends trois gènes *DMI* (*DOES NOT MAKE INFECTIONS*) 1, 2 et 3 et le gène *NSP2* (Figure 1.11). Le gène *DMI2* code pour un récepteur de type LRR-RLK (Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinase) exprimé au niveau de la membrane plasmique aux alentours du cordon d'infection et des symbiosomes dans la nodosité. Ce gène semble nécessaire à la formation des symbiosomes (Limpens et al., 2005). Le gène *DMI1* code pour un canal ionique localisé au niveau de la membrane nucléaire (Venkateshwaran et al., 2008). Une voie parallèle à *NFP*, *DMI1* et *DMI2* semble contrôler l'infection par les rhizobia, et implique le récepteur *LYK3* et le gène *RPG* (*RHIZOBIUM-DIRECTED POLAR GROWTH*) (Arrighi et al., 2008).

DMI2 et *DMI1* sont tous deux nécessaires à la génération des oscillations calciques qui ont lieu dans le noyau, en réponse aux facteurs Nod et aux Myc-LCOs (Ané et al., 2004; Wais et al., 2000). Ces oscillations calciques (« *Calcium spiking* ») semblent impliquées dans la formation des ponts cytoplasmiques (appareil de pré-pénétration et pré-cordon d'infection) permettant la pénétration des symbiontes fongiques et rhizobiens au cœur de la racine (Sieberer et al., 2012).

En aval des oscillations calciques intervient le gène *DMI3*, qui a été décrit comme responsable du décodage de ces oscillations (Levy et al., 2004; Wais et al., 2000). La protéine *DMI3* est une kinase de type CCaMK (*Calcium and CalModuline-dependent Kinase*), localisée dans le noyau de la cellule. Sa sensibilité au calcium lui permet de décoder le signal calcique, et son domaine kinase permet d'activer, en phosphorylant des cibles, la voie de signalisation appropriée. Récemment, il a été démontré que *DMI3* est nécessaire à la fois dans l'épiderme et dans le cortex, et participe à la coordination des processus d'infection et d'organogénèse de la nodosité lors de la symbiose LR (Rival et al., 2012).

La CSSP menant aux symbioses LR et MA comprend, en aval de *DMI3*, l'intervention des facteurs de transcription *NSP 1* et *2* (*NODULATION SIGNALING PATHWAY 1* et *2*). Ces protéines

appartiennent à la famille des facteurs de transcription de type GRAS (*GAI/RGA/SCR*⁷) spécifique aux plantes (Hirsch and Oldroyd, 2009). Les gènes *NSP1* et *NSP2* ont été longtemps décrits comme spécifiques à la symbiose LR (Wais et al., 2000), mais ont récemment été décrits comme impliqués aussi dans la symbiose MA (Delaux et al., 2013; Maillet et al., 2011).

En aval de la CSSP, la signalisation bifurque et devient spécifique, soit du signal facteur Nod menant à la symbiose LR, soit du signal Myc-LCOs menant à la symbiose MA (Figure 1.11). Il a notamment été décrit que le gène *RAM1* (*REQUIRED FOR ARBUSCULAR MYCORRHIZATION 1*), était requis spécifiquement pour la symbiose MA (Gobbato et al., 2012). La protéine RAM1 fait également partie de la famille des facteurs de transcription de type GRAS, et semble impliquée dans la formation de complexes avec NSP2, activant la transcription de gènes symbiotiques (Gobbato et al., 2012). Ces signalisations parallèles mènent à l'activation de gènes symbiotiques, en particulier les gènes *ENOD* (*EARLY NODULIN*) en réponse aux facteurs Nod. L'implication de NSP1 dans la CSSP reste à préciser, mais le rôle de NSP1 dans la synthèse des strigolactones est compatible avec un rôle dans la symbiose MA (Liu et al., 2011).

D'autres gènes et facteurs de transcription ont été décrits comme étant impliqués dans les voies spécifiques symbiotiques, surtout en ce qui concerne la symbiose LR (Murray, 2011; Oldroyd et al., 2011). Des études sont en cours afin de mettre en évidence de nouveaux gènes impliqués dans la symbiose MA.

3.2. Le contrôle hormonal des symbioses chez *M. truncatula* et d'autres plantes

Si les travaux démontrant l'importance de la régulation hormonale pour la mise en place de la symbiose LR sont nombreux (Ferguson and Mathesius, 2003), ils sont en revanche rares en ce qui concerne la régulation de la symbiose MA. Au vu du peu d'études disponibles chez *M. truncatula* dans ces régulations, nous nous sommes également intéressés aux résultats obtenus chez d'autres plantes. Nous nous sommes intéressés ici à certaines hormones (auxine, cytokinines, éthylène, acide abscissique, strigolactones et acide gibbérellique), mais les effets d'autres hormones sur les symbioses LR et AM ont été résumés dans des articles de synthèse (Ferguson and Mathesius, 2003; Hause et al., 2007).

3.2.a. L'auxine

La phytohormone auxine est indispensable à la symbiose LR, à différents niveaux. En tant que régulateur clé du développement des organes racinaires, l'auxine (Acide Indole Acétique, AIA) joue un rôle important dans le développement de la nodosité (Mathesius, 2008). En premier lieu, il a été montré que les rhizobia étaient capables de produire de l'auxine, de même que de nombreux autres microorganismes, et que cet apport d'auxine exogène pouvait contribuer à la formation des nodosités

⁷ D'après le nom des trois premiers gènes identifiés de cette famille : *GAI* (*GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE*), *RGA* (*REPRESSOR OF GAI*) et *SCR* (*SCARECROW*).

(Spaepen et al., 2007). La production d'AIA par le symbionte peut être induite par des flavonoïdes produits par la plante, également impliqués dans la synthèse de facteurs Nod (Theunis et al., 2004). Par ailleurs, il a été montré que des applications d'AIA sur des plantes non-légumineuses peuvent induire la formation de structures ressemblant à des nodosités (Rightmyer and Long, 2011). Cette production d'auxine par les rhizobia semble faire partie d'un ancien mécanisme d'altération du système racinaire par des microorganismes non-symbiotiques ou symbiotiques.

Outre ce mécanisme, la formation des nodosités est également dépendante de l'auxine endogène, et particulièrement de son transport polarisé dans la plante. En effet, il a été démontré chez *Trifolium repens* que les rhizobia induisent une modification du transport d'auxine de la racine, et provoquent une accumulation locale d'auxine en amont de la zone d'application des rhizobia. En effet, une application locale d'inoculum de rhizobium provoque une altération locale du gradient d'auxine, observable par le profil d'expression du gène rapporteur *GH3:GUS* (Mathesius et al., 1998). De plus, chez *M. truncatula*, il a été observé que l'expression d'homologues du transporteur *AUX1 (AUXINE RESISTANT 1)* d'*A. thaliana* était induite en réponse à l'inoculation par des rhizobia (de Billy et al., 2001), suggérant que l'accumulation d'auxine en réponse aux rhizobia puisse être contrôlée par ce type de transporteur d'influx. Par ailleurs, l'application d'inhibiteurs du transport polaire de l'auxine, tels le NPA (*Naphthylphthalamic Acid*), peut induire la formation de structures ressemblant à des nodosités, et l'activation de gènes symbiotiques de type *ENOD* (Hirsch et al., 1989; Rightmyer and Long, 2011), confirmant l'implication du transport polaire dans l'organogénèse du nodule. L'auxine est également impliquée dans la formation de la vasculature de la nodosité chez *M. truncatula* (de Billy et al., 2001; Guan et al., 2013). Notamment, un gène codant pour un facteur de transcription de type bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*), *MtHHLH1*, induit par l'auxine, a été identifié comme impliqué dans la formation du système vasculaire du nodule et dans les échanges de nutriments entre les bactéries et la plante (Godiard et al., 2011). Pour finir, la construction sensible à l'auxine *DR5:GFP* a été utilisée pour étudier la réponse à l'auxine au cours du développement de la nodosité : ce travail a démontré que l'auxine s'accumulait seulement lors de la prolifération des cellules corticales (Suzaki et al., 2012), corroborant le rôle de l'auxine au cours des divisions cellulaires de la nodosité.

Au niveau de la symbiose MA, les mécanismes de régulation hormonales sont pour le moment peu compris. Cependant, il a été démontré que la signalisation auxinique est importante pour les stades précoces de la symbiose MA, par exemple en étudiant la mycorhization par *Rhizophagus irregularis* du mutant *diageotropica* de *Solanum lycopersicum* (Tomate) affecté dans la sensibilité à l'auxine (Hanlon and Coenen, 2011). Les racines du mutant *diageotropica* sont affectées dans l'infection par le champignon, mais ne présentaient *a priori* pas de phénotype au niveau du développement des arbuscules. De la même façon, le mutant insensible à l'auxine *bushy* de *Pisum sativum* (Pois) présente une colonisation mycorhizienne réduite mais pas d'effet sur le développement des arbuscules, démontrant là aussi un effet précoce de l'auxine sur la symbiose MA (Foo, 2013). Enfin, il a récemment été montré chez *M. truncatula* que le gène *MtIAA27*, appartenant à la famille des Aux/IAA liés à la signalisation de

l'auxine, est surexprimé dans les racines mycorhizées, ainsi que son plus proche homologue *SHIAA27* chez *S. lycopersicum* (Bassa et al., 2013).

3.2.b. Les cytokinines

Les cytokinines (CK) sont l'un des principaux régulateurs de la symbiose LR (Frugier et al., 2008). Elles ont un effet positif sur la formation des nodosités. Chez *M. truncatula*, le gène *MtCRE1*, codant pour un récepteur aux CK, a été décrit comme impliqué à la fois dans le processus d'infection et dans le mécanisme de formation de la nodosité. Les plantes portant une construction RNAi (*knockdown*) de *MtCRE1* montrent un blocage partiel des infections dans les poils absorbants racinaires, ainsi qu'une importante réduction des divisions corticales associées à la formation de la nodosité (Gonzalez-Rizzo et al., 2006). De façon globale, les CK semblent jouer un rôle dans la coordination de ces deux programmes. Cette coordination pourrait être liée à sa régulation dans le cortex par la voie de signalisation symbiotique (Rival et al., 2012). Les CK, via le récepteur MtCRE1, ont été montrées comme requises afin d'intégrer des signaux rhizobiens, mais également d'autres hormones végétales, afin de contrôler l'organogénèse de la nodosité (Plet et al., 2011). De plus, les CK induisent chez *M. truncatula* plusieurs gènes symbiotiques tels que les gènes codant pour des facteurs de transcription *NSP2*, *NIN* (*NODULE INCEPTION*), et *ERN1* (*ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT-BINDING FACTOR (ERF) REQUIRED FOR NODULATION 1*).

En ce qui concerne les divisions corticales, il est très bien connu que les CK interagissent avec l'auxine pour réguler les divisions cellulaires. Le gène *MtARR4*, fonctionnant en aval de *MtCRE1*, est notamment impliqué dans la voie de réponse au CK menant à la formation de la nodosité. Toutefois, les CK induisent un effet différent sur l'organogénèse de la nodosité et sur le développement de la racine latérale (Ariel et al., 2010; Gonzalez-Rizzo et al., 2006; Plet et al., 2011).

De façon intéressante, il a été constaté que certaines formes de CK peuvent être produites par les rhizobia, montrant que les bactéries peuvent stimuler la voie de régulation positive des CK chez la plante, afin de stimuler l'infection (Kisiala et al., 2013). Il est possible aussi que les rhizobia aient recruté cette capacité de produire des molécules similaires aux cytokinines afin de shunter une partie de la voie de signalisation en réponse aux facteurs Nod.

Très peu de travaux sont pour le moment disponibles au sujet de la régulation de la symbiose MA par les CK. Le mutant de perception des CK, *Mtcre1-1*, ne semble *a priori* pas affecté dans la mycorhization (F. Frugier, 10th European Nitrogen Fixation Conference, Munich, Septembre 2012). Il a été observé que la quantité de CK augmentait dans les plantes colonisées par un champignon MA, mais il n'est pas décrit si ces CK sont d'origine fongique ou végétale (Barker and Tagu, 2000).

3.2.c. L'éthylène

L'éthylène joue le rôle d'inhibiteur de l'infection rhizobienne et de la formation de la nodosité. Il réduit l'initiation des cordons d'infections et les oscillations calciques en réponse aux facteurs Nod (Oldroyd et al., 2001). Il régule également la position des primordia de nodosités au sein de la racine

principale (Heidstra et al., 1997). Chez *M. truncatula*, le mutant *sickle*, affecté dans la sensibilité à l'éthylène, présente 10 fois plus de nodosités que le génotype sauvage (phénotype hypernodulant). *SICKLE* est un orthologue du gène *EIN2* (*ETHYLENE INSENSITIVE 2*) d'*Arabidopsis thaliana*, possédant un rôle dans la réponse aux pathogènes, et dans la régulation de la formation des nodosités (Penmetsa and Cook, 1997; Penmetsa et al., 2008; Prayitno et al., 2006b).

L'éthylène est décrit pour réguler le transport de l'auxine (Prayitno et al., 2006b). Ainsi, l'éthylène pourrait inhiber l'accumulation d'auxine au niveau du site d'initiation de la nodosité. En outre, l'éthylène a été démontré comme responsable de l'intégration de mécanismes de défense, régulant l'infection par les rhizobia (Penmetsa et al., 2008; Prayitno et al., 2006a).

L'éthylène semble avoir un rôle complexe sur la symbiose MA, qui reste encore à mieux caractériser. Le mutant *sickle* de *M. truncatula* est également décrit comme étant hyper-mycorhizé. Des traitements exogènes d'éthylène chez *Pisum sativum* (Pois) ont permis de suggérer un possible rôle inhibiteur de l'éthylène sur la colonisation du champignon MA (Geil et al., 2001), mais d'autres études ont au contraire montré qu'un mutant insensible à l'éthylène de *Solanum lycopersicum* (Tomate) présentait une mycorhization réduite (Zsogon et al., 2008).

3.2.d. L'acide abscissique

Des applications d'acide abscissique (ABA) provoquent une inhibition de l'infection et de la formation de la nodosité (Ding et al., 2008). L'ABA régule la réponse aux facteurs Nod inhibant le signal calcique induit par ces derniers. Par ailleurs, un variant dominant négatif du gène *ABII* (*ABSCISSIC ACID INSENSITIVE 1*) chez *M. truncatula*, impliqué dans la sensibilité à l'ABA, entraîne un phénotype hyper-nodulant. Il semble également que l'effet de l'ABA sur l'inhibition de la nodulation soit dépendante de l'action des CK sur les divisions corticales lors de la formation de la nodosité (Ding et al., 2008).

L'ABA semble également avoir un rôle sur la symbiose MA, car des mutants de *S. lycopersicum* (Tomate) affectés dans la sensibilité à l'ABA présentent une réduction de l'intensité de la colonisation par le champignon MA, ainsi qu'un moins bon développement des arbuscules (Herrera-Medina et al., 2007). Les auteurs suggèrent toutefois que l'ABA régule les taux d'éthylène, ce qui pourrait être à l'origine de son inhibition de la symbiose MA, du moins pour ce qui est de la colonisation. La formation des arbuscules pourrait en effet être directement régulée par l'ABA, car l'éthylène ne l'affecte pas (Martin-Rodriguez et al., 2011).

3.2.e. Les strigolactones

Il est très bien décrit que les strigolactones (SL) jouent le rôle de signaux inducteurs lors de la phase pré-symbiotique MA, en stimulant la ramification et la croissance des champignons MA (Akiyama et al., 2005; Besserer et al., 2008; Besserer et al., 2006). Cependant, il est également possible que les SL interviennent dans la régulation de cette symbiose en tant que phytohormone, c'est-à-dire en tant que

régulateur endogène. Des études récentes ont montré que des mutants de *Pisum sativum* (Pois) et d'*Oryza sativa* (Riz) affectés dans la sensibilité aux SL, présentaient un taux de mycorhization réduit (Foo, 2013; Yoshida et al., 2012). Les SL semblent donc également influencer la symbiose MA, mais il n'est pas encore déterminé par quel mécanisme se déroule cette régulation. En outre, le phénotype de mycorhization réduite observé chez les mutants affectés dans la sensibilité à l'auxine semblent indiquer que l'auxine joue sur la biosynthèse des SL afin de réguler la symbiose MA (Foo, 2013). Par ailleurs, il a été récemment démontré que les gènes *NSP1* et *NSP2*, appartenant à la voie commune CSSP, sont requis pour la biosynthèse des SL (Liu et al., 2011), ce qui pourrait expliquer leur rôle sur la symbiose MA.

3.2.f. L'acide gibbérellique

Les gibbérellines ou acide gibbérellique (GA) sont également importantes dans la régulation des symbioses. Le mutant *na-1* de *P. sativum* (Pois), déficient dans la biosynthèse des GA, présente des nodosités malformées et une réduction globale du nombre de nodules (Ferguson et al., 2011), montrant que cette hormone joue un rôle dans la formation de la nodosité. En outre, chez *Lotus japonicus* (Lotier), il a été démontré que l'application de GA entraîne une inhibition de la voie de signalisation symbiotique en réponse aux facteurs Nod, en aval de l'action des CK (Maekawa et al., 2009).

De récents travaux ont mis en évidence l'implication de l'acide gibbérellique (GA) dans la régulation de la symbiose MA : le mutant *na-1* présente un développement des arbuscules plus important, et ce phénotype disparaît en réponse à une application exogène de GA bioactifs (Foo et al., 2013). Par ailleurs, chez *M. truncatula*, plusieurs gènes liés à la biosynthèse des GA sont induits après le contact avec le champignon MA (Ortu et al., 2012). Ceci suggère que les GA jouent un rôle dans les étapes tardives de la symbiose MA.

4. Conclusions

Les associations symbiotiques jouent un rôle très important dans l'amélioration des rendements chez les plantes cultivées. *Medicago truncatula*, établissant les symbioses mycorhizienne à arbuscules (MA) et Légumineuses-Rhizobium (LR), est un parfait modèle d'étude des endosymbioses racinaires. Ces symbioses sont contrôlés par des mécanismes internes à la plante (phytohormones, gènes *DMI*, etc), suite au dialogue moléculaire impliquant la perception par la plante de molécules de type lipochitoooligosaccharidiques (LCOs) et peut-être chitoooligosaccharidiques (COs), produits par les symbiontes fongiques et rhizobiens.

De façon intéressante, ces LCOs ont un effet sur le développement de la racine latérale chez *M. truncatula*, ce qui sera développé dans la partie C de l'introduction. En amont, nous allons d'abord résumer les connaissances disponibles sur le développement de la racine latérale, en particulier chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Introduction, partie B).

Partie B – LA RACINE LATÉRALE

1. La ramification racinaire

Dans un contexte de changement climatique et de dégradation progressive des sols due à l'activité humaine, les plantes se retrouvent face à de nouveaux stress abiotiques auxquels elles doivent faire face (Den Herder et al., 2010). Or, selon plusieurs modèles, les productions agricoles doivent doubler afin de faire face à l'augmentation des populations (Source : OECD⁸), ce qui implique d'améliorer leurs rendements tout en s'adaptant aux changements environnementaux.

Grâce à la plasticité de leur système racinaire, les plantes possèdent la capacité de s'adapter à leur environnement. L'architecture racinaire détermine leur ancrage dans le sol ainsi que leur accès à l'eau et aux nutriments, donc est un des principaux leviers du rendement des cultures. Les gènes et les voies impliquées dans la détermination de l'architecture racinaire en réponse à des signaux intrinsèques et extrinsèques (environnementaux) ont été récemment passés en revue chez plusieurs plantes (Jung and McCouch, 2013).

L'architecture racinaire des plantes peut se décomposer en plusieurs notions : la croissance racinaire, la ramification (formation de racines latérales), et l'angle des racines. Elle est également déterminée par la capacité à mettre en place des symbioses racinaires avec des microorganismes du sol, qui ont été abordée en partie A de cette introduction. Parmi ces facteurs, la formation de racines latérales (RL) a été bien documentée chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Malamy and Benfey, 1997), et consiste en la formation *de novo* d'un organe, c'est-à-dire que la RL n'est pas préformée lors de la formation de l'embryon. La RL est formée à partir de cellules racinaires qui se sont différenciées.

2. Etapes cellulaires du développement de la racine latérale chez *Arabidopsis thaliana*

La plupart des études descriptives et mécanistiques du développement de la RL ont été réalisées sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, compte tenu de sa facilité de culture, de la simplicité de son système racinaire et des nombreux outils disponibles. Au début de la thèse, il n'existait que très peu d'informations au sujet du développement de la RL chez les légumineuses et particulièrement *M. truncatula*. Nous allons donc passer en revue le développement de la RL à l'aide de ce qui est bien décrit chez *A. thaliana*.

⁸ www.oecd.org/site/oecd-faoagriculturaloutlook/

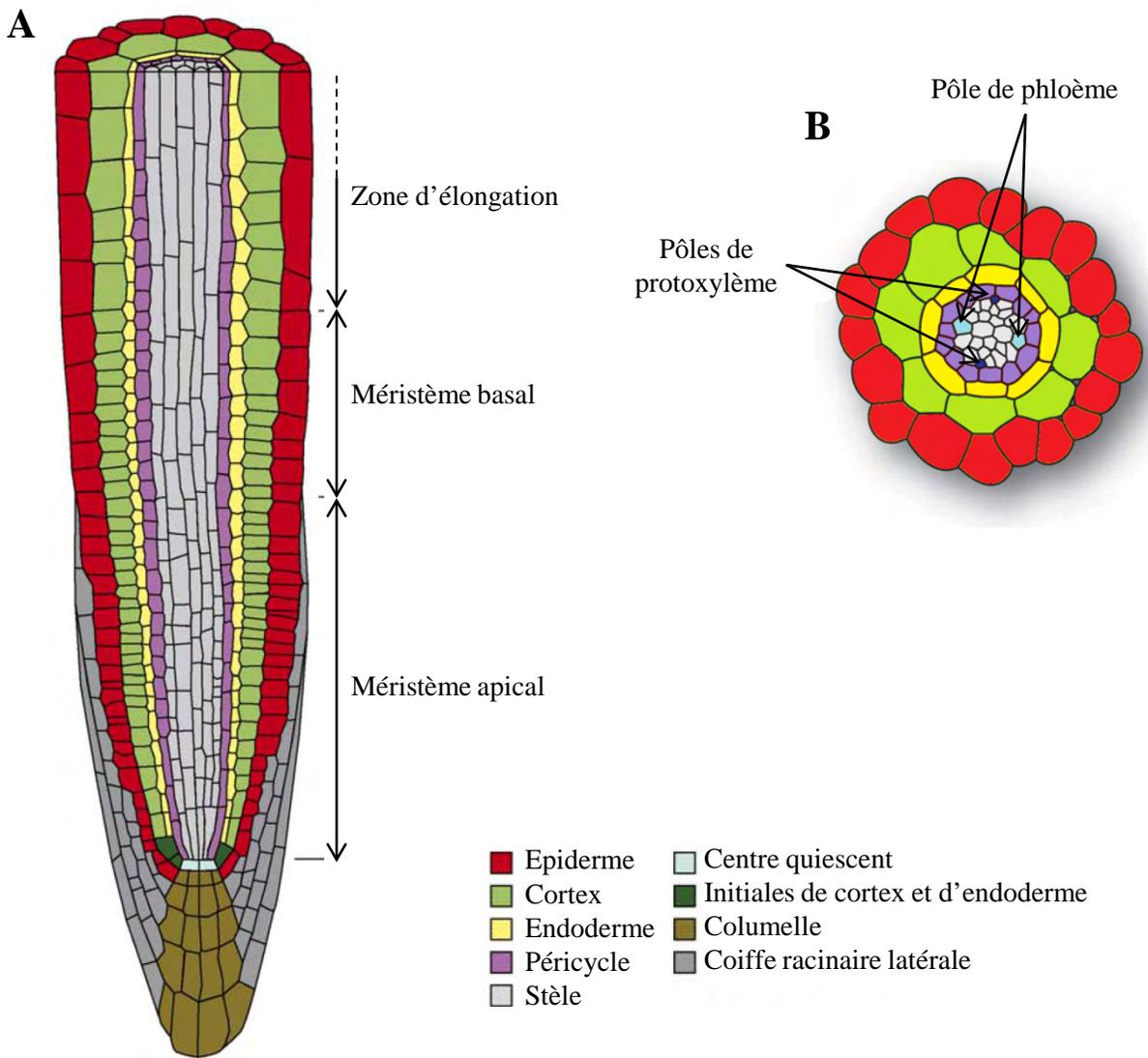


Figure 1.12 • Morphologie de la racine principale d'*Arabidopsis thaliana*

La racine principale est constituée de la stèle, entourée du péricycle, de l'endoderme, du cortex, et de l'épiderme (A). L'apex de la racine contient le méristème apical, où les différentes lignées cellulaires sont déterminées. Les cellules du centre quiescent se divisent en produisant des initiales (précurseurs) des différents tissus. L'apex est protégé par la coiffe racinaire et la columelle. La stèle comprend les vaisseaux conducteurs xylème et phloème, dont les pôles sont situés de part et d'autre de la stèle en contact avec le péricycle (B).

Adapté de Péret et al., 2009 et d'Overvoorde et al., 2010.

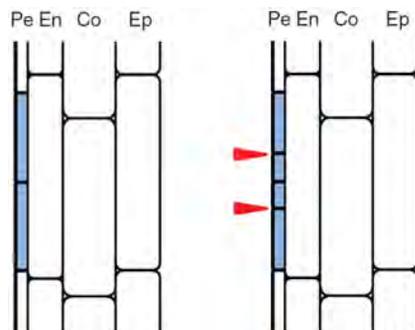


Figure 1.13 • Divisions anticlines asymétriques dans le péricycle chez *A. thaliana*

L'initiation de la racine latérale correspond à deux divisions anticlines (perpendiculaires à l'axe de la racine) et asymétriques permettant la formation de deux petites cellules filles centrales entourées de deux plus grandes. Pe: péricycle, En: endoderme, Co: cortex, Ep: épiderme. Adapté de Marhavy et al., 2013.

2.1. Compétence des cellules du péri-cycle

Chez *A. thaliana*, la RL trouve son origine dans la réactivation et les divisions d'une couche interne de la racine principale, le péri-cycle (en violet, Figure 1.12), qui entoure la stèle où se trouvent les vaisseaux conducteurs (phloème et xylème). Le péri-cycle est lui-même entouré de l'endoderme, du cortex, et de l'épiderme (Figure 1.12).

La réactivation du péri-cycle chez *A. thaliana* passe par un état particulier de la cellule, permettant que son cycle cellulaire se remette en route. Il a été démontré que le péri-cycle est composé de deux types cellulaires, déterminés par leur position autour du cylindre central : les lignées cellulaires de péri-cycle localisées aux pôles de phloème (Figure 1.12 B) sont complètement différenciées et demeurent au stade G1 du cycle cellulaire, tandis que les lignées cellulaires localisées aux pôles de protoxylème présentent un cytoplasme dense et une vacuole fragmentée, et avancent au stade G2 du cycle cellulaire (Beeckman et al., 2001; Parizot et al., 2008). Les cellules du péri-cycle sont donc maintenues dans un état pré-mitotique, leur permettant de se diviser rapidement. Ce maintien de la compétence mitotique des cellules de péri-cycle pour la formation des RL est dépendant de la protéine nucléaire ALF4 (ABERRANT LATERAL ROOT FORMATION4), ainsi que du régulateur E2Fa (Berckmans et al., 2011; DiDonato et al., 2004). La réactivation des divisions est activée par l'auxine, qui semble promouvoir ou réprimer certaines protéines liées au cycle cellulaire, notamment des cyclines de type D, ou le répresseur de la transition G1 à S du cycle cellulaire INHIBITOR-INTERACTOR OF CDK (CYCLIN-DEPENDENT KINASE)/KIP-RELATED PROTEIN2 (ICK/KRP2) (Himanen et al., 2002; Nieuwland et al., 2009; Sanz et al., 2011).

Cette fine régulation du cycle cellulaire permet à un petit groupe de cellules du péri-cycle de se différencier et de se diviser pour former un organe.

2.2. Stades cellulaires successifs de la formation des racines latérales

Les premières divisions cellulaires de la formation de la RL, généralement appelée « initiation de la RL » (LRI) concernent deux cellules du péri-cycle longitudinalement adjacentes (les cellules fondatrices), qui subissent chacune une division asymétrique. Ainsi, les deux cellules-filles issues de ces divisions n'ont pas la même taille, les deux plus petites étant côte à côte (Figure 1.13). Les divisions asymétriques supposent que les cellules fondatrices soient polarisées, et que leur noyau ait migré en direction de leur paroi commune (De Rybel et al., 2010; De Smet et al., 2007).

En se servant de la plante modèle *A. thaliana*, et de plusieurs marqueurs de lignées cellulaires, Malamy et Benfey ont procédé à une analyse cellulaire fine du développement de la RL (Malamy and Benfey, 1997), en tenant compte du nombre de cellules divisées, du nombre de couches cellulaires et du type de divisions. Ces dernières peuvent être anticlines (l'axe de division est perpendiculaire à l'axe de la racine principale) ou périclines (l'axe de division est parallèle à l'axe de la racine principale).

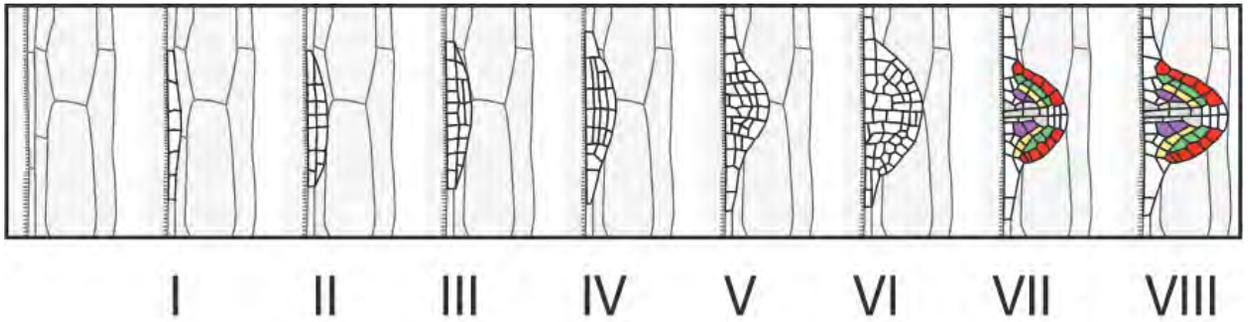


Figure 1.14 • Etapes successives de formation du primordium de racine latérale chez *A. thaliana*

La formation du primordium de racine latérale chez *A. thaliana* est décomposé en 7 stades successifs : Après les premières divisions anticlines de péricycle (I), celui-ci se divise de façon péricline pour former deux couches (II), puis trois (III) puis quatre (IV). Le primordium a alors traversé l'endoderme. Les stades V et VI correspondent à des proliférations cellulaires supplémentaire donnant une forme bombée au primordium qui a traversé le cortex. Enfin au Stade VII, le primodium traverse l'épiderme et émerge par élongation cellulaire. A ce stade, les tissus du primodium sont différenciés pour former les couches cellulaires de la future racine. Le stade VIII correspond au primorium émergé.

(Source : Péret et al., 2012).

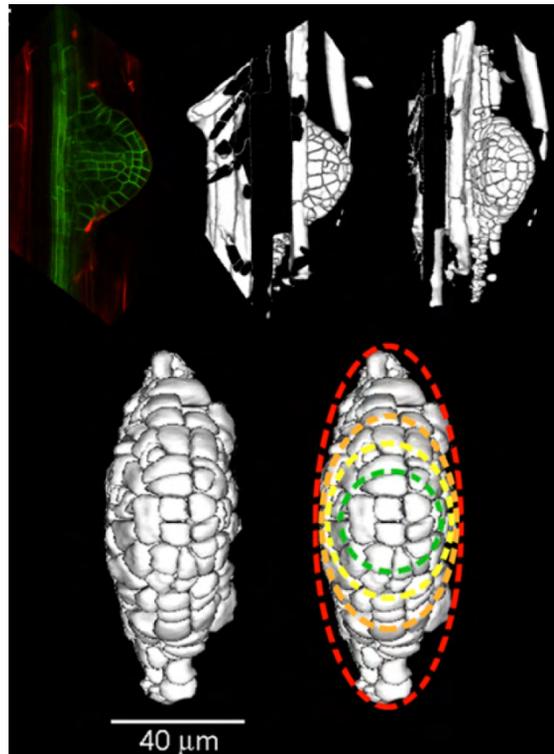


Figure 1.15 • Forme tridimensionnelle du primordium de racine latérale chez *A. thaliana*

A l'aide d'outils de microscopie confocale et de modélisation, la forme du primorium de la racine latérale a été analysée. Il forme un dôme ovoïde allongé dans la direction de la racine principale (Source : Lucas et al., 2013).

Les stades successifs décrits par cette étude sont schématisés dans la Figure 1.14. Les auteurs ont défini le stade I comme les premiers cycles de divisions anticlines se produisant dans le péricycle, depuis les premières divisions asymétriques jusqu'à ce qu'environ dix cellules de taille égales soient visibles longitudinalement. Le stade II correspond aux divisions périclines permettant au péricycle de se séparer en deux sous-couches. Cette initiation en deux temps (divisions anticlines, puis périclines) avait déjà été décrit auparavant (Laskowski et al., 1995). Ensuite, d'autres divisions périclines dans la sous-couche externe de péricycle, puis dans la sous-couche interne, ont pour effet de former une troisième couche, puis une quatrième (respectivement Stades III et IV). L'ensemble de ces cellules divisées, constituant le primordium de RL (LRP) commence à prendre un aspect bombé, et à traverser la première couche cellulaire qui l'entoure (l'endoderme). Au stade V, les cellules des quatre couches de péricycle continuent à proliférer et le LRP se situe à la moitié de la racine principale. Au stade VI, le LRP prend une forme plus arrondie en traversant le cortex de la racine principale. Le stade VII est caractérisé par la formation des traces vasculaires (repérables par l'apparition de cellules allongées au centre du LRP), et le début de la différenciation des tissus de la future racine. Un petit groupe de cellules indifférenciées est observable, correspondant au futur méristème apical, mais on ne sait pas encore si celui-ci est déjà actif à ce stade. La face externe du LRP est à présent au niveau de l'épiderme de la racine principale. Enfin, par un processus d'allongement cellulaire, le LRP traverse l'épiderme et émerge de la racine principale (Figure 1.14).

2.3. *Forme du primordium de racine latérale*

À l'aide d'outils de modélisation et d'observations au microscope confocal, Lucas et coll. ont montré que les LRP n'avaient pas une forme semi-sphérique, mais ovoïde (Figure 1.15), allongée dans la direction de la racine principale (Lucas et al., 2013). Il a également été montré que cette forme ne dépend pas forcément des événements de division internes au LRP, mais surtout des propriétés des tissus qui recouvrent ce LRP (endoderme, cortex, épiderme).

2.4. *Accumulation d'auxine dans le primordium de racine latérale*

Depuis l'apparition de marqueurs précoces de l'accumulation de l'auxine, tels que *DR5:GUS* (Ulmasov et al., 1997), il a été constaté qu'une caractéristique de la formation des RL est l'accumulation de l'auxine. Cette accumulation a lieu dans le péricycle dès les stades précoces de formation de la RL, avant même les premières divisions anticlines, et se poursuit lors des étapes cellulaires successives, pendant le développement du LRP (Figure 1.16 A) (Benkova et al., 2003). Au cours des stades tardifs de la formation de la RL, l'accumulation d'auxine se concentre en direction de l'extrémité du LRP, au niveau des cellules qui donneront le méristème de la future LR, ce en quoi l'accumulation d'auxine dans le LRP commence à ressembler au profil de distribution de l'auxine de la racine mature (Figure 1.16 B).

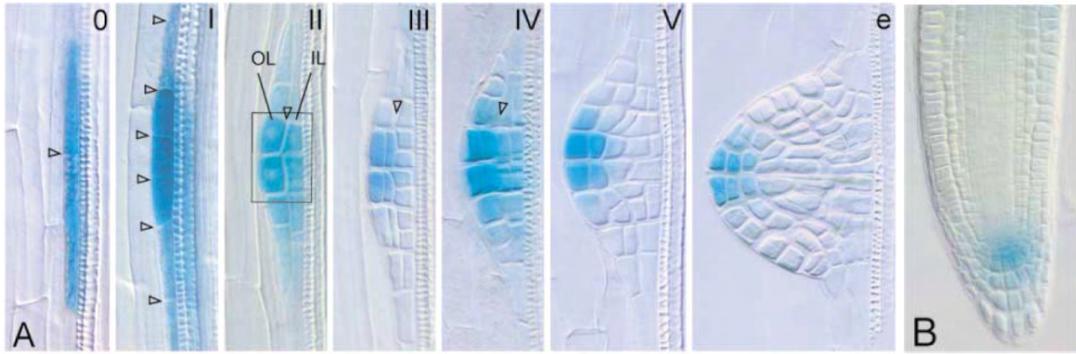


Figure 1.16 • Accumulation d’auxine lors de la formation de la racine latérale

(A) Dès le premier stade de formation de la racine latérale chez *A. thaliana*, le péricycle accumule de l’auxine, mise en évidence par l’activité du promoteur DR5 conduisant l’expression du gène *GUS* (en bleu). Cette accumulation d’auxine se poursuit au cours des étapes de développement du primordium, dans les deux sous-couches du péricycle (*Outer Layer*, OL et *Inner Layer*, IL), jusqu’à l’émergence (e) du primorium. À ce stade l’accumulation d’auxine est située à l’extrémité du primordium, montrant un profil similaire à celui de la racine principale (B).

(Source : Benkova et al., 2003).

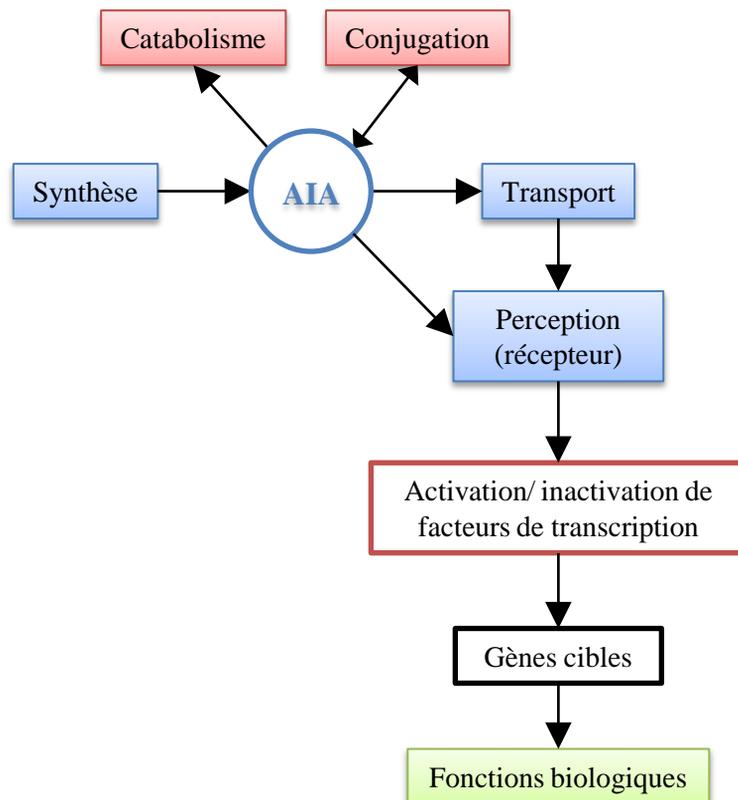


Figure 1.17 • Métabolisme général de l’auxine

La concentration d’auxine (AIA) est régulée par sa synthèse, sa conjugaison, sa dégradation (catabolisme) et son transport. La signalisation de l’auxine implique sa perception et sa régulation de gènes cibles via l’activation ou l’inactivation de facteurs de transcription.

(Adapté de Kieffer, et al., 2010).

Il a également été constaté que le transport de l'auxine ainsi que l'accumulation locale de celle-ci dans les cellules de péricycle étaient indispensables à l'initiation, le développement et l'émergence du LRP, et ceci grâce à un réseau de gènes transporteurs (Blilou et al., 2005).

3. L'auxine : le régulateur clé du développement de la racine latérale

L'auxine est une phytohormone indispensable au développement des plantes. Le terme d'auxine a été étendu à un ensemble de substances naturelles aux propriétés analogues ainsi qu'à des hormones de synthèse. La molécule d'auxine naturelle, l'AIA ou Acide Indole Acétique, fut découverte en 1926 par Went, en déposant des bouts de coléoptiles sur des blocs de gélose afin que l'auxine migre dans ceux-ci. Il dépose ensuite ces cubes sur des tiges préalablement décapitées et les place à l'obscurité. Ces tiges se courbent en direction de l'endroit où le bloc a été déposé. La structure chimique de l'auxine est identifiée en 1931 par Kogl et Haagen-Smit. Trois autres formes d'auxine ont également été détectées dans les plantes : l'acide chloroindole acétique, l'acide phényle acétique, et l'acide indole butyrique, avec cependant des rôles de moindre importance (Simon and Petrusek, 2011). L'auxine de synthèse la plus utilisée est l'acide naphthalène acétique (ANA).

L'auxine agit sur l'élongation et les divisions cellulaires. Ses rôles sont nombreux, sur la dominance apicale, la formation des fruits, la floraison, la réponse à l'environnement (lumière, blessures), le développement des organes, et particulièrement des racines et les racines latérales (RL). De nombreuses revues récapitulent les divers rôles de l'auxine sur les plantes (Kieffer et al., 2010). Au vu des multiples rôles et de la complexité de l'action de l'auxine sur le développement des plantes, cette introduction se focalisera surtout sur son rôle lors du développement des RL.

3.1. Homéostasie et signalisation de l'auxine

L'action de l'auxine dépend à la fois de sa concentration et du tissu sur lequel elle agit. Selon les plantes, une même concentration sur un même organe peut entraîner des conséquences différentes. Ceci implique une régulation très fine en amont et en aval de l'auxine. L'action de l'auxine est dépendante de sa présence et sa concentration dans la cellule, son transport, sa perception, et la régulation de gènes cibles (Figure 1.17).

3.1.a. Synthèse et conjugaison dans les racines

L'AIA ou Acide Indole Acétique (Figure 1.18 A) est synthétisé à partir d'indole, selon plusieurs voies de biosynthèse impliquant ou non le tryptophane (Figure 1.18 B) (Quittenden et al., 2009).

Chez *Arabidopsis thaliana*, l'auxine se présente souvent sous forme conjuguée, en association avec des sucres, des acides aminés ou des protéines, grâce à des liaisons de type ester ou amide (Ljung et al.,

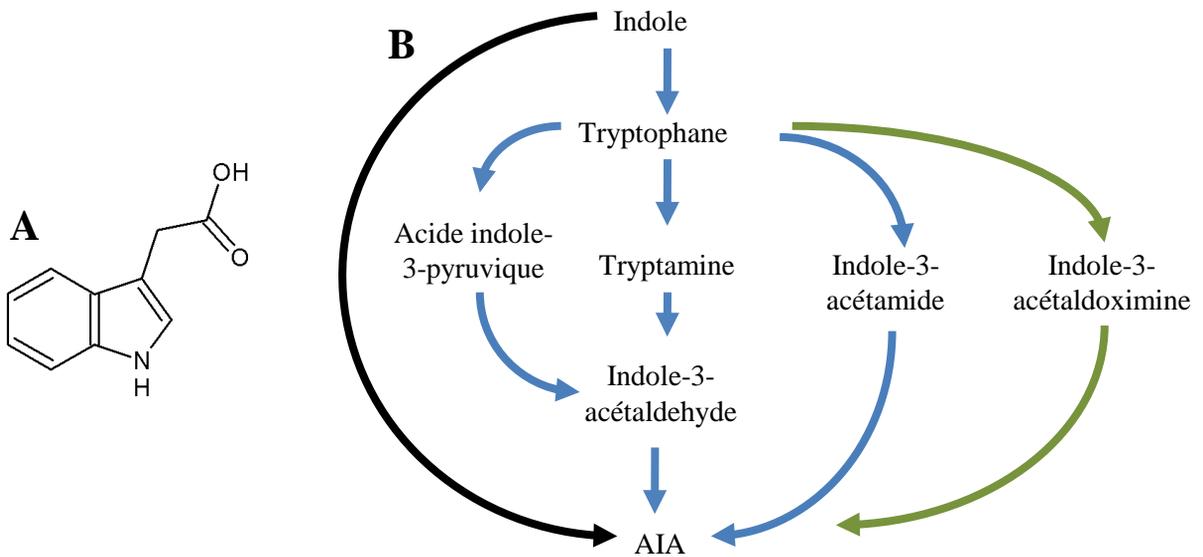


Figure 1.18 • Biosynthèse de l'auxine

L'auxine (AIA) est synthétisée en majeure partie à partir du tryptophane, via trois voies de biosynthèse différentes. Il existe également une voie de biosynthèse à partir du précurseur indole, sans passer par l'étape du tryptophane.

Sources : Wikipedia Commons (A) et Quittenden et al., 2009 (B).

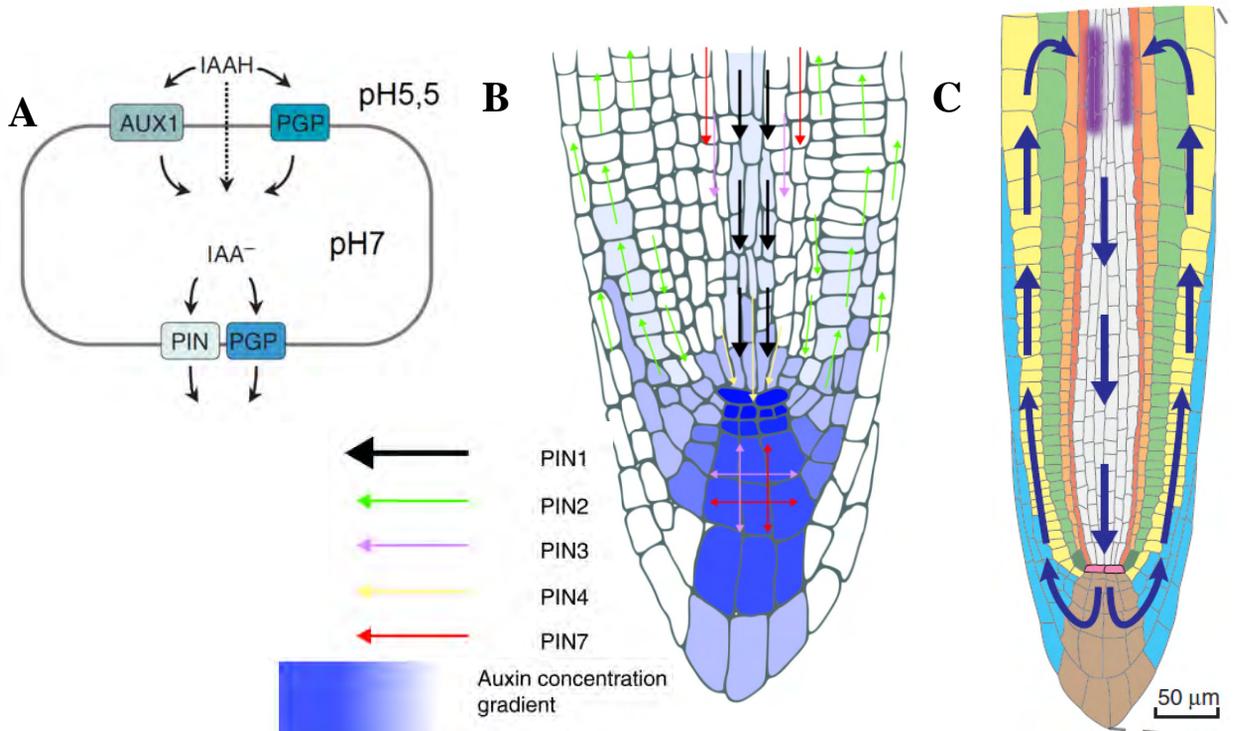


Figure 1.19 • Le transport d'auxine au niveau de la racine principale d'*A. thaliana*

(A) L'auxine est transportée dans la cellule via des transporteurs d'influx AUX1 et PGP (appelés aussi transporteurs ABC), ou directement par dé-protonisation, car le pH extracellulaire (pH5,5) est plus acide que le pH interne (pH7). L'auxine est transportée hors de la cellule par des transporteurs PIN ou PGP/ABC.

(B) Schéma représentant les flux d'auxine contrôlés par différents transporteurs PIN (1, 2, 3, 4 et 7). Ces protéines régulent le gradient d'auxine au niveau de l'apex de la racine principale, grâce à leur domaine d'expression et leur localisation subcellulaire, coordonnant le sens du transport d'auxine.

(C) Schéma représentant le flux général d'auxine, dit en « fontaine inversée » dans la racine principale, permettant l'accumulation d'auxine dans des cellules du protoxylème (violette), précédant l'initiation de racines latérales.

Sources : Adapté de Mathesius, 2008 (A), Křeček et al., 2009 (B) et Péret et al., 2009 (C).

2005). Sous cette forme, l'auxine est inactive : la conjugaison est donc un mécanisme d'appoint permettant de réguler la concentration l'auxine active dans la cellule.

En particulier, l'action de l'auxine sur le développement des RL est dépendante du taux de conjugués AIA-Glutamate, qui est dépendant du gène *IAR4*, codant pour une enzyme probablement impliquée dans la dé-conjugaison de l'AIA (Quint et al., 2009). L'une des autres formes de l'auxine présente dans les plantes, l'acide indole butyrique (AIB), peut également être converti en AIA, et il a été montré que le pool d'auxine issu de l'AIB contribue à la régulation de l'architecture racinaire (Zolman et al., 2008). La conversion de l'AIB ainsi que la formation ou l'hydrolyse des conjugués d'AIA, font partie d'un mécanisme permettant de contrôler indirectement la concentration d'auxine dans la cellule (Woodward and Bartel, 2005).

3.1.b. Transport

De façon générale, le transport d'auxine est indispensable à la formation des RL, car il conditionne son accumulation locale dans les cellules. En effet, l'application sur la racine d'un inhibiteur du transport de l'auxine, l'acide naphtylphthalamique (NPA) affecte le développement des RL (Casimiro et al., 2001; Himanen et al., 2002). Il est généralement connu que l'auxine est synthétisée dans les parties aériennes, particulièrement au niveau des méristèmes apicaux, et qu'elle migre en direction des racines. Toutefois, il a été découvert que de l'auxine était également produite au niveau du méristème racinaire. Or, il a été démontré que le développement des RL est dépendant de pools d'auxine produits dans ces deux sources (parties aériennes et racines). Il semble que le flux d'auxine allant des feuilles aux racines soit essentiel pour l'émergence de la RL, mais pas pour l'initiation, alors que les flux d'auxine à partir de l'apex racinaire sont requis pour l'initiation des RL (Casimiro et al., 2001; Wu et al., 2007).

Le transport de l'auxine peut se dérouler de façon active ou passive. Dans le cas du transport passif, l'auxine voyage via le xylème et le phloème, passant par les pores présents dans les parois des cellules allongées, mais également à travers les parois cellulaires par acidification : l'AIA sous forme protonée (AIAH) peut entrer dans la cellule (Figure 1.19 A) car l'environnement extracellulaire est plus acide (pH5,5) que l'environnement intracellulaire (pH7).

Au contraire, le transport actif nécessite l'action de transporteurs d'auxine qui sont des protéines membranaires contrôlant le passage de l'auxine d'une cellule à l'autre, ou entre les différents compartiments cellulaires. Le mode de fonctionnement des transporteurs d'auxine dépend de leur localisation subcellulaire : leur position au pourtour ou dans la cellule coordonne le déplacement de l'auxine dans une direction ou dans une autre. Il existe deux types de transporteurs d'auxine : les transporteurs d'influx, qui régulent l'entrée de l'auxine dans la cellule, et les transporteurs d'efflux, qui contrôlent sa sortie (Figure 1.19 A). Ces deux types de transporteurs sont nécessaires à la génération des maximums d'auxines permettant la formation des RL. Les acteurs les plus importants du transport d'efflux sont les protéines PIN-FORMED (PIN) et les transporteurs ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER-LIKE/PHOSPHOGLYCOPROTEIN (ABCB/PGP-like) (Benkova et al., 2003;

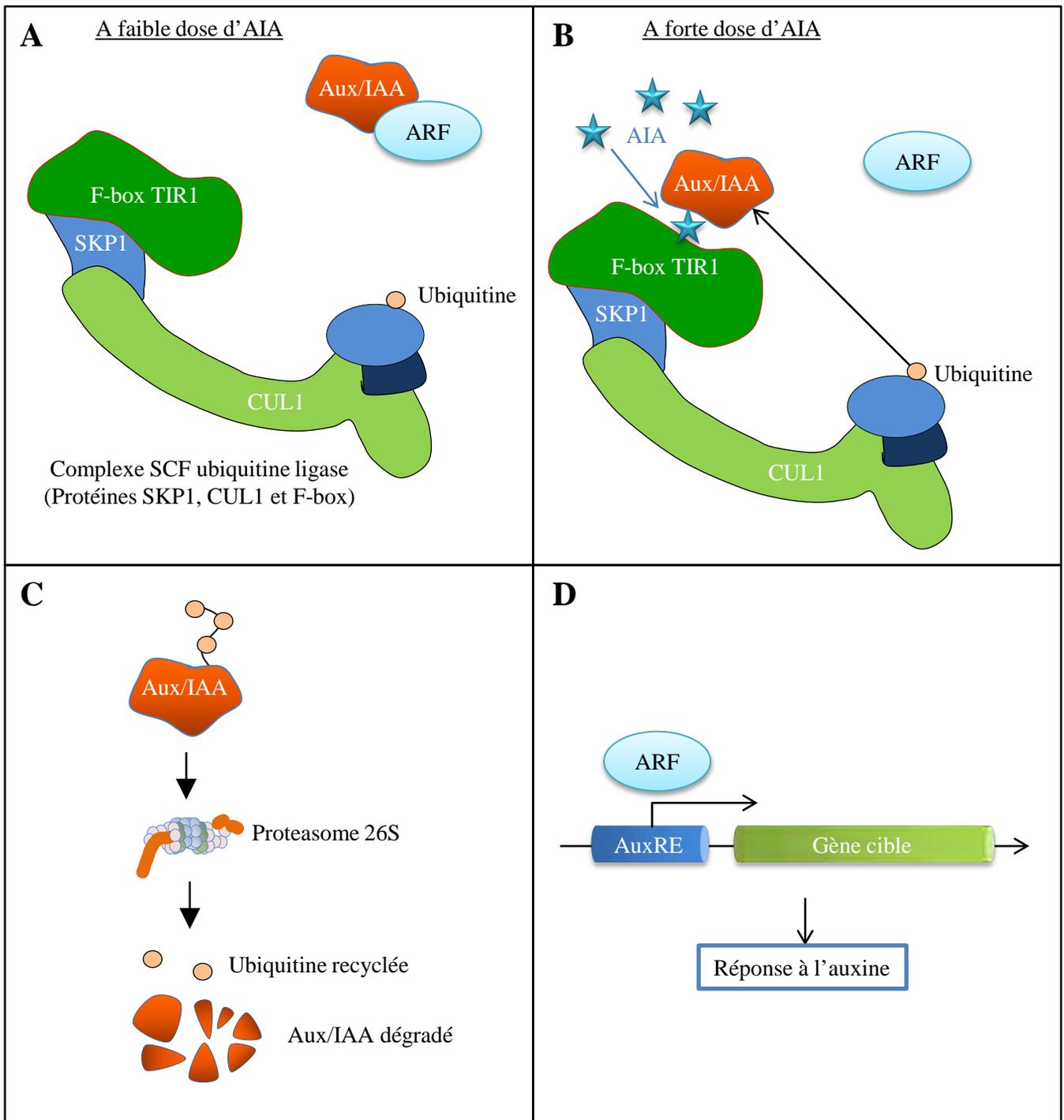


Figure 1.20 • Schéma général de la perception et la signalisation de l'auxine

(A) Le complexe SCF^{TIR1AFB} est composé des protéines SKP1, CUL1 et du récepteur à l'auxine de type F-box, TIR1 ou AFB (1-5). À faible dose d'auxine, les répresseurs transcriptionnels Aux/IAA forment un complexe stable avec les facteurs de transcription ARF, inhibant leur action sur la transcription.

(B) À forte dose d'auxine, celle-ci est perçue par le récepteur à F-box, et permet l'interaction entre le complexe SCF^{TIR1AFB} et la protéine Aux/IAA, via son domaine II de cette dernière. Cette interaction va conduire à l'ubiquitination de la protéine Aux/IAA grâce à l'activité ubiquitine-ligase du complexe.

(C) La protéine Aux/IAA ubiquitinée est ciblée vers le protéasome 26S qui provoque sa dégradation.

(D) Les facteurs de transcription ARF sont libérés, se fixent sur l'ADN au niveau des éléments de réponse à l'auxine AuxRE, et activent la transcription de gènes de réponse à l'auxine.

Source : *The story of auxin, Teaching Tools in Plant Biology* © 2011 The American Society of Plant Biologists.

Wisniewska et al., 2006). Le transport d'influx est quant à lui dépendant de la protéine AUXIN RESISTANT 1 (AUX1) et des protéines semblables LIKE-AUX1 (LAX) (Marchant et al., 2002; Swarup et al., 2008). Chez *A. thaliana*, la famille des PINs contient 8 membres dont 6 ont bien été caractérisés (Krecek et al., 2009). Il existe trois protéines LAX (1-3) apparentées à AUX1.

L'initiation des racines latérales dépend de l'action de ces transporteurs, indispensables pour générer un gradient d'auxine. Celui-ci met en jeu plusieurs transporteurs, particulièrement PIN1, mais aussi PIN2, PIN3, PIN4 et PIN7. Leurs localisations tissulaires et subcellulaires spécifiques permettent d'établir un reflux d'auxine, descendant par la stèle et le péricycle grâce à PIN1, PIN3 et PIN7, puis remontant par la coiffe racinaire, l'épiderme et le cortex grâce à PIN2 (Figure 1.19 B) (Krecek et al., 2009). Ce reflux d'auxine, appelé aussi « fontaine inversée » (Figure 1.19 C) est indispensable aux événements préalables à l'initiation des RL (De Smet et al., 2007). La protéine AUX1 est quant à elle requise pour conduire l'auxine depuis les tissus vasculaires jusqu'au péricycle au niveau des initiations de RL, ce qui contribue à générer un maximum d'auxine local indispensable à la formation des RL (Swarup et al., 2008).

3.1.c. Signalisation

Dans la cellule, l'auxine est perçue par deux types de récepteurs, la famille de récepteurs à F-box TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1) auquel s'ajoutent cinq protéines AUXIN SIGNALING F-BOX (AFB1-5), ainsi que la protéine de liaison AUXIN BINDING PROTEIN 1 (ABP1). La perception par ABP1 est encore assez peu décrite, mais il semble qu'ABP1 soit une molécule membranaire, et posséderait un rôle dans l'élongation cellulaire et l'assouplissement de la paroi cellulaire (Jones et al., 1998; Tromas et al., 2010).

Les récepteurs TIR1 et AFB font partie d'un complexe E3-ubiquitine ligase SCF composé d'une protéine SKP, d'une protéine CULLIN, et du récepteur à F-box, appelé SCF^{TIR1/AFB} (Figure 1.20 A).

La signalisation de l'auxine dépend de protéines de la famille des Aux/IAA (AUXINE/INDOLE ACETIC ACID) qui sont des régulateurs négatifs de la transcription de gènes de réponse à l'auxine, et de facteurs de transcription positifs ou négatifs de type ARF (AUXIN RESPONSE FACTOR). Le rôle des ARFs est d'activer, ou de réprimer, des gènes cibles de réponse à l'auxine en se liant à l'ADN, particulièrement sur des séquences de réponse à l'auxine appelées AuxRE (*Auxin Response Elements*) (Ulmasov et al., 1997).

L'interaction des Aux/IAA et des ARF réprime la transcription des gènes de réponse à l'auxine (Figure 1.20 A). Chez *A. thaliana*, il existe 29 différentes protéines Aux/IAAs, et la famille des protéines ARFs réunit 23 membres. De plus, il y a 6 protéines réceptrices de l'auxine (TIR1 et 5 AFBs), sans compter ABP1. Cette grande diversité permet plusieurs niveaux de spécificités de la réponse à l'auxine, qui permet de comprendre comment cette seule hormone peut être impliquée dans une telle diversité de mécanismes dans les plantes. Par exemple, la concentration d'auxine joue sur le type de protéine Aux/IAA qui sera dégradée, en raison des différences d'affinité des couples TIR1/AFB-AuxIAA pour l'auxine (Villalobos et al., 2012). Il a été suggéré que des interactions préférentielles existent entre

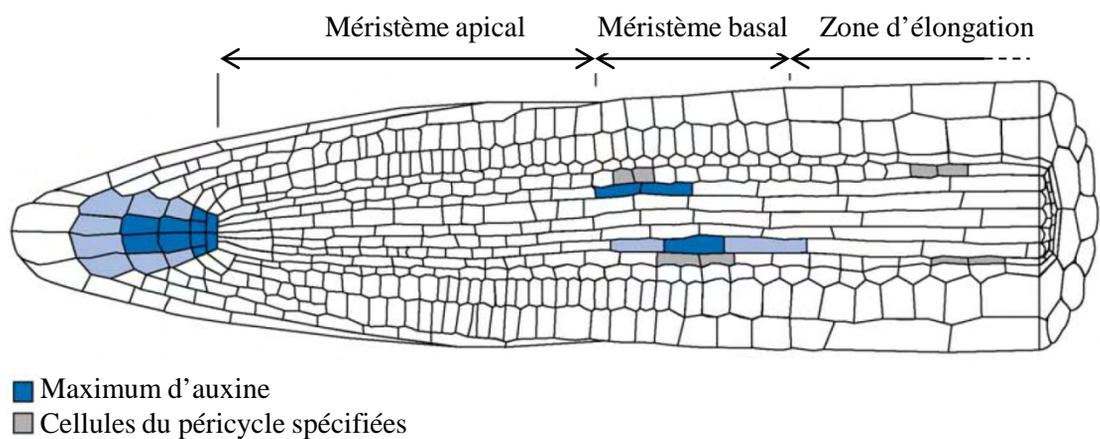


Figure 1.21 • Spécification des cellules fondatrices de la racine latérale chez *A. thaliana*

Avant toute division, la racine principale d'*A. thaliana* subit des oscillations d'auxine au niveau des pôles de protoxylème (« *priming* »), dans la zone du méristème basal (bleu). Les cellules du péricycle adjacentes aux cellules du protoxylème ayant accumulé de l'auxine (grises), sont spécifiées pour se diviser lors des étapes suivantes.

Source : Péret et al., 2009.

certaines protéines Aux/IAA et ARFs. Ces couples Aux/IAA-ARF d'interaction préférentielle sont appelés modules de réponse à l'auxine, et régulent un ensemble spécifique de gènes de réponses (De Smet et al., 2010; Weijers et al., 2005). Ils sont généralement associés à une spécificité tissulaire, ce qui conditionne également leur spécificité d'action (Vernoux et al., 2011).

La présence d'auxine permet l'interaction stable entre le complexe SCF^{TIR1/AFB} et les Aux/IAAs (Figure 1.20 B). Cette interaction conduit à l'ubiquitination des Aux/IAA puis leur dégradation par le protéasome 26S (Figure 1.20 C) (Maraschin et al., 2009). En conséquence, ceci entraîne la libération des protéines ARFs, qui se trouvent en général sous forme d'hétérodimères avec les Aux/IAA.

Dans le contexte de la formation des racines latérales, les ARFs qui jouent un rôle sur les différentes étapes de développement de la RL sont ARF5, 6, 7, 8 et 19 (Lavenus et al., 2013).

3.2. Action de l'auxine au cours de la formation de la RL

3.2.a. Spécification des cellules fondatrices

Les premières étapes de la formation d'une RL sont appelées le *priming* et se déroulent au niveau du méristème basal (Figure 1.21), appelé aussi zone de transition. Le *priming* est caractérisé par une activité pulsatile du promoteur de réponse à l'auxine *DR5* dans les cellules du xylème au niveau du méristème basal, suggérant une oscillation locale d'auxine dans ces tissus (De Smet et al., 2007; Laskowski, 2013; Moreno-Risueno et al., 2010). Par ailleurs, des études transcriptomiques ont montré que de nombreux gènes oscillent dans le méristème basal, en phase ou en opposition de phase avec les oscillations de *DR5* (Moreno-Risueno et al., 2010).

Ces oscillations contribuent à la spécification des cellules du péri-cycle adjacentes au pôle de protoxylème, c'est-à-dire leur devenir pour pouvoir se diviser lors de l'initiation de la RL. Les cellules de péri-cycle qui ont été spécifiées sont nommées cellules fondatrices (CF) de la RL, et sont localisées dans ce que l'on appelle le site de pré-ramification.

La régulation de la spécification des CF par les oscillations d'auxine dans le protoxylème n'est pas encore très bien décrite. On sait que la spécification des CF se déroule dans une zone particulière de la racine principale où la concentration d'auxine est plus faible, entre le gradient distal et le gradient proximal d'auxine, appelée « fenêtre développementale » (Dubrovsky et al., 2011) (Figure 1.21). Il est également observé que les CF se mettent à accumuler de l'auxine, mis en évidence par une forte activité du promoteur *DR5* dans les CF (Benkova et al., 2003; Dubrovsky et al., 2008). Enfin, il a été décrit que la spécification des CF dépend de *GATA23*, activé par le module *IAA28-ARF7-ARF19* de réponse à l'auxine (De Rybel et al., 2010). *GATA23* est un facteur de transcription impliqué dans la spécification du devenir cellulaire au cours du développement.

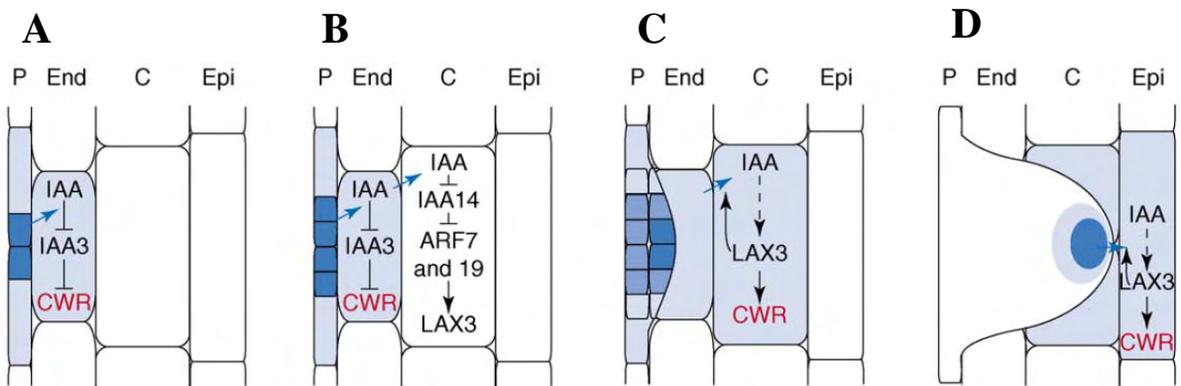


Figure 1.22 • Effet de l’auxine sur l’émergence du primordium de racine latérale chez *A. thaliana*

(A) Suite aux premières divisions anticlines asymétriques des cellules spécifiées du péricycle, celles-ci accumulent de l’auxine (IAA). Celle-ci stimule dans l’endoderme la production d’enzymes de remodelage de la paroi cellulaire (CWR), via une voie de signalisation impliquant IAA3. Ces enzymes préparent l’endoderme à être traversé par le primordium.

(B) Tandis que les divisions se poursuivent dans le péricycle, l’auxine stimule dans le cortex la production du transporteur d’influx LAX3, via le module de signalisation IAA14-ARF7/19.

(C) Dans le cortex, LAX3 présente un rôle double : il stimule à son tour la production des enzymes CWR permettant le passage du primordium, et favorise l’entrée de l’auxine dans le tissu.

(D) Alors que le primordia est bien formé et poursuit son émergence, le même mécanisme, impliquant LAX3, a lieu dans l’épiderme. Il est suggéré que l’auxine favorisant ce mécanisme puisse provenir directement du primordium.

Source : Péret et al., 2009.

3.2.b. Initiation de la racine latérale

Les cellules du péri-cycle en face des pôles de protoxylème possèdent la capacité de relancer leur cycle cellulaire afin de se mettre à se diviser. Les CF ayant été spécifiées dans la fenêtre développementale sont donc prêtes à entamer leurs divisions asymétriques. Cette étape est appelée initiation de la RL et a lieu dans la zone de différenciation de la racine primaire.

Il a été démontré que le module SLR(SOLITARY ROOT)/IAA14-ARF7-ARF19 de réponse à l'auxine est requis à la fois pour la polarisation des CF et la migration de leur noyau, mais également pour leur division asymétrique (Vanneste et al., 2005). Toutefois, celui-ci n'est pas suffisant pour activer le cycle cellulaire permettant la division. Un autre module de réponse à l'auxine, BDL(BODENLOS)/IAA12-ARF5, a été récemment démontré comme également nécessaire à l'initiation de la RL (De Smet et al., 2010).

Les cellules filles les plus petites (centrales) issues des divisions asymétriques continuent à accumuler de l'auxine et expriment spécifiquement un gène de type RECEPTOR-LIKE KINASE (RLK), *ARABIDOPSIS CRINKLY 4 (ACR4)* en réponse à SLR/IAA14 et donc à l'auxine. La protéine ACR4, semble être responsable du maintien de la compétence des cellules à se diviser, tandis qu'elle inhiberait les cellules adjacentes du péri-cycle (De Smet et al., 2008).

En théorie, les oscillations d'auxine dans le protoxylème et la compétence des cellules du péri-cycle pour la division ont lieu en parallèle aux deux pôles de protoxylème de la RL (Figure 1.21). Pourtant, chez *A. thaliana*, les RL n'émergent pas face à face au même niveau de la racine principale, mais présente préférentiellement un profil d'apparition alternatif droite-gauche (De Smet et al., 2007), bien que ce profil semble dépendre en grande partie des conditions de culture. Ceci suggère qu'il existe aussi un mécanisme d'inhibition latérale empêchant la formation concomitante de RL à deux pôles de protoxylème. Le gène *ACR4* semble également être impliqué dans cette inhibition latérale au niveau du pôle de protoxylème (De Smet et al., 2008).

Enfin, le gène *PUCHI*, exprimé en réponse à l'auxine au niveau des flancs du LRP, code pour un facteur de transcription de type AP2 (APETALA 2) qui régule le devenir cellulaire autour du LRP pour éviter que les divisions s'étendent (Hirota et al., 2007). Les gènes *ACR4* et *PUCHI* sont donc requis pour la restriction spatiale de la zone d'initiation de la RL.

3.2.c. Prolifération cellulaire du primordium

Au cours des stades cellulaires de développement du primordium, celui-ci continue à accumuler de l'auxine (Figure 1.22). Lors des stades tardifs (stades VI-VII) de formation du LRP, celui-ci commence à former son propre gradient d'auxine, avec une forte accumulation au niveau du futur méristème de RL, dépendant du transport actif de l'auxine, dont le transporteur PIN2. Comme dans la racine principale, ce gradient semble indispensable à l'acquisition de l'identité cellulaire des différents tissus du primordium (Benkova et al., 2003), bien que les mécanismes qui gouvernent cela ne sont pas encore bien décrits.

3.2.d. Emergence du primordium

L'émergence est un processus continu qui commence lorsque les divisions du péricycle pénètrent la première couche qui l'entoure (dès les premiers stades de formation de la RL), et s'achève lorsque le LRP sort de la racine principale. Chez *A. thaliana*, le LRP doit donc traverser trois couches : l'endoderme, le cortex, puis l'épiderme. L'émergence est un processus bien régulé qui doit combiner la sortie du LRP, et empêcher de trop grandes blessures dans la racine principale, source d'infection par des organismes pathogènes. Ce processus est également dépendant du gradient d'auxine dans la racine principale (Bhalerao et al., 2002).

La séparation des tissus cellulaires entourant le LRP est prise en charge par des enzymes de remodelage de la paroi (CWR, *Cell Wall Remodelling enzyme*), notamment une pectate lysase (PLA2), et des polygalacturonases (PG) et des expansines (Cosgrove, 2000; Marin-Rodriguez et al., 2002). Une approche transcriptomique a montré que certaines de ces enzymes dégradent spécifiquement des pectines dé-méthylées, qui sont particulièrement présentes dans les cellules recouvrant le LRP, et non dans le LRP, ce qui protège le LRP de la dégradation (Laskowski et al., 2006).

La spécificité d'action de ces enzymes est aussi due à leur régulation très fine. En effet, l'auxine provenant du LRP induit le module SHORT-HYPOCOTYL 2 (SHY2)/IAA3-ARF7 dans l'endoderme, puis l'auxine présente dans l'endoderme induit le module SLR/IAA14-ARF7-ARF19 dans le cortex (Figure 1.22). *LAX3* est également exprimé dans l'épiderme. Dans le cortex, la signalisation en réponse à l'auxine régule la transcription du gène *LAX3* (*LIKE-AUX1 3*). Grâce à son activité de transport d'influx, la protéine LAX3 joue un rôle double : d'une part, il coordonne l'accumulation d'auxine nécessaire à l'expression des CWR et favorise donc la séparation des cellules dans le cortex puis l'épiderme, et d'autre part, il coordonne une accumulation locale d'auxine dans ces tissus, renforçant le mécanisme (Swarup et al., 2008).

D'autres mécanismes ont également été décrits comme régulant l'émergence de la RL, montrant que ce processus est complexe et dépend de plusieurs voies de signalisation. Il a notamment été démontré récemment que l'auxine modifie la turgescence des cellules, en réprimant l'expression d'aquaporines dans le LRP et les tissus l'entourant, via le module ARF7 (Peret et al., 2012). Ceci induit un ramollissement des tissus qui améliore les conditions d'émergence du LRP.

4. Autres facteurs influençant la formation des racines latérales

Dans les paragraphes précédents, nous avons pu constater que l'auxine, de par son transport et sa signalisation, est le principal régulateur des étapes successives du développement de la RL. Nous allons voir que l'auxine est également un levier permettant d'intégrer de nombreux signaux, endogènes et exogènes, afin de réguler la formation de la RL. Nous ne décrivons ici que les principaux facteurs hormonaux et environnementaux influençant la formation des RL, qui sont résumés dans la figure 1.23.

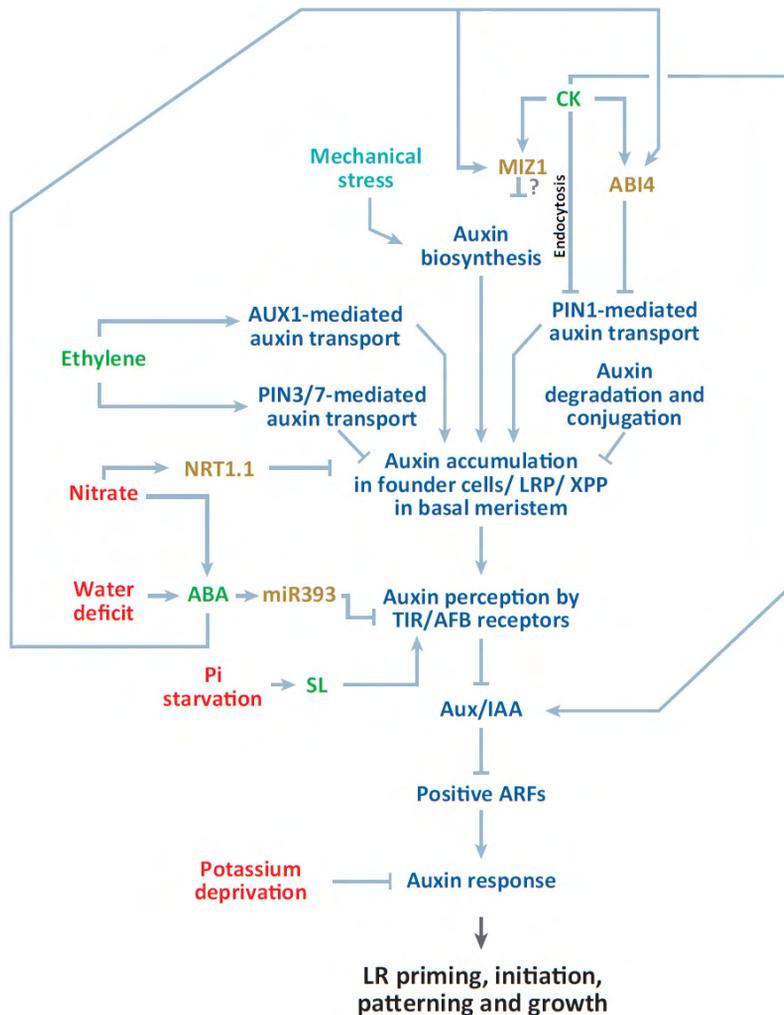


Figure 1.23 • Influence de facteurs biotiques et abiotiques sur le métabolisme de l’auxine permettant la formation des racines latérales

Le développement des racines latérales (« *priming* », initiation, structuration et croissance) dépend du métabolisme de l’auxine (indiqué en bleu). Celui-ci comprend l’accumulation de l’auxine permettant le spécification des cellules fondatrices, sa perception par les récepteurs TIR/AFB, puis sa signalisation via les répresseurs Aux/IAA et les ARFs. L’accumulation d’auxine dépend de son transport via AUX1, PIN1, 3 et 7, ainsi que de sa biosynthèse, sa dégradation ou sa conjugaison.

Les facteurs biotiques agissant sur ce métabolisme sont indiqués en vert (SL: strigolactone, ABA: acide abscissique, éthylène, CK: cytokinines), les facteurs abiotiques en rouge ou turquoise (déficit en potassium, phosphate inorganique (Pi), en eau, et présence d’azote (nitrate) et stress mécanique), et les acteurs moléculaires sont en jaune or.

Source : Lavenus et al., 2013.

4.1. Facteurs endogènes

4.1.a. Les cytokinines

Les cytokinines (CK) sont une famille d'hormones végétales dérivées de bases puriques, dont les principaux représentants sont la zéatine et l'isopentényladénine. Ces molécules sont regroupées dans la famille des CK de par leurs effets similaires sur les plantes. Synthétisées au niveau de l'apex racinaire, elles interviennent dans de nombreux processus développementaux, majoritairement au niveau de la partie aérienne, sur la photosynthèse, la formation des jeunes pousses, les feuilles, *etc.* Les CK et l'auxine ont une action antagoniste : l'application d'auxine régule négativement la biosynthèse des CK (Nordstrom et al., 2004), et ces dernières agissent négativement sur l'accumulation d'auxine. L'équilibre entre auxine et CK contribue à la régulation des divisions cellulaires et de l'organogénèse.

En particulier, les CK ont été décrites comme régulateurs endogènes négatifs de la formation des RL. En effet, il a été observé que les RL étaient plus nombreuses en cas de mutations affectant un récepteur aux CK, ou en favorisant la dégradation des CK (Lohar et al., 2004; Mason et al., 2005). Par ailleurs, la modification de la concentration locale de CK inhibe la formation des RL (Laplaze et al., 2007).

Le mécanisme de cette régulation négative de la formation des RL a été étudiée plus en détail, et il est apparu que les CK agissent directement au niveau des cellules fondatrices, en bloquant le cycle cellulaire avant la mitose (phase G2 à M), et en agissant sur les gradient d'auxine (Laplaze et al., 2007; Li et al., 2006). Cette régulation est dépendante des récepteurs aux cytokinines, notamment CYTOKININ RESPONSE 1/ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE (CRE1/AHK) (Li et al., 2006).

Dans les cellules fondatrices, il a été montré que les CK agissent sur la localisation spatiale de certains transporteurs PIN, modifiant leur action sur le transport de l'auxine, et particulièrement sur l'accumulation d'auxine nécessaire à l'initiation des RL (Laplaze et al., 2007). De plus, les CK semblent responsables d'une réduction de la concentration d'auxine libre, induisant une inhibition de la formation des RL, grâce à l'intervention du gène *MIZU-KUSSEI 1 (MIZI)* (Moriwaki et al., 2011).

Toujours dans les cellules fondatrices, la réponse aux CK est réprimée, tandis qu'elle est induite dans les cellules du péri-cycle aux pôles de protoxylème situées entre les LRP (Bielach et al., 2012). Cela suggère que les CK sont impliquées dans la restriction spatiale du LRP, en évitant que d'autres initiations se produisent entre deux LRP en développement. Une étude récente a mis en évidence que le gène *AHP6 (ARABIDOPSIS HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEIN 6)* agit comme un répresseur de l'action des CK au cours des stades précoces de la formation de la RL. *AHP6* agit sur l'orientation des divisions cellulaires lors de ces stades, en influençant la localisation des transporteurs d'auxine PIN (Moreira et al., 2013).

Les mécanismes de régulation de la RL par les CK sont donc très liés à l'auxine, et se déroulent lors des étapes précoces de formation des RL.

4.1.b. L'acide abscissique

L'acide abscissique ou ABA (*Abscissic Acid*) est une hormone végétale possédant des rôles dans la dormance des graines, la sénescence et l'abscission des feuilles. Elle est également impliquée dans la réponse à de nombreux stress, notamment la réponse au stress hydrique via la fermeture des stomates, l'adaptation aux carences en minéraux, ou encore la défense contre les agents pathogènes. Il a également été découvert un rôle de l'ABA en tant que régulateur de la formation de la RL (De Smet et al., 2006).

L'implication de l'ABA dans la régulation de la formation de la RL peut se séparer en deux actions : l'une sur l'initiation et l'autre sur l'émergence de la RL. L'ABA est décrite pour interagir avec l'auxine, via le gène *ABA INSENSITIVE 3 (ABI3)*, dont l'expression est localisée dans les LRP, et induite par l'auxine (Brady et al., 2003). Le mutant *abi3* est affecté dans la sensibilité à l'auxine pour la formation des RL. La signalisation de l'ABA via *ABI3* est donc requise pour la formation des RL. Il est également connu que la signalisation de l'auxine via les Aux/IAA peut modifier l'activité de l'ABA dans les racines, car des mutants affectés dans certains Aux/IAA occasionnent une modification de la sensibilité à l'ABA (Fukaki et al., 2002). En parallèle, des applications exogènes d'ABA ont montré une inhibition de l'émergence des LRP, indépendante de la voie de signalisation de l'auxine (De Smet et al., 2003). La réponse à l'ABA exogène pourrait passer par une voie de signalisation différente que celle menant à l'initiation de la formation de la RL.

Le rôle de l'ABA est donc assez complexe, et d'autres études seront nécessaires afin de bien comprendre son rôle lors de la formation de la RL.

4.1.c. L'éthylène

L'éthylène est un gaz volatil produit par la plante, considéré comme une hormone végétale. Tout comme l'ABA, l'éthylène joue un rôle dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques. Il est également impliqué dans les étapes de floraison, l'abscission des feuilles et la maturation de nombreux fruits. L'éthylène et l'auxine agissent en interaction pour de nombreux mécanismes, notamment pour la formation de la RL. Stepanova et coll. ont décrit cette interaction, en mettant en évidence que l'éthylène et l'auxine peuvent réguler réciproquement leur biosynthèse, influencer leurs voies de réponse, et/ou agir indépendamment sur les mêmes gènes cibles (Stepanova et al., 2007).

Au niveau de la racine latérale, l'application d'ACC (Acide AminoCyclopropane Carboxilique), qui est le principal précurseur de l'éthylène dans la cellule, inhibe fortement l'initiation des RL, mais stimule l'émergence de LRP déjà formés. Au contraire, il semble que de faibles doses d'ACC aient un effet positif sur la formation de la RL (Negi et al., 2008). L'éthylène régule la formation des RL en interférant avec le transport d'auxine, particulièrement avec le transporteur d'influx AUX1 (Ivanchenko et al., 2008; Negi et al., 2008). Une étude récente démontre que l'éthylène est également responsable de la répression de l'accumulation locale d'auxine nécessaire à l'initiation de la RL, en stimulant l'expression des transporteurs d'efflux PIN3 et PIN7 (Lewis et al., 2011).

Cela démontre une régulation complexe et fine de la formation de la RL par l'éthylène, étroitement liée à l'auxine.

4.1.d. Les strigolactones

Les strigolactones (SL) sont décrites depuis longtemps comme stimulants de la germination des graines de plantes parasites de la famille des Orobanchacées (Cook et al., 1966). Les SL jouent également un rôle dans la symbiose mycorhizienne à arbuscule en stimulant le métabolisme, la ramification et la germination des spores chez les champignons arbusculaires (Akiyama et al., 2005; Besserer et al., 2006). Plus récemment, les SL ont été classées en tant qu'hormones végétales en raison de leurs divers effets sur le développement des plantes (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008). En effet, les SL jouent le rôle de facteur diffusif permettant la réponse à l'auxine lors de la ramification aérienne, mais sont également impliquées dans beaucoup d'autres processus développementaux, comme la ramification racinaire (Kohlen et al., 2011). Une hypothèse de fonctionnement des SL pour la ramification aérienne est une modification de la dominance apicale via une interaction avec l'auxine et peut-être les CK (Ferguson and Beveridge, 2009).

Les SL semblent avoir une action sur l'initiation des RL, en agissant sur le gradient d'auxine dans la racine, nécessaire à la formation des RL (Kapulnik et al., 2011; Ruyter-Spira et al., 2011). Toutefois, ce mécanisme des SL manque encore de clarté, car il est très dépendant de la concentration en SL et en auxine, mais également de la disponibilité en phosphate (Perez-Torres et al., 2008). Il a été montré que les racines de *max4*, un mutant affecté dans la biosynthèse des SL, ne montrent pas de changements dans la formation des RL en condition limitantes en phosphate, tandis que les plantes sauvages présentent une stimulation de la formation des RL (Ruyter-Spira et al., 2011). Il semble donc que la régulation de la formation des RL dans les conditions limitantes en phosphate requière la production de SL.

4.2. Facteurs exogènes

4.2.a. Le stress mécanique

Dès la germination, et tout le long de sa croissance, la racine principale se réoriente en fonction de la texture du sol, en direction du centre de gravité de la Terre. Ce mécanisme est appelé le gravi-tropisme. Chez *A. thaliana*, il a été constaté que les RL apparaissent préférentiellement sur la face convexe de la courbe de la racine principale, induite par le gravi-tropisme (De Smet et al., 2007). Ce mécanisme est régulé par la redirection des flux d'auxine par le transporteur AUX1 (Bennett et al., 1996; Laskowski et al., 2008).

De façon intéressante, il a également été observé qu'une courbure artificielle permettait d'obtenir des RL. La réponse à ce stimulus mécanique induit lui aussi une modification des flux d'auxine (Ditengou et al., 2008; Richter et al., 2009). Cette propriété de la RL ont donné naissance à de nouvelles techniques de

synchronisation du développement de la RL, basés sur des stimuli gravi-tropiques (gravi-stimulation) (Lucas et al., 2008).

4.2.b. La disponibilité en nutriments

L'environnement et particulièrement l'état nutritionnel du sol conditionne beaucoup la ramification racinaire, ce qui fait de celle-ci une variable d'adaptation aux conditions environnementales.

En particulier, la disponibilité en phosphate inorganique (Pi) influence la capacité de la plante à former des RL. En effet, il a été montré que le gène codant pour le récepteur à l'auxine TIR1 était induit dans les cellules du péri-cycle en condition limitantes en Pi, ce qui suggère que la disponibilité en Pi agit sur la sensibilité à l'auxine dans ces cellules, et conduit à la stimulation de la formation des RL (Perez-Torres et al., 2008). De plus, comme indiqué précédemment, la disponibilité en Pi détermine également l'effet des strigolactones sur la formation des RL.

Par ailleurs, on sait que la disponibilité en nitrates influence le développement des RL. L'application de fortes doses de nitrates sur la plante occasionne une réduction du nombre de RL, en bloquant les LRP au cours de l'émergence. Cette action est notamment régulée par l'ABA (Signora et al., 2001; Zhang et al., 1999). Au contraire, des conditions limitantes en nitrates induisent une stimulation du développement des RL, qui semble être liée au gène *ARF8* dont l'expression est induite dans les cellules du péri-cycle en réponse aux nitrates (Gifford et al., 2008). Il a également été montré qu'un micro-ARN, miR393 régule la réponse à l'azote, via le récepteur à l'auxine AFB3 (Vidal et al., 2010). En outre, le transporteur de nitrate NRT1.1 (NITRATE TRANSPORTER 1.1) a été démontré comme étant également capable de transporter l'auxine, ce qui suggère un éventuel lien entre transport des nitrates et de l'auxine pour le contrôle du développement des RL (Krouk et al., 2010).

5. Conclusions

Au cours des dernières années, de grands progrès ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes régulant la formation des RL, à l'aide des nombreux outils disponibles chez la plante modèle *A. thaliana*. La racine latérale est un organe adaptatif, régulé par de nombreux signaux, dont le développement est finement régulé par l'auxine (Figure 1.23).

Chez *M. truncatula*, très peu de ces outils sont disponibles, et le développement des organes racinaires présente une plus grande complexité liée aux capacités symbiotiques de cette plante. Les étapes précoces du développement de la RL sont peu décrites, limitées par l'épaisseur de la racine principale. Il est cependant très probable que beaucoup des mécanismes de développement de la RL soient conservés entre ces deux plantes, permettant de procéder à leur comparaison par analogie.

La prochaine partie s'attachera à résumer les spécificités de *M. truncatula*, et expliquera le contexte et la problématique de la thèse.

Partie C – DEVELOPPEMENT DE LA RACINE LATERALE DANS UN CONTEXTE SYMBIOTIQUE

L'organogénèse racinaire chez *Medicago truncatula* est particulièrement intéressante du fait des capacités de cette plante d'établir les symbioses Légumineuse-Rhizobium (LR) et Mycorhizienne à Arbuscules (MA). Les symbiontes de *M. truncatula* semblent être capables d'influencer le programme développemental de formation des racines latérales de la plante. Cette observation, ainsi que d'autres particularités permettront d'élaborer des hypothèses quant aux mécanismes requis pour la stimulation du développement racinaire par les signaux symbiotiques.

1. Origine et avantages évolutifs de la ramification pour les symbioses

La présence d'un nombre plus important de RL peut représenter un avantage pour la mise en place des symbioses chez *M. truncatula*. En effet, les RL sont des zones préférentielles d'infection par les symbiontes rhizobiens et fongiques : une meilleure ramification suppose un plus grand nombre de sites possibles d'infection. C'est le cas pour les plantes mycorhizées pour lesquelles les racines latérales représentent de nouveaux sites d'infection par le champignon.

Concernant la symbiose rhizobienne, il a été proposé depuis longtemps que le programme développemental pré-existant destiné aux racines latérales a pu être coopté au cours de l'évolution, afin de former des nodules (Mathesius et al., 2000; Nutman, 1948). De plus, la symbiose rhizobienne elle-même semble issue de l'exploitation des voies de signalisation permettant la mise en place de la symbiose mycorhizienne, qui est bien plus ancienne (Geurts et al., 2012). Enfin, dans le cas de certaines endosymbioses, les rhizobia infectent la plante au niveau du site d'émergence des RL (Goormachtig et al., 2004).

En résumé, la symbiose LR a probablement recruté une voie exploitée par la symbiose MA, afin d'interférer avec le programme de développement racinaire, pour pouvoir réactiver les divisions du péricycle, à l'origine de l'organogénèse de la nodosité.

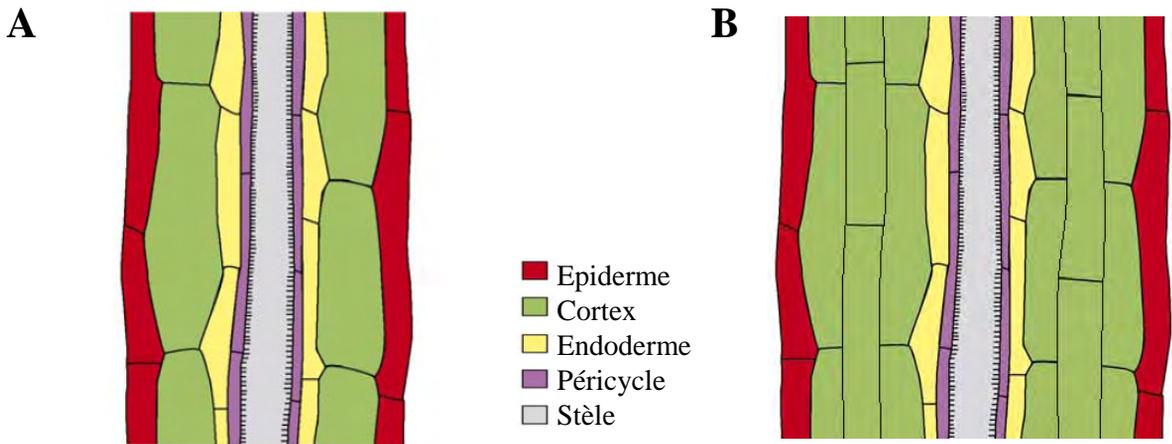


Figure 1.24 • Structure de la racine chez *A. thaliana* et *M. truncatula*

Schéma de coupes longitudinales de racine présentant la morphologie de la racine chez *Arabidopsis thaliana* (A) et *Medicago truncatula* (B), comprenant un plus grand nombre de couches cellulaires corticales.

Adapté de Péret et al., 2009.

Hormone	<i>Arabidopsis thaliana</i>		<i>Medicago truncatula</i>	
	Racine latérale	Racine latérale	Racine latérale	Nodosité
Auxine	+	+	+	+
Cytokinines	-	-	-	+
Éthylène	+ à faible dose puis -	+ à dose moyenne puis -	-	-
Acide abscissique	+ (initiation) - (émergence)	+	-	-

Figure 1.25 • Régulation hormonale différentielle des organes racinaires chez *A. thaliana* et *M. truncatula*

Régulation des organes racinaires chez *Arabidopsis thaliana* et *Medicago truncatula* par certaines phytohormones ; (+) effet positif ; (-) effet négatif.

Selon Lohar et al., 2009 ; Negi et al., 2008 ; Gonzalez-Rizzo et al., 2006 ; Liang & Harris, 2005 ; Mathesius, 2008.

2. Particularités du développement des racines latérales chez *Medicago*

truncatula

2.1. Une racine plus épaisse

La simplicité de la racine d'*A. thaliana* a été particulièrement exploitée afin de décrire et comprendre les mécanismes cellulaires de l'organogénèse racinaire. La finesse de la racine et le petit nombre de couches cellulaires (une seule lignée cellulaire de cortex, Figure 1.24 A) permet de l'observer par transparence, après un simple éclaircissement, ou en fluorescence au microscope confocal.

En revanche, chez *M. truncatula*, la racine présente une épaisseur plus importante, due à la présence de 3 à 5 couches de cortex (Figure 1.24 B). Ceci empêche d'utiliser des outils microscopiques sur la racine entière, tels que le microscope confocal, en raison du trop grand nombre de parois cellulaires qu'il est nécessaire de traverser, et des problèmes de diffraction de la lumière. Par ailleurs, l'observation de plantes de *M. truncatula* en culture indique que le système racinaire est plus complexe que chez le modèle *A. thaliana*, il semble moins prédictible, et il arrive que des racines émergent au même niveau de la racine principale.

La racine de *M. truncatula* est donc moins facile à étudier que celle d'*A. thaliana*.

2.2. Une autre compétence racinaire : la nodosité

Contrairement à *A. thaliana*, la légumineuse *M. truncatula* peut former un second type d'organe racinaire, la nodosité, de par son association symbiotique avec les rhizobia. Si l'on ne se base que sur les connaissances de la RL chez *A. thaliana* et de la nodosité chez *M. truncatula*, il apparaît que ces deux organes ont une origine commune dans le péricycle, mais une ontogénie différente par la suite : en effet, la RL chez *A. thaliana* se forme à partir du péricycle, et de péricycle seulement ; tandis que la nodosité trouve son origine dans des divisions corticales, bien que le péricycle et l'endoderme soient eux aussi sollicités (Complainville et al., 2003; Malamy and Benfey, 1997; Timmers et al., 1999).

En effet, la prolifération cellulaire corticale se déroulant lors de l'organogénèse de la nodosité laisse penser que les légumineuses possèdent une sensibilité particulière aux hormones. En effet, plusieurs hormones, parmi lesquelles l'auxine et les cytokinines, sont impliquées dans les divisions corticales (Plet et al., 2011; Suzaki et al., 2012).

2.3. Une réponse différentielle aux hormones pour la formation de la racine latérale

La régulation de la formation de la nodosité implique le même type d'hormones que la formation de RL, mais leurs effets sont différents, voire opposés entre les deux organes racinaires (Figure 1.25).

Il a notamment été suggéré que la balance auxine/cytokinines est un levier important permettant la bifurcation vers la formation d'une racine ou d'une nodosité (Desbrosses and Stougaard, 2011; Mathesius, 2008). L'auxine joue un rôle prépondérant lors de la formation de la racine et semble impliquée dans le développement de la nodosité, même si nos connaissances à ce niveau sont limitées (Mathesius, 2008). Son effet est globalement positif sur ces deux organes racinaires. En revanche, ce n'est pas le cas pour les cytokinines qui sont stimulatrices sur la nodosité, mais on a un rôle inhibiteur sur la RL (Gonzalez-Rizzo et al., 2006).

Il est également décrit que la formation de RL chez les légumineuses est stimulée par une faible concentration d'acide abscissique (ABA), alors qu'elle est inhibée par cette hormone chez les non-légumineuses (Liang and Harris, 2005). La sensibilité à l'éthylène est elle aussi différente chez les plantes à nodosités pour ce qui est de la formation de la RL (Lohar et al., 2009; Negi et al., 2008) (Figure 1.25).

La régulation des organes racinaires chez *M. truncatula* semble donc liée à un équilibre hormonal très finement régulé.

2.4. Une ontogénie différente pour la formation de la racine latérale entre *A. thaliana* et *M. truncatula* ?

Il a été généralement admis que la RL de *M. truncatula* se développe comme celle d'*A. thaliana* (Ariel et al., 2010; Desbrosses and Stougaard, 2011), ce qui constitue une imprécision due au manque de descriptions disponibles. En effet, certaines observations suggèrent que l'ontogénie de la RL chez *M. truncatula* ainsi que chez certaines autres plantes, particulièrement d'autres légumineuses et des monocotylédones, puisse différer du paradigme admis chez *A. thaliana*. Quelques travaux suggèrent une formation des RL substantiellement différente d'*A. thaliana*, chez les légumineuses *Arachis hypogaea* (Mallory et al., 1970), *Glycine max* (Byrne et al., 1977), et plus récemment *Lotus japonicus* (Op den Camp et al., 2011), ainsi que chez des monocotylédones (Orman-Ligeza et al., 2013; Smith and De Smet, 2012).

Toutefois, il n'existe pas d'études descriptives complètes des étapes de formation des RL chez *M. truncatula*.

2.5. Des mécanismes de régulation de la racine latérale encore peu décrits

La régulation de la RL chez *M. truncatula* n'est pas encore bien documentée. L'auxine est évidemment le principal régulateur, mais les effets d'autres hormones sont différents entre *A. thaliana* et *M. truncatula* (Figure 1.25), ce qui suggère une sensibilité différente aux hormones et probablement une régulation en partie différente.

Tout comme chez *A. thaliana*, la RL chez *M. truncatula* est régulée par l'environnement. Le gène *HBI*, régulé par le stress salin, ainsi que par l'acide abscissique, code pour un facteur de transcription de

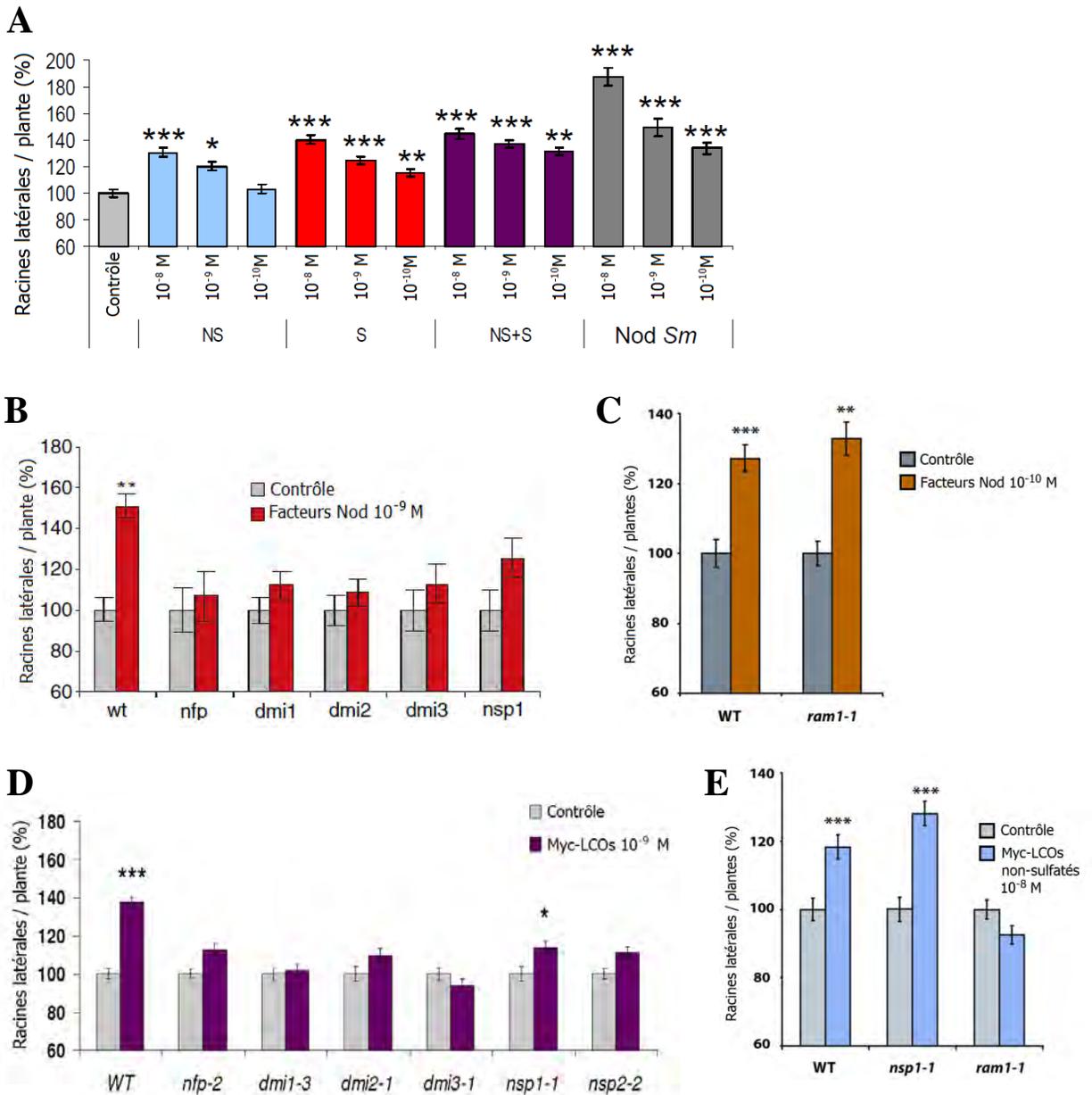


Figure 1.26 • Influence des LCOs sur le développement des racines latérales chez *Medicago truncatula*

(A) Les Myc-LCO sulfatés (S) ou non-sulfatés (NS), ainsi que les facteurs Nod de *S. meliloti* (Nod *Sm*), stimulent la formation des racines latérales, chez *M. truncatula*. Leur effet est dépendant de la dose de traitement (10⁻⁸, 10⁻⁹ ou 10⁻¹⁰ M). Les Myc-LCOs sont globalement moins actifs que les facteurs Nod, et les Myc-LCOs sulfatés sont plus actifs que les non-sulfatés.

(B et C) La stimulation de la formation des RL par les facteurs Nod dépend de *NFP*, *DMII*, 2 et 3 et *NSP1*, mais pas de *RAMI*.

(D et E) La stimulation de la formation des RL par les Myc-LCOs dépend de *NFP*, *DMII*, 2 et 3 et *NSP2*, mais pas de *NSP1* (partiellement). *RAMI* est requis pour cette stimulation en réponse aux Myc-LCOs non-sulfatés.

Sources : Maillet et al., 2011 (A et D), Olàh et al., 2005 (B), Gobbato et al., 2010 (C et E).

type HD-Zip I (class I HomeoDomain-leucine Zipper), qui est impliqué dans la régulation négative de l'émergence des RL, de part son action inhibitrice sur le gène *LBD1* (*LOB BINDING DOMAIN 1*) de la famille des LOB (*Lateral Organ Boundary*). Ce facteur de transcription est impliqué dans la transition des LRP vers l'émergence (Ariel et al., 2010). Il a également été montré qu'un facteur de transcription de type NAC (NAM/ATAF/CUC⁹), *MtNAC969* est important pour la régulation de l'organogénèse et la sénescence des nodosités chez *M. truncatula*. Il est lui aussi induit par le stress salin et par l'azote, et semble réguler négativement la formation des RL chez *M. truncatula* (de Zelicourt et al., 2012). Par ailleurs, la régulation post-transcriptionnelle par des micro-ARN (miR) est de plus en plus étudiée. Il a été remarqué que *miR166*, impliqué dans la formation de la vascularisation des organes racinaires, inhibait la formation des RL et des nodosités en agissant sur certains facteurs de transcription (Boualem et al., 2008).

3. Influence des symbiotes sur la racine latérale chez *Medicago truncatula*

3.1. Les facteurs Nod stimulent la formation des racines latérales

Olàh et coll. ont analysé chez *M. truncatula* les réponses racinaires aux facteurs Nod, et ont mis en évidence que ces derniers stimulaient la formation des RL (Figure 1.26 A) (Olàh et al., 2005). En présence des rhizobia, les racines de *M. truncatula* établissent la symbiose fixatrice d'azote, et la production de facteurs Nod est essentielle pour l'organogénèse de la nodosité, mais la seule présence des facteurs Nod (par exemple par application artificielle sur la racine) ne permet pas la formation de la nodosité chez *M. truncatula*, ce qui implique l'existence d'une autre signalisation activée par les Rhizobia. Cela n'est pas le cas chez *Medicago sativa* (la luzerne cultivée), chez laquelle il est possible d'obtenir des nodosités non-infectées en réponse aux facteurs Nod produits par son symbiote rhizobien (Truchet et al., 1991).

Ces éléments laissent penser que les facteurs Nod jouent un rôle prépondérant dans la formation des organes racinaires, et que les mécanismes mis en place pour l'organogénèse du nodule mettent en jeu des programmes développementaux liés à la formation de la RL, comme il a été suggéré depuis longtemps (Nutman, 1948).

3.2. Les Myc-LCOs stimulent la formation des racines latérales

En parallèle, les auteurs des travaux sur la stimulation de la ramification racinaire par les facteurs Nod ont également suggéré que des facteurs diffusibles émis par des champignons mycorhiziens ont également cet effet, en constatant une augmentation du nombre de RL chez des plantes cultivées avec des

⁹ D'après le nom des trois premiers gènes identifiés dans cette famille de facteurs de transcription chez *Arabidopsis thaliana* : *NO APICAL MERISTEM* (*NAM*), *ARABIDOPSIS THALIANA TRANSCRIPTION ACTIVATION FACTOR 1* et 2 (*ATAF1/2*) et *CUP-SHAPED COTYLEDON 2* (*CUC2*)

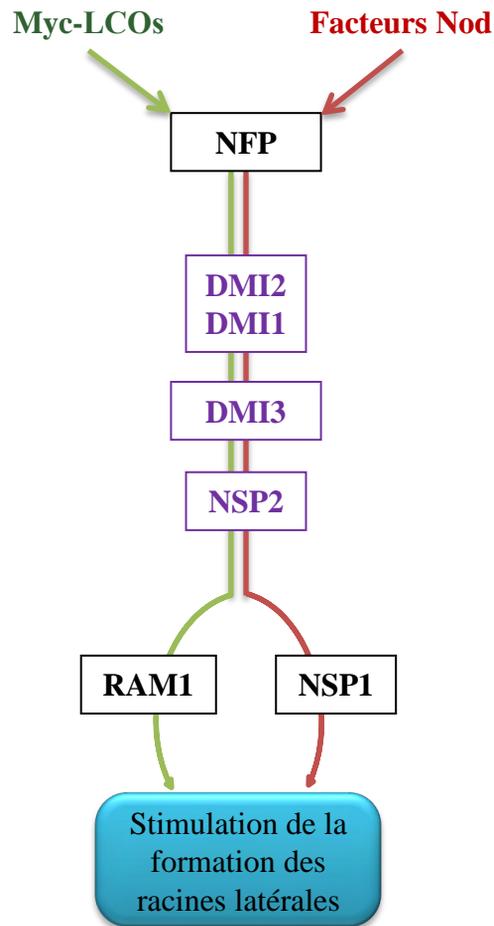


Figure 1.27 • Voie de signalisation commune menant à la stimulation de la ramification racinaire

La stimulation de la formation des racines latérales par les Myc-LCOs et les facteurs Nod dépend d'acteurs présents dans la voie de signalisation symbiotique (cf. Figure 1.11). Elle présente des acteurs moléculaires communs, mais bifurque via les facteurs de transcription RAM1 et NSP1.

spores de champignon MA séparées des racines par une membrane (Olàh et al., 2005). Il est également décrit que l'application d'exsudats de spores de champignon MA *Rhizophagus irregularis* entraîne une stimulation de la formation des RL chez *M. truncatula*, mais également chez *Oryza sativa* (Riz) et *Zea mais* (Maïs) (Mukherjee and Ane, 2011). De plus, de façon intéressante, il a été montré que des champignons ectomycorhiziens (dont les hyphes colonisent les espaces intercellulaires de la plante) du genre *Laccaria*, induisaient une stimulation de la formation des RL chez le Peuplier ainsi que chez *A. thaliana* (Felten et al., 2009). La conservation chez des dicotylédones et des monocotylédones de cette action positive des molécules produites par les champignons symbiotiques suggèrent qu'il s'agit d'un mécanisme commun et ancien.

Récemment, il a été montré dans l'équipe que des LCOs similaires aux facteurs Nod, produits par *Rhizophagus irregularis*, les Myc-LCOs, favorisent la ramification racinaire chez *M. truncatula* (Figure 1.26 A). Il a donc été proposé que ces Myc-LCOs correspondent aux facteurs diffusibles fongiques décrits pour stimuler la formation des RL (Maillet et al., 2011; Olàh et al., 2005). En effet, la ramification racinaire est augmentée de 35% par un traitement avec un mélange de Myc-LCOs à une concentration de 10^{-9} M (Figure 1.26 A). En comparaison, un traitement de jeunes plantules par des facteurs Nod (Nod Sm) à une concentration de 10^{-9} M entraîne une augmentation du nombre de RL de 50% (Figure 1.26 A) (Maillet et al., 2011). Les Myc-LCOs sulfatés (S) semblent plus actifs que les non-sulfatés (NS) sur la ramification racinaire chez *M. truncatula* : à faible concentration (10^{-10} M), les Myc-LCOs sulfatés améliorent la ramification racinaire de 15%, tandis que pour les Myc-LCOs non sulfatés, la stimulation n'est pas significative (Figure 1.26 A).

3.3. La stimulation de la formation des racines latérales par les LCOs dépend de la voie de signalisation symbiotique commune

De façon très intéressante, il apparaît que cette stimulation de la ramification racinaire est dépendante de la CSSP, la voie de signalisation menant aux symbioses LR et MA (Figure 1.26 B, C, D, E). Les gènes symbiotiques *DMI1*, *DMI2* et *DMI3*, absolument requis pour la mise en place des deux symbioses, sont aussi nécessaires pour la stimulation de la ramification racinaire par les facteurs Nod et les Myc-LCOs (Maillet et al., 2011; Olàh et al., 2005). Le gène *NSP1*, décrit récemment comme requis dans la symbiose LR et MA, est nécessaire pour la stimulation des RL par les facteurs Nod, mais seulement partiellement nécessaire en réponse aux Myc-LCOs (Figure 1.26 D). Le gène *RAM1*, récemment montré comme étant indispensable à la mycorhization, est aussi requis pour la réponse aux Myc-LCOs non-sulfatés menant à la stimulation de la ramification racinaire, mais n'est pas requis pour cette stimulation par les facteurs Nod (Gobbato et al., 2012) (Figure 1.26 C et E).

La voie permettant la stimulation de la ramification racinaire par les facteurs symbiotiques est donc associée aux processus symbiotiques induits par ces molécules (Figure 1.27)

4. Objectifs du projet de thèse

Si le fait que les facteurs symbiotiques Nod et Myc-LCOs stimulent la formation des RL est bien connu, il n'y a aucune documentation décrivant à quel stade du développement des RL ils agissent, ni s'il existe une zone préférentielle d'action de ces molécules le long de la racine primaire. Les acteurs moléculaires impliqués dans cette stimulation sont également inconnus, tout comme les éventuelles interactions des LCOs avec les voies hormonales de la plante. Afin de comprendre les mécanismes de cette stimulation, des pré-requis sont nécessaires : Les étapes cellulaires de développement de la RL chez *M. truncatula* sont insuffisamment décrits, et peu d'outils histologiques sont disponibles chez cette plante pour établir cette caractérisation.

Par conséquent, l'objectif de ce projet de thèse est, dans un premier temps, d'aboutir à une meilleure compréhension des étapes de formation de la RL chez *M. truncatula* à l'aide d'outils histologiques, puis, dans un deuxième temps, de documenter le stade et la zone d'action des LCOs pour la stimulation du développement de la RL, et troisièmement, en raison de l'implication des hormones dans le développement des organes racinaires, de mieux comprendre les éventuelles interactions des LCOs avec les voies hormonales, et de trouver de nouveaux acteurs moléculaires dans ce mécanisme.

4.1. Outils de suivi du développement des racines latérales

L'auxine étant le principal régulateur de la RL, le marquage précoce des RL est souvent effectué en étudiant la localisation de l'accumulation d'auxine. En effet, c'est une caractéristique précoce et constante des étapes successives de formation de la RL (Benkova et al., 2003). Toutefois, l'accumulation de l'auxine chez les plantes est difficile à mesurer avec précision. La communauté scientifique est donc passée par des méthodes indirectes afin d'estimer la présence d'auxine, et particulièrement par le biais de gènes rapporteurs. Le premier objectif de la thèse a donc été de développer des outils permettant de localiser les primordia de RL chez *M. truncatula* avant émergence, en se basant sur l'accumulation d'auxine. Nous avons donc généré des plantes transgéniques stables portant des marqueurs *DR5:GUS* et *DR5:VENUS-N7*, qui n'étaient pas disponibles chez *M. truncatula* jusqu'alors.

4.2. Description cellulaire de la racine latérale chez *Medicago truncatula*

Un autre objectif au début de la thèse était d'aboutir à une description cellulaire et tissulaire des étapes successives de la formation des RL chez *M. truncatula*, étant donné que celle-ci n'avait pas encore été réalisée, et que plusieurs travaux suggèrent un développement de la RL quelque peu différent des descriptions généralement admises. L'objectif de cette description était de se donner un cadre développemental sur lequel se baser pour ensuite analyser de façon spatio-temporelle les effets des LCOs sur la RL de *M. truncatula*, en cherchant sur quel(s) stade(s) et quel(s) tissu(s) agissent ces molécules.

Nous avons réalisé ce travail à l'aide d'outils cytologiques, tels que des marqueurs de type *pSCR:GUS*, afin de localiser rapidement les primordia de RL, et de coupes longitudinales et transversales ultrafines de racines analysées au microscope.

4.3. Analyse spatio-temporelle de l'effet des LCOs sur la racine latérale

Après avoir précisément décrit les stades successifs de la RL chez *M. truncatula*, l'objectif a été de déterminer si un ou plusieurs de ces stades, ou un ou plusieurs tissus ou zones de la racine, étaient particulièrement sensibles à l'action des LCOs. Pour cela, nous nous sommes servis des marqueurs *DR5:GUS* et *DR5:VENUS-N7*, et nous avons développé des outils de traitements locaux par des LCOs.

4.4. Recherche d'interactions avec des phytohormones

Après ces travaux d'analyse spatio-temporelle, nous avons cherché à identifier des interactions entre LCOs et phytohormones. Nous avons choisi de nous baser sur trois stratégies parallèles, de manière à pouvoir ensuite intégrer les résultats. Une approche pharmacologique a été mise en place afin de mettre en évidence des effets additifs ou synergiques entre LCOs et hormones. Ensuite, une approche génétique a eu pour objectif de déterminer si certains gènes de *M. truncatula*, affectés dans les voies de signalisation hormonales, conservaient la réponse de stimulation de la formation des RL par les LCOs. Enfin, une approche transcriptomique sans *a priori* a été mise en place afin de trouver quel type de mécanisme pouvait être impliqué en réponse aux hormones (particulièrement à l'auxine), et aux LCOs (facteurs Nod).

4.5. Perspectives : l'agriculture de demain

L'objectif appliqué de cette thèse est de mieux comprendre le mode d'action des LCOs pour des objectifs agronomiques. En effet, des LCOs, soumis à brevet, sont d'ores et déjà utilisés en champs par l'entreprise Novozymes, en tant que biostimulants, afin d'augmenter les rendements agricoles dans un contexte d'appauvrissement des sols, d'augmentation des besoins alimentaires de la population humaine, et de nécessité de préserver l'environnement en limitant les intrants chimiques. Par ailleurs, Novozymes¹⁰ a investi beaucoup dans le domaine des stratégies naturelles d'amélioration des rendements. Cette entreprise a cofinancé cette thèse avec l'objectif d'enrichir les connaissances sur les réponses racinaires des plantes aux LCOs.

¹⁰ Plus d'informations sur www.bioag.novozymes.com/en/products/Pages/default.aspx

Ainsi, si les résultats à court terme de ce projet de thèse ne peuvent être qu'à visée fondamentale, ils peuvent à long terme se révéler importants dans les recherches futures d'amélioration des rendements agricoles.

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

1. Préparation des molécules

Les facteurs Nod, produits par la souche 2011 de *Sinorhizobium meliloti*, et les Myc-LCOs sulfatés et non-sulfatés, synthétisés par le CERMAV de Grenoble, nous ont été aimablement procurés par Fabienne Maillet (LIPM Toulouse). Les facteurs Nod et les Myc-LCOs lyophilisés sont solubilisés dans un mélange 50/50 (v/v) d'eau et d'acétonitrile pour obtenir une solution stock à 10^{-3} M. L'analogue d'auxine ANA (Acide Naphtalène Acétique, Sigma) a été préparé dans de l'éthanol 50% et quelques gouttes de KOH 0.1 M, puis diluée dans de l'eau stérile à une concentration de 10^{-2} M. Le stock a été stérilisé par filtration avec un filtre de 22 μ m. Le NPA (Acide Naphtylphtalamique, Duchefa Biochemie) est dissout dans du DMSO (Diméthyle Sulfoxyde) à une concentration de 10^{-2} M. Le précurseur de l'éthylène, l'ACC (Acide 1-AminoCyclopropane-1-Carboxilique, Sigma) est conservé à une concentration de 10^{-2} M dans de l'eau.

Les solutions stock de ces molécules sont aliquotées et conservées à -20°C . Des dilutions dans de l'eau stérile sont effectuées afin d'aboutir à la concentration souhaitée dans les milieux de culture.

2. Matériel végétal

2.1. Géotypes

La plupart des expériences ont été conduites sur les lignées de *M. truncatula* Jemalong A17 et 2HA. Les transformations par *Agrobacterium rhizogenes* sont effectuées dans le fond A17, tandis que les transformations stables sont obtenues dans le géotype 2HA. Les graines du mutant *Mtcre1-1* (fond A17) nous ont été fournies par Florian Frugier (ISV, Gif-sur-Yvette) ainsi que le sauvage back-crossé correspondant. Le mutant *ccd7*, ainsi que son équivalent sauvage back-crossé (fond R108) nous ont aimablement été procurés par Soizic Rochange (LRSV, Toulouse).

2.2. Conditions de germination des graines

Après récolte, les graines de *M. truncatula* doivent être mises à sécher une semaine à 28°C . Les graines sont extraites des gousses à l'aide d'une taloche et d'un support en caoutchouc, puis placées dans un erlenmeyer. La scarification est réalisée dans un bain d'acide sulfurique 95% de 5 min, puis les graines sont rincées 5 fois à l'eau osmosée. La suite du travail se déroule stérilement. Les graines sont baignées 2

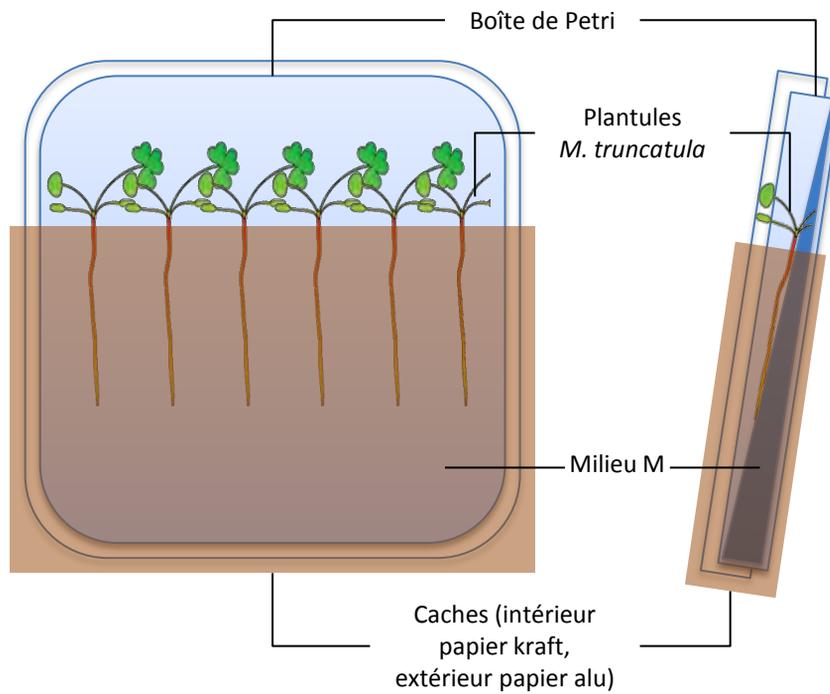


Figure 2.1 • Système de culture en boîte de Petri

Les plantules sont disposées sur boîtes de milieu M après germination, la racicule en contact avec le milieu. Les boîtes sont couvertes aux 3/4 par des caches.

min précises dans de la javel à 3,2% conservée à 4°C, puis un premier rinçage est réalisé avec de l'eau stérile, tout en transférant l'ensemble dans un nouvel erlenmeyer stérile. Enfin, 5 rinçages sont effectués avec de l'eau stérile. Les graines sont laissées 15 min dans la dernière eau de rinçage pour imbibition.

Les graines ainsi traitées sont déposées sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose 0,5X (à température ambiante), et étalées à l'aide d'une spatule stérilisée à l'éthanol 95%. Ces boîtes sont fermées par du parafilm, entourées de papier aluminium, et déposées à 4°C à l'envers (gélose en haut) pendant 3 jours pour lever la dormance des graines. Les boîtes sont ensuite placées à 25°C, toujours dans de l'alu et à l'envers, pendant environ 15 heures, pour stimuler leur germination de façon synchronisée.

Le taux de germination, ainsi que la qualité de la synchronisation, dépendent de la lignée utilisée. Au besoin, pour des lignées difficiles de *M. truncatula*, on pourra allonger le temps de scarification à 10 minutes maximum, ou prolonger l'incubation à 4°C.

2.3. Traitements en milieu solide

La méthode de traitement de plantes la plus souvent utilisée dans ce manuscrit, et qui a servi à mettre en évidence les effets racinaires des LCOs (Maillet et al., 2011; Olàh et al., 2005), est réalisée en incorporant les molécules (LCOs, hormones, etc.) dans le milieu de culture.

Pour cela, des plantules germées de *M. truncatula* sont déposée selon le schéma (Figure 2.1) à la surface d'un milieu de culture minimal appelé milieu M (composition en Annexe A). Ce milieu est solidifié par du Phytigel (Sigma-Aldrich) à 4 g/L. Les LCOs ou hormones sont ajoutées au milieu après autoclave, lorsque la température du milieu a baissé mais avant polymérisation. Les milieux sont coulés dans des boîtes de Pétri carrées de 12 x 12 cm légèrement inclinées, à raison de 75 ml par boîte, puis séchés 20 min sous une hotte à flux laminaire.

Après y avoir déposé les plantules bien en contact avec le milieu, les boîtes de Pétri sont fermées par du parafilm en laissant ouvert le côté haut, ou par deux morceaux de scotch. Les boîtes sont entourées de poches en papier alu et papier kraft, comme sur le schéma (Figure 2.1), puis placées en chambre de culture à 21°C, avec 16h de jour et 8h de nuit. Ces conditions de culture (milieu M, Phytigel, température, etc.) seront utilisées dans d'autres cas, sans y incorporer de LCOs, et on s'y référera en tant que « conditions classiques ».

2.4. Traitements de plantules en milieu liquide

Après germination, les plantules de *M. truncatula* sont transférées sur un milieu M ne contenant aucun LCO, selon les conditions classiques (cf. paragraphe précédent). Les plantes sont placées 3 jours à 21°C en chambre de culture.

Après cette période de 3 jours, les plantes sont rapidement sorties de boîtes de Pétri, regroupées par 25-30 sur l'une des boîtes, puis placées dans des pots plastiques stériles (H = 5 cm ; l = 2 cm) contenant

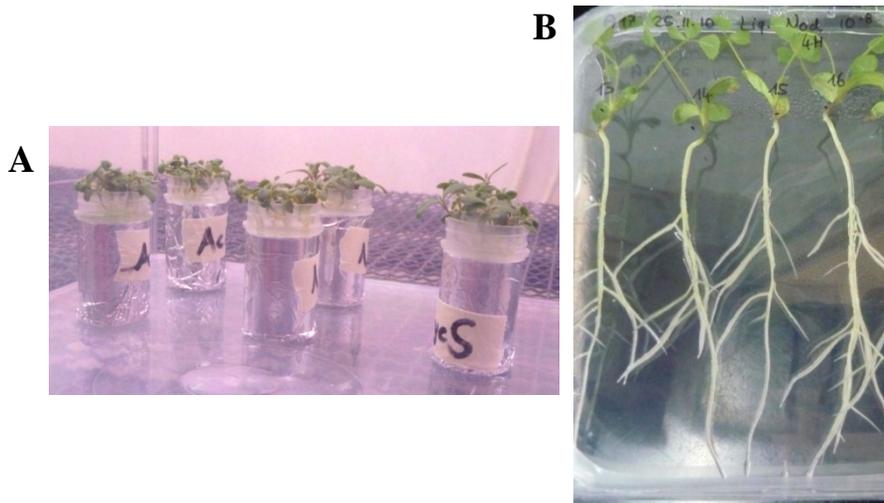


Figure 2.2 • Méthode de traitement en milieu liquide

Les plantules sont récoltées avec 3 jours passés sur milieu M, et transférées dans des pots entourés de papier aluminium (A) placés dans une enceinte semi-stérile en chambre de culture. Après 4h ou 24h de traitement, les plantules sont transférées à nouveau sur milieu M et la ramification racinaire est mesurée (B).

15 ml de milieu M liquide, et entouré de papier aluminium (Figure 2.2). Les plantules ne doivent pas passer trop de temps sous le flux de la hotte, car elles dessèchent rapidement. Elles ne doivent ni être entièrement plongées dans le milieu, ni toucher le fond du pot en plastique : elles doivent se maintenir les unes les autres. Enfin, il faut veiller à les conserver stériles (travailler avec 2 pinces stériles). Une fois toutes les plantules disposées en pot, le milieu M est remplacé, à l'aide d'une pipette fine, par 15 ml de milieu M additionné de LCOs à la concentration souhaitée. Les pots sont déposés dans une enceinte semi-stérile (boîte cristal lavée à l'alcool), à 21°C pendant 4 heures ou 24 heures, selon la durée du traitement souhaitée.

À la fin du traitement, les pots sont récupérés et le milieu évacué. Les plantules sont rincées au milieu M liquide, puis disposées dans de nouvelles boîtes de milieu M, à raison de 6 à 10 plantules par boîte.

Les boîtes sont ensuite fermées et placées à 21°C selon les conditions classiques.

2.5. Traitements de graines en milieu liquide

Trois protocoles distincts de traitement de graines ont été testés. Le premier consiste à imbiber les graines d'une solution de LCOs, en remplaçant les 15 min d'imbibition après la stérilisation par 1h dans de l'eau stérile additionnée de facteurs Nod à 10^{-8} M. Les graines sont ensuite mises à germer normalement. Pour le second protocole, les LCOs ont été incorporés à une concentration de 10^{-8} M dans la gélose 0,5X contenue dans les boîtes de germination. Les étapes suivantes sont réalisées normalement. Pour finir, le troisième traitement a consisté à baigner les graines, tout de suite après germination, dans une solution de facteurs Nod à 10^{-8} M. Dans les trois cas, les graines germées ont ensuite été cultivées dans les conditions classiques.

2.6. Applications locales de facteurs Nod

Les applications locales sont pratiquées sur des plantules de *M. truncatula* âgées de 1 ou 3 jours, ayant poussé sur milieu M (conditions classiques).

Les LCOs sont incorporés dans 5 ml d'agarose 2% rapidement coulé dans des petites boîtes de Pétri rondes (5,2 cm de diamètre), afin de former une épaisseur d'agarose d'environ 2 mm. Cette couche d'agarose est découpée à l'aide d'un scalpel stérile refroidi (l'agarose fond facilement) pour former des cubes de 2 mm de côté. Les cubes sont ensuite déposés au contact de la racine primaire des plantules, laissées sur leur milieu, en veillant à ne pas abîmer la racine. L'endroit où est appliqué le cube est auparavant marqué au charbon mélangé à un peu d'eau stérile, à l'aide d'un cure-dent stérile.

2.7. Synchronisation de la formation des RL

Afin d'obtenir une formation synchronisée de RL, nous avons adapté pour *M. truncatula* une technique de synchronisation utilisée par Himanen et coll. (Himanen et al., 2002). Cette technique se déroule en trois étapes. En premier lieu, des plantules A17 germées sont cultivées 2 ou 3 jours (selon l'expérience, cf. Résultats, partie C) dans les conditions classiques. Elles sont ensuite transférées 2 ou 3 jours (idem) sur un milieu M dans lequel du NPA a été incorporé à 10^{-5} M. Enfin, elles sont transférées sur un milieu M contenant de l'ANA à 10^{-6} M qui permet de restaurer leur capacité de formation des RL. Afin d'étudier les étapes précoces de formation de la RL, les plantes sont prélevées après un temps relativement court passé sur milieu additionné d'ANA.

3. Analyse de la ramification racinaire

3.1. Suivi cinétique des racines émergées

Afin de mesurer la ramification racinaire, les plantes sont observées à l'œil nu, en regardant à travers le milieu M face à une lampe. Le nombre de RL émergées par plante est compté quotidiennement sur 40 à 60 plantes par condition, durant une période de 4-5 jours consécutifs. La période idéale pour mettre en évidence une différence dépend de la molécule et du génotype à tester, il faut donc d'abord tester une cinétique complète (de 0 à 15 jours) afin de trouver la meilleure fenêtre. Les plantes ne doivent pas toucher le fond de la boîte, car cela entraîne la courbure de la racine, ce qui risque de modifier leur taux de ramification. De plus, le comptage est beaucoup plus compliqué.

3.2. Calcul du pourcentage de stimulation

Pour présenter les données obtenues après un comptage de RL, il est possible de réaliser un graphique cinétique pour voir l'évolution de la ramification en fonction du temps, ou de calculer le pourcentage de stimulation à partir de ces données pour faciliter les comparaisons. Pour cela, pour chaque plante, le nombre de RL est divisé par la moyenne du nombre de RL chez les plantes en condition contrôle, et transformé en pourcentage. Cela est réalisé pour les plantes traitées et contrôle pour chaque jour mesuré (ou chaque jour du GLM s'il y a lieu, cf. 3.4). Ensuite, une moyenne générale est calculée sur l'ensemble de la cinétique (elle doit retomber sur 100% chez les plantes contrôle), qui correspond au pourcentage de stimulation sur la cinétique.

3.3. Calcul de la densité racinaire

Lorsque l'on effectue un test de ramification racinaire avec des molécules qui modifient la croissance de la racine primaire (ex. : ANA), il est nécessaire de présenter les données sous forme de densité racinaire. La position de l'apex de la racine primaire est marquée au feutre fin chaque jour sur la boîte de Pétri, et ces dernières sont scannées à la fin de la cinétique. Les images sont traitées à l'aide du logiciel ImageJ afin de mesurer la longueur de la racine primaire de chaque plante. Ensuite, pour chaque plante, le nombre de RL est divisé par la longueur de sa racine primaire afin d'obtenir un nombre de RL par centimètre, appelé densité racinaire.

3.4. Analyses statistiques

Avant de comparer deux séries de donnée de nombre de RL, la première étape est de vérifier leur conformité à la loi normale ; ceci est réalisé par un test de Kolmogorov-Smirnov. L'homogénéité des variances des différentes séries à comparer est vérifiée par un test de Levene.

Si ces deux conditions sont réunies, et que les séries sont au moins de 30 échantillons, il est possible d'utiliser des tests statistiques paramétriques. Pour des analyses simples, comme la comparaison du nombre de RL à un jour donné, les données peuvent être analysées par un test de Student ou une ANOVA. Les données de comptage quotidien sont analysées à l'aide du modèle général linéaire (GLM) qui permet de tenir compte des mesures répétées, et de mettre en évidence des différences plus ténues. Le modèle utilisé prend en compte l'interaction entre le jour de mesure et le traitement. Une analyse de groupes homogènes a été ajoutée si plus de deux traitements étaient comparés. Pour valider les résultats des GLM, différents paramètres ont été vérifiés : le pourcentage de variabilité expliquée, appelé R-carré ajusté (de préférence entre 85 et 100%), la conformité à la loi normale de la distribution des résidus extraits du modèle (testée avec un test de Kolmogorov-Smirnov ou de Shapiro-Wilks), et la significativité du traitement (p -value < 0,05 pour la variable traitement)

En revanche, si les variances des séries ne sont pas homogènes, et/ou que les données n'obéissent pas à une loi normale, un test non-paramétrique est utilisé. Les données ont été comparées par un test de Kruskal-Wallis, qui est basé sur une comparaison des médianes. Ce test ne tient pas compte des mesures répétées, et il est toujours préférable de faire un GLM. Si seule la conformité à la normalité pose un problème, il est possible de transformer les données de nombre de RL par la formule $\log_{10}(1+\text{nombre de RL})$.

La comparaison entre deux répartitions est réalisée à l'aide d'un test de $\text{K}\chi^2$.

Les analyses statistiques ont été réalisées sous Statgraphics (Sigma) ou Excel (Microsoft). Pour l'ensemble des tests, nous avons choisi le seuil de significativité de 0,05. Une étoile correspond à une p -value comprise entre 0,05 et 0,01, deux étoiles à une p -value comprise entre 0,01 et 0,001, et trois étoiles à une p -value inférieure à 0,001.

4. Développement de marqueurs histochimiques

4.1. Origine des constructions

Le marqueur *DR5:GUS*, dans un vecteur binaire pBI, nous a été procuré par Laurent Laplaze de l'IRD à Montpellier (Perrine-Walker et al., 2010). Les gènes rapporteurs *pSCR1:GUS* et *pSCR2:GUS* (Sbabou et al., 2010), issues de *Lupinus albus* (Lupin blanc), ont pu être obtenus grâce à C. Vance (*University of Minnesota*, U.S). M. Heisler (EMBL, Heidelberg, Germany) nous a fourni la construction *DR5:VENUS-N7* (Heisler et al., 2005). Ces constructions sont dotées d'un gène de résistance à la Kanamycine (pour *DR5:GUS*, *pSCR1:GUS* et *pSCR2:GUS*) ou à la phosphinothricine (PPT, pour *DR5:VENUS-N7*) comme marqueur de sélection pour la plante. Pour les bactéries, la sélection se fait grâce à la kanamycine.

4.2. Racines chimériques

4.2.a. Protocole de transformation

Les constructions ont en premier lieu été introduites dans des racines de *M. truncatula* A17 par une transformation à l'aide d'*Agrobacterium rhizogenes* (Boisson-Dernier et al., 2001). Les plantules germées de *M. truncatula* ont été sectionnées à 3 mm de l'apex, puis trempées dans une culture épaisse d'*A. rhizogenes* développée sur milieu L supplémenté de 50 µg/ml de Kanamycine. Elles sont déposées sur des boîtes de Pétri carrées 12 x 12 cm contenant du milieu Fåhraeus (composition en Annexe B) incliné additionné d'1 mM d' NH_4NO_3 et 20 µg/ml de Kanamycine ou 2,5 ng/l de PPT. Ces boîtes sont placées verticalement en chambre de culture à 21°C pour une semaine, afin de régénérer des cellules dédifférenciées au niveau de la blessure, de part l'action des bactéries. Elles sont ensuite transférées à 25°C pendant environ 2 semaines au cours desquelles des racines chimériques vont se développer à partir de cet amas de cellules. Les racines qui ont intégré la construction pourront se développer sur le milieu, grâce au marqueur de sélection de résistance à la Kanamycine ou au PPT, tandis que les racines qui ne l'ont pas resteront petites.

4.2.b. Traitements de stimulation des RL

Pour le marqueur *DR5:GUS*, les racines supposées transformées (bien allongées) ont été placées sur un milieu M additionné d'auxine à 10^{-9} M (Acide Indole Acétique, AIA, Sigma) pendant 10h, 24h et 26h. Pour le marqueur *DR5:VENUS-N7*, les racines transformées ont été plongées 1h dans une solution d'ANA à 10^{-7} M. Pour les marqueurs *pSCR1:GUS* et *pSCR2:GUS*, les racines transformées sont prélevées du milieu Fåhraeus et rincées dans une solution d'eau stérile avec 400 mg/l d'Augmentin

(GlaxoSmithKline) afin d'éliminer les bactéries, puis délicatement séchées et transférées 4 jours sur un milieu M supplémenté de saccharose à 3%, afin de stimuler la formation de primordia de RL (Gonzalez-Rizzo et al., 2006) et d'Augmentin à 200 mg/l. Des racines sont prélevées après 4 jours sur ce milieu.

4.3. Lignées transgéniques stables

4.3.a. Transformation et régénération de plantes stables

Une fois l'expression des marqueurs *DR5:GUS* et *DR5:VENUS-N7* vérifiée par la production de racines chimériques, des plantes stables exprimant ces constructions ont été générées. Les étapes de transformation stables sont en grande partie réalisées par Céline Remblière (plateforme Transformation des plantes du LIPM), selon le protocole décrit dans *The Medicago Truncatula Handbook*¹⁰ (Chaubaud et al., 2003). Toutefois, pour la construction *DR5:VENUS-N7*, nous avons pris en charge les étapes de régénération des plantes.

Des explants de feuilles (découpés) de plantules de *M. truncatula* du génotype facilement transformable 2HA (Rose et al., 1999) sont mises en contact avec la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* (souche AGL1) dans laquelle a été préalablement insérée la construction dans un vecteur binaire. Transférés sur un milieu régénératif (CIM¹⁰), ces morceaux de feuilles produisent des amas de cellules indifférenciées (cals) qui sont ensuite repiqués successivement sur deux types de milieu embryogènes (EIM¹¹, puis EDM¹⁰). Les embryons ainsi générés sont progressivement transférés sur un nouveau milieu, appelé PDM¹⁰ qui permet aux embryons de reformer une plante entière. Celle-ci, qui correspond à la génération T1, peut être bouturée *in vitro* sur un milieu SHb10¹⁰ afin de la multiplier.

4.3.b. Sélection des lignées transformées

Chaque cal correspond à un événement de transformation indépendant ; on considère donc que les embryons issus d'un même cal donnent une lignée transgénique T1 indépendante. Les différentes lignées T1 de *M. truncatula* portant les constructions *DR5:GUS* et *DR5:VENUS-N7* ont été sélectionnées en fonction de leur expression et de leur réponse à l'auxine. Pour cela, des racines sont prélevées sur les boutures des plantes régénérées. Une partie de ces racines est incubée 1h, 12h ou 24h dans une solution d'ANA à 10⁻⁷ M à température ambiante.

4.3.c. Test des descendants et production de graines

Pour les lignées qui ont été sélectionnées, les plantules sont bouturées et repiquées. Des boutures sont acclimatées en les transférant en chambre de culture dans un substrat (sépiolite) rincé et stérilisé, en conservant une atmosphère humide le premier jour. Au bout de 2-3 semaines, les plantes sont rempotées

¹¹ Pour le protocole précis et la composition des milieux CIM, EIM, EDM, PDM et SHb10, se référer à *The Medicago Truncatula Handbook* (<https://www.noble.org/Global/medicagohandbook/pdf/AgrobacteriumTumefaciens.pdf>)

<i>Solution</i>	<i>Pour 100 ml</i>
Na ₂ HPO ₄ 0,2 M	31 ml
NaH ₂ PO ₄ 0.2 M	19 ml
K ₃ (Fe(CN) ₆) 0,1 M	0.5 ml
K ₄ (Fe(CN) ₆) 0,1 M	0.5 ml
EDTA 0,5 M	2 ml
X-Gluc 2.5 % dans du DMF	2 ml
H ₂ O qsp 100 ml	45 ml

Tableau 2.3 • Composition du tampon de révélation GUS

Les tissus sont incubés dans ce tampon, passés à la pompe à vide 10 min puis placés 2 à 12h à 37°C à l'obscurité.

D'après Journet et al. 2001.

dans un mélange 3/1 de terreau/sable, puis menées à graines pendant 3-6 mois dans une chambre de culture à 21°C avec 16h de jour et 8h de nuit. Une cinquantaine de ces graines, de la génération T2, sont mises à germer, puis les plantules obtenues sont criblées *in vitro* sur la base de leur expression GUS ou VENUS, afin de vérifier si l'insertion de la construction est unique et héritable.

Les plantes T2 exprimant correctement la construction sont sélectionnées et acclimatées en chambre de culture. Dans la mesure du possible, l'intensité de l'expression GUS ou VENUS est un critère supplémentaire afin de sélectionner des plantes T2 exprimant de façon homozygote la construction. Ces plantes sont menées à graine pour obtenir la génération T3, qui sera à son tour criblée afin de déterminer si les plantes T2 dont elles sont issues sont hétérozygotes ou homozygotes. Les plantes T3 homozygotes sont utilisées au cours des expériences. Pour certaines lignées, des graines T4 et T5 ont été générées et utilisées lors des expériences. À chaque nouvelle génération, un nouveau criblage est réalisé pour vérifier la bonne expression et l'héritabilité de la construction.

5. Observations de la racine latérale

5.1. Observations histochimiques

Les plantes portant les constructions associées au gène rapporteur *GUS* sous le contrôle de promoteurs produisent, lorsque ceux-ci sont activés, l'enzyme β -glucuronidase. Afin de mettre en évidence l'activation du promoteur, il faut mettre en contact les plantes avec le substrat de cette enzyme, le X-gluc (acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-Dglucuronique, Biosynth).

Pour révéler l'activité de la β -glucuronidase, les racines sont incubées à 37°C dans un tampon GUS (composition en tableau 2.3) après les avoir passées 10 min dans une chambre à vide afin de faire pénétrer le tampon dans les tissus (Journet et al., 2001). On peut aussi éliminer l'étape sous vide, et ajouter 0,05% de Triton X-100 au tampon GUS. Selon le marqueur, la durée d'incubation varie ; pour *DR5:GUS*, les racines sont incubées avec le tampon pendant 2 à 5 heures, selon l'intensité de coloration souhaitée. Pour les marqueurs *pSCR1:GUS* et *pSCR2:GUS*, la coloration est de 4h30. Les racines sont ensuite rincées à l'aide d'un tampon phosphate (pH 7), et conservées à 4°C dans l'eau avec quelques gouttes d'EDTA (0,5 M, pH 8).

L'observation des racines est réalisée au microscope photonique à fond clair (Axioplan 2, Zeiss), après avoir traité les racines à la javel 3,2% pendant 2 min afin de les éclaircir. Les primordia de RL sont localisés en utilisant la coloration GUS.

5.2. Observations de la RL en fluorescence

Pour le marqueur *DR5:VENUS-N7*, qui permet l'observation en temps réel du marquage, les racines sont observées dans leur boîtes de Pétri à la loupe binoculaire (Leica MZFLIII, Leica Microsystems) avec

un filtre d'excitation 470/40 nm et d'émission 515 nm. Pour détailler le profil d'expression du marqueur, des racines ont été observées au microscope à fluorescence (Axioplan 2, Zeiss) en utilisant le filtre d'excitation 470/40 nm et le filtre d'émission 515 nm. À la loupe binoculaire, la façon dont les RL apparaissent le long de la racine primaire a été analysée. Le niveau de précision du microscope a permis de voir dans quel tissu s'exprime le marqueur.

5.3. Coupes histologiques

5.3.a. Inclusion dans l'agarose

De manière à fixer la coloration GUS, les tissus sont placés dans un tampon phosphate avec 2,5 % de glutaraldéhyde. Après infiltration 10 min sous vide (sauf en cas d'usage de Triton X-100), les tissus sont incubés 2h à température ambiante à l'obscurité, puis rincées plusieurs fois. Les zones d'intérêt (primordia de RL) sont sélectionnées sur la base de l'expression GUS et prélevées. Ces tronçons de racines sont ensuite disposés dans des moules en caoutchouc, en veillant à ne pas les laisser se déshydrater. L'eau est absorbée et remplacée par une goutte d'agarose 5% (dans de l'eau) en ayant pris soin de le laisser refroidir un peu pour ne pas brûler la racine.

Les blocs se conservent à 4°C dans une enceinte humide. Les blocs ainsi formés sont démoulés et des coupes sériées de 80 µm sont réalisées au vibratome (LEICA VT 1000S). Les coupes sont déposées dans de l'eau entre lame et lamelle, et observés au microscope photonique à fond clair. Les lames peuvent être conservées quelques jours à 4°C dans une enceinte humide.

5.3.b. Inclusion dans la résine Technovit 7100

En premier lieu, les tissus sont fixés dans une solution contenant 2,5% de glutaraldéhyde et 2,5% de paraformaldéhyde pendant 2h. Ils sont ensuite progressivement déshydratés dans de l'éthanol par des bains successifs de 30 min, puis l'éthanol est progressivement remplacé par du liquide de préparation, selon les préconisations du fournisseur (Technovit 7100, Heraeus Kulzer). Après incubation à 4°C pendant 2-3 jours dans ce liquide de préparation, les échantillons sont inclus dans des moules, en prenant garde de bien les orienter en fonction du sens de sortie de la RL afin d'être dans le bon axe lors de la coupe. Le démoulage des blocs de résine est réalisé avec le kit Technovit 3040 (Heraeus Kulzer). Pour les coupes transversales, les blocs doivent être retirés de leur support et collés dans le sens souhaité. Les blocs peuvent être conservés à long terme à température ambiante.

Les coupes sériées de 8-10 µm sont effectuées à l'aide d'un microtome (2040 Reichert Jung), placées sur lame et séchées, puis contre-colorées au rouge de ruthénium (0,05% dans de l'eau, incubation de la lame 5 à 10 min) qui marque les parois cellulaires.

Les lamelles sont montées sur les lames à l'aide d'une résine possédant le même indice de diffraction que le verre et le Technovit. Les coupes sont observées au microscope photonique à fond clair (Axioplan 2, Zeiss). Les lames peuvent être conservées à long terme à température ambiante.

6. Analyse transcriptomique

6.1. Production du matériel biologique

Des plantules *M. truncatula* A17 de 2 jours, poussées sur milieu M, sont traitées selon la méthode de synchronisation décrite en point 2.6, avec 2 jours sur milieu NPA, puis transférés sur quatre milieux de restauration de la formation de RL pendant 10h (*cf.* Résultats, partie C). Pour chacune des quatre conditions, 30 à 50 plantes sont traitées.

Le travail avec les ARN impose certaines mesures afin de les préserver de la dégradation. La paille est préalablement décontaminée, et il est nécessaire de porter des gants. Les tissus prélevés doivent toujours rester congelés afin d'inhiber les RNAses (enzymes dégradant l'ARN). Le matériel utilisé au laboratoire doit être « *RNase-free* », ou bien lavé avec une solution de décontamination des RNAses, RNase Zap (Ambion).

Après les 10h de traitement, les plantules sont prélevées délicatement à l'aide d'une pince, et sont coupées entre l'hypocotyle et la zone où commencent les poils racinaires. L'apex est lui aussi retiré au scalpel. Les racines sont récoltées dans des enveloppes en papier alu préalablement annotées, puis plongées dans de l'azote liquide. Les enveloppes sont stockées dans une boîte à -80°C.

6.2. Extraction d'ARN

Les racines congelées sont placées dans un mortier, et broyées avec un pilon dans de l'azote liquide en veillant à ce qu'elles ne décongèlent pas. Chaque échantillon est broyé avec un nouveau mortier/pilon. À l'aide d'une spatule trempée dans l'azote, la poudre obtenue est répartie dans 3 tubes Eppendorf 2 ml « *RNase-free* » percés sur le dessus avec une aiguille, et baignant en partie dans l'azote liquide. Pour un rendement optimal d'extraction, ces tubes ne doivent pas contenir plus de 100 mg de poudre de matériel végétal, ce qui correspond à peu près à la marque 100 µl du tube.

L'extraction des ARN totaux des tissus est réalisée à l'aide du kit *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen). Selon les recommandations du fournisseur, les tissus sont mélangés à un tampon d'extraction contenant un inhibiteur enzymatique (le β -mercaptoéthanol), le mélange est filtré pour éliminer les débris végétaux, puis les ARN sont liés à une colonne d'affinité. À cette étape, un traitement à la DNase I (Qiagen) est réalisé pour dégrader les éventuels ADN qui resteraient après l'extraction. Les dernières étapes sont des lavages afin d'éliminer les derniers débris (sels, résidus de tampon, *etc.*). Les ARN sont ensuite élués

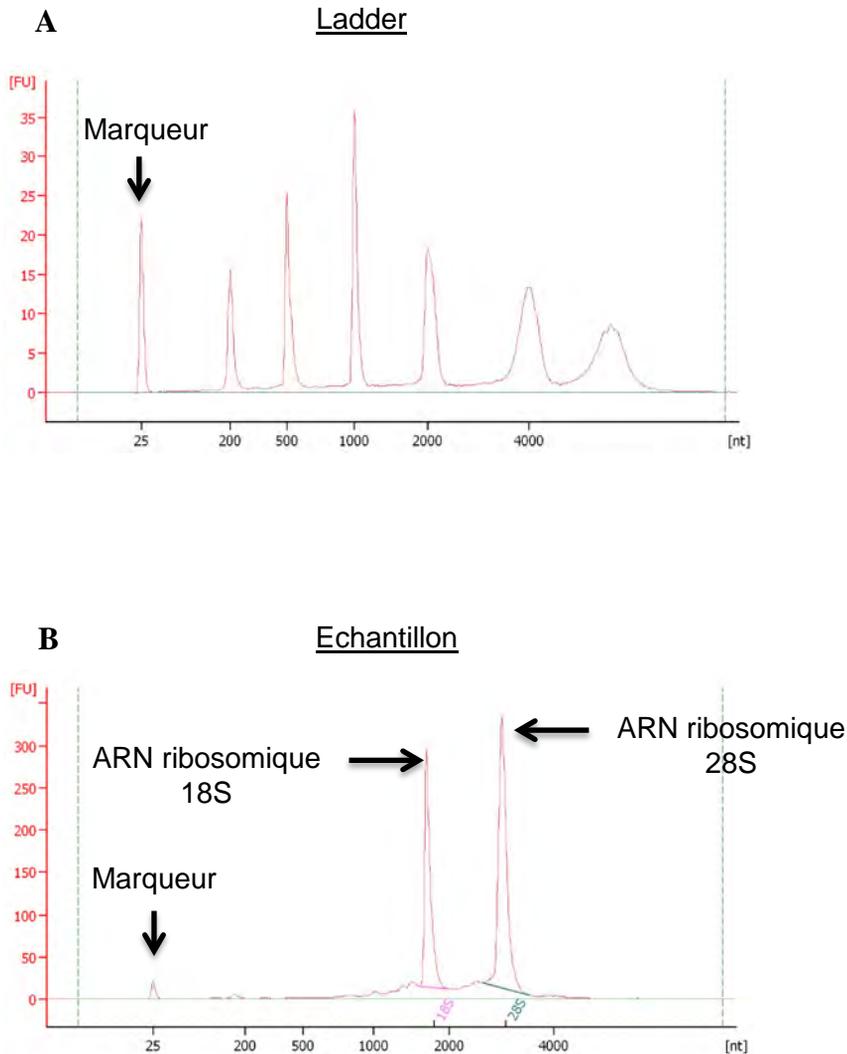


Figure 2.4 • Exemple de résultat d’une analyse d’ARN Agilent

(A) Electrophérogramme du *ladder* (échelle) permettent de détecter les éventuelles contaminations dans les préparation du gel Agilent, et de donner une échelle nucléotidique aux échantillons.

(B) Electrophérogramme d’un échantillon d’ARN. Les deux pics principaux d’ARN ribosomiques 18S et 28S sont visibles. Les mesures d’aires délimitées par les lignes roses et vertes donnent une idée du taux de dégradation de l’échantillon. Le pic de marqueur permet de caler le *ladder* et les échantillons entre eux.

deux fois dans 35-45 μl d'eau *RNAse-free* et conservés dans de la glace pour une utilisation immédiate, ou à -20°C à moyen terme (-80°C pour une conservation à long terme).

6.3. Vérification des ARN

Les ARN doivent toujours être manipulés dans de la glace pour limiter leur dégradation. La bonne qualité des ARN est un critère indispensable à la réussite de l'analyse transcriptomique. Par conséquent, avant d'être expédiés pour analyse, la concentration, la pureté et l'intégrité des ARNs sont vérifiés.

Les ARN sont dosés par spectrophotométrie à l'aide d'un NanoDrop (Thermo Scientific) permettant de mesurer l'absorbance à différentes longueur d'ondes. Les paramètres vérifiés sont la concentration de l'ARN qui doit être supérieure à 200 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (selon les recommandations de la plateforme d'Evry), et le rapport d'absorbance (densité optique, DO). Cette dernière mesure permet de vérifier la pureté des ARN : les acides nucléiques absorbent à 260 nm, les protéines majoritairement à 280 nm et les molécules organiques (tampons, sels) majoritairement à 230 nm. Un extrait d'ARN pur présentera des rapports DO260/DO280 et DO260/DO230 de 1,8 à 2,1. Les extractions réalisées ont permis d'obtenir un rendement compris entre 8 et 18 μg d'ARNs totaux, avec dans tous les cas des rapports d'absorbance conformes.

Les ARN sont ensuite passés sur puce Agilent (RNA6000 LabChip Nano série II, Agilent Technologies) afin de procéder à une analyse de la qualité des échantillons. Les puces Agilent permettent d'obtenir une bien meilleure précision de résultats que l'analyse classique sur gel d'agarose, et ceci à partir de faibles quantité d'échantillon (1 μl). La puce est analysée sur un BioAnalyseur 2100 (Agilent Technologies) et produit les résultats d'analyse sous la forme de courbes de migration (électrophérogrammes). Les vérifications préalables incluent le contrôle de la courbe du *ladder* ou échelle (exemple en Figure 2.4 A), permettant d'attester de l'absence de contaminations (RNAses) dans la préparation. L'électrophérogramme permet aussi de contrôler l'absence d'ADN génomique. Il faut également vérifier la présence du pic du marqueur, ajouté dans l'ensemble les puits. Une fois les courbes des échantillons alignées en fonction ce pic, les courbes peuvent être visualisées (exemple en figure 2.4 B).

Une bonne intensité et la présence des deux populations principales d'ARN ribosomiques, 18S et 28S, démontrent un ARN de bonne qualité. Afin d'évaluer cette qualité, il faut observer la mesure du ratio 28S/18S, qui doit se situer autour de 2 pour des ARN intègres, et la valeur du RIN (*RNA Integrity Number*) qui correspond à une note de dégradation, un RIN de 10 indiquant des ARN parfaitement conservées, et un RIN de 1 des ARN totalement dégradés.

En fonction de tous ces contrôles, les meilleurs échantillons sont sélectionnés et envoyés à la plateforme transcriptomique d'Evry (<http://www-urgv.versailles.inra.fr/microarray/index.htm>), dans de la carboglace par le transporteur Chronopost.

6.4. Puces NimbleGen

L'analyse transcriptomique conduite par l'équipe de la plateforme transcriptome d'Evry est réalisée à l'aide de puces NimbleGen basées sur le génome complet de *M. truncatula* (Gouzy, Gamas, Debelle, LIPM). Ces puces comportent 249087 sondes d'environ 60 nucléotides de long correspondant à 83029 séquences cibles (gènes) de *Medicago truncatula*. Chaque sonde est donc représentée environ 3 fois.

À la plateforme d'Evry, les ARN sont amplifiés, de leur ADN complémentaire (ADNc) est produit. Ces ADNc sont marqués (oligo dT) à l'aide de deux types de fluorophores. L'hybridation est compétitive, ce qui signifie que deux populations d'ADNc (correspondant à deux conditions) sont marqués avec deux types de fluorophores différents (Cy3 et Cy5) et hybridés simultanément sur une même puce. Ainsi, la quantité d'une population d'ARN donné par rapport à l'autre sera proportionnelle à la mesure du fluorophore avec lequel il a été marqué. Deux répétitions techniques sont réalisées : chaque couple d'ADNc est présenté deux fois sur la lame, en échangeant leur fluorophores (*dye-swap*), afin de minimiser les éventuels artefacts liés au marquage.

Les analyses statistiques sont effectuées par M.-L. Martin Magniette (UMR518 AgroParisTech / INRA).

Résultats

Partie A

Etude du développement de la racine latérale chez *Medicago truncatula*

Avant de nous intéresser à l'effet des LCOs sur la racine latérale chez *Medicago truncatula*, il nous fallait générer des outils d'analyse permettant d'étudier la formation de la racine latérale chez cette plante. En effet, si la littérature concernant *M. truncatula* est bien documentée sur la formation du nodule, il n'en va pas de même pour la racine latérale, et les outils pour appuyer l'analyse de la RL étaient rares lorsque le projet de thèse a débuté.

Nous nous sommes d'abord concentrés sur la génération de plantes exprimant des marqueurs précoces de la RL, et particulièrement des plantes transgéniques « stables » exprimant les constructions de réponse à l'auxine *DR5:GUS* et *DR5:VENUS-N7*, qui n'avaient jamais été décrits chez *M. truncatula*. L'obtention de ces marqueurs est présentée en point 1.

Avec l'aide de ce matériel et de techniques d'histologie fine, j'ai procédé à une description précise des étapes de formation de la RL, depuis les premières divisions jusqu'à l'émergence du primordium de la RL. J'ai par ailleurs caractérisé le profil d'apparition des RL sur la racine primaire. Ces résultats sont réunis en un article publié dans *Journal of Plant Physiology*, et qui est présenté en point 2 de cette partie. La visée de cet article est de proposer une référence descriptive de la RL à la communauté scientifique travaillant sur le développement de la racine de *M. truncatula*, mais également sur les interactions plantes-microorganismes (symbioses, pathogènes, etc) chez cette plante.

En complément de cet article sera présentée une analyse plus avancée de l'organisation spatio-temporelle des RL chez *M. truncatula* (point 3).

1. Développement de lignées marqueurs de la racine latérale

1.1. Choix des marqueurs

Chez *M. truncatula*, la racine est très opaque et plus épaisse que celle de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* ; il est donc très difficile de repérer les RL lorsqu'elles n'ont pas encore émergé de la racine primaire. Afin de suivre ces étapes précoces de formation des RL, nous avons choisi de nous servir de marqueurs s'exprimant très tôt au cours du développement des primordia de RL, en se servant d'une propriété des RL : leur accumulation d'auxine (Benkova et al., 2003).

Notre choix s'est porté en premier lieu sur la construction *DR5:GUS* décrite chez *A. thaliana* par (Ulmasov et al., 1997). Celle-ci est constituée du promoteur DR5 associé au gène rapporteur *GUS*. DR5

est un promoteur synthétique composé d'éléments de réponse à l'auxine AuxRE (*Auxin Response Element*) répétés en tandem, issus du gène *GH3* de *Glycine max* (Soja), qui est également une légumineuse. Ce promoteur se comporte comme un senseur de la présence d'auxine, et permet d'activer la transcription du gène responsable de la production d'une enzyme, la β -glucuronidase (GUS), dont l'activité, en présence de son substrat, donne lieu à une réaction colorée dans les cellules où elle se produit. Par conséquent, la construction *DR5:GUS* permet un marquage coloré des zones accumulant de l'auxine. Or, il est connu que l'auxine s'accumule lors des premières étapes de la formation de la RL chez *A. thaliana* (Benkova et al., 2003), dans les cellules fondatrices, dans les cellules en division, puis dans l'apex de la RL et de la racine primaire. En supposant que cette accumulation soit similaire chez *M. truncatula*, *DR5:GUS* peut donc être utilisé comme un marqueur précoce de la formation de la RL.

Le promoteur du gène *GH3* de réponse à l'auxine a depuis longtemps été associé aux gènes rapporteurs β -glucuronidase (*GUS*) ou *Green Fluorescent Protein* (*GFP*), afin de décrire les profils de l'auxine chez les légumineuses *Trifolium repens* et *Lotus japonicus* (Larkin et al., 1996; Mathesius et al., 1998; Pacios-Bras et al., 2003), ainsi que chez *Oryza sativa* (Sreevidya et al., 2010) et d'autres plantes. Par la suite, le promoteur DR5 a été développé afin d'obtenir un meilleur signal de réponse à l'auxine que le promoteur GH3, car il possède plusieurs répétitions des AuxRE. Il est beaucoup utilisé chez *A. thaliana* (Benkova et al., 2003) et a été développé chez de nombreuses autres plantes, en tant qu'outil pour évaluer la réponse à l'auxine, par exemple chez le peuplier (Chen et al., 2013). Chez les légumineuses, le marqueur *DR5:GUS* a été étudié chez *Pisum sativum* (DeMason and Polowick, 2009) et son expression a été en partie décrite chez *M. truncatula* (Guan et al., 2013; Huo et al., 2006), sans entrer néanmoins dans un grand détail cellulaire.

En complément de *DR5:GUS*, nous avons également choisi d'utiliser le marqueur *DR5:VENUS-N7* (Heisler et al., 2005), composé du promoteur DR5, du gène rapporteur fluorescent *VENUS* (dérivé de la YFP) en trois copies, et d'un signal de localisation nucléaire. Il permet donc d'associer l'accumulation d'auxine à un signal de fluorescence localisé au noyau. L'intérêt de localiser la fluorescence VENUS au noyau est de limiter la réfraction de la fluorescence au niveau des parois. Le marqueur *DR5:VENUS-N7* est complémentaire à *DR5:GUS* car il permet de suivre le développement de la RL en temps réel sur une plante vivante, ce qui n'est pas le cas de *DR5:GUS* qui nécessite, pour être observé, une coloration destructrice de la plante. Des marqueurs de ce type sont disponibles chez d'autres plantes, par exemple *DR5:GFP* ou *DR5:VENUS-N7* utilisées chez *A. thaliana* (Heisler et al., 2005; Marhavy et al., 2013). En ce qui concerne les légumineuses, une construction *DR5:GFP-NLS* a été décrite pour *L. japonicus* (Suzaki et al., 2012), mais aucune n'était disponible pour *M. truncatula*.

En parallèle de ces marqueurs, nous nous sommes servi d'autres marqueurs, *pSCR1:GUS* et *pSCR2:GUS* (Sbabou et al., 2010), que nous avons choisi en raison de leur potentielle expression au niveau de l'endoderme, un tissu interne de la racine entourant le péricycle et la stèle. L'objectif initial était de s'en servir comme marqueurs de l'endoderme chez *M. truncatula*, étant donnée leur spécificité endodermique chez *Lupinus albus* (Sbabou et al., 2010). En effet, l'épaisseur et le nombre de couches

A

Construction	Lignée	Niveau d'expression du marqueur	Réponse à l'auxine	Ségrégation du marqueur en première génération (T2)	Seconde generation homogène (T3)
DR5:GUS	H20	+	+	57 / 71 plantes (80 %)	Disponible
DR5:GUS	B4	++	+	39 / 55 plantes (70 %)	Disponible
DR5:GUS	H3(III)	++	+	Non testée	-
DR5:VENUS-N7	H3	++	+	132 / 173 plantes (76 %)	Disponible
DR5:VENUS-N7	E8	+	+	23 / 50 plantes (46 %)	En production
DR5:VENUS-N7	F8	+	+	0 / 50 plantes (non-héritable)	-
DR5:VENUS-N7	A5	++	+	Non testée	-

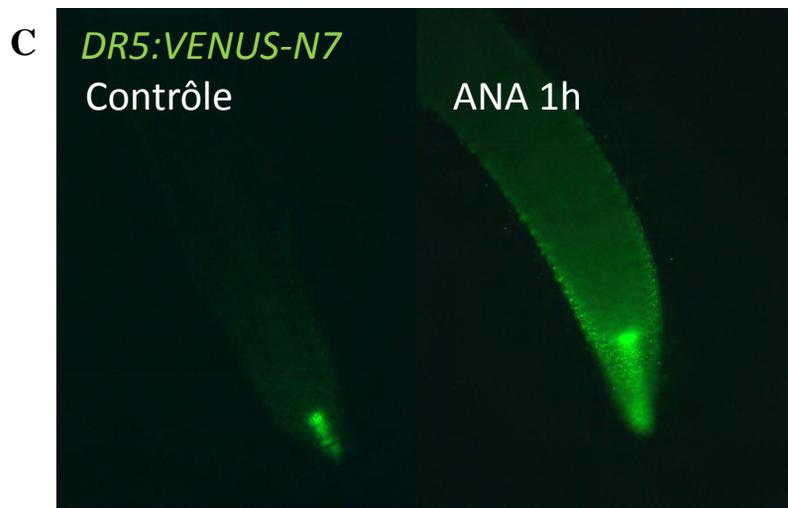


Figure 3.1 • Lignées transgéniques *DR5:GUS* et *DR5:VENUS-N7* et leur réponse à l'auxine (ANA)

(A) Tableau représentant la liste des lignées transgéniques exploitables générées avec les marqueurs *DR5:GUS* et *DR5:VENUS-N7*. Le niveau d'expression du marqueur est représenté par + pour une bonne expression, ou ++ pour une expression forte (les lignées exprimant peu le marqueur n'ont pas été considérées comme exploitables). La ségrégation et première génération (T2) et la disponibilité des graines de 2nde génération est indiquée.

Toutes ces lignées répondaient correctement à l'auxine, notamment la lignée *DR5:GUS* H20 (B) après un traitement dose-réponse à l'ANA (de gauche à droite, 0 M, 10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M) de 48h, et la lignée *DR5:VENUS-N7* E8 (C) après un traitement à l'ANA à 10⁻⁶ M pendant 1h.

cellulaires présentes chez la racine de *M. truncatula* rendent parfois difficile l'identification des couches internes.

1.2. Marqueurs *DR5:GUS* et *DR5:VENUS-N7*

Au début du projet de thèse, les études utilisant le marqueur *DR5:GUS* chez *M. truncatula* étaient rares (Huo et al., 2006) et celui-ci n'avait pas été décrit avec précision chez *M. truncatula*, et le marqueur *DR5:VENUS-N7* n'avait pas été testé chez cette plante. Afin de vérifier si ces constructions pouvaient s'exprimer chez cette plante, nous avons généré des plantes chimériques à l'aide d'*Agrobacterium rhizogenes* (Boisson-Dernier et al., 2001). Le profil observé dans les racines générées, semblable aux descriptions disponibles chez *A. thaliana* (Benkova et al., 2003; Marhavy et al., 2013) nous ont permis de valider l'utilisation de ces deux marqueurs. Les racines chimériques ont comme avantage d'être obtenues assez rapidement (au bout de 3-4 semaines) ; toutefois, ces racines sont issues de la transformation par *A. rhizogenes*, occasionnant des changements dans la production hormonale. Or, notre projet inclut l'étude de l'effet des hormones. Par conséquent, nous nous sommes lancés dans la transformation stable de plantes de *M. truncatula*, qui prend plus de temps (6 mois à 1 an) mais permet d'obtenir des individus transformés homogènes.

Les constructions *DR5:GUS* et *DR5:VENUS-N7* ont été intégrées de façon stable dans les plantes de *M. truncatula* (lignée 2HA), grâce à une transformation par *Agrobacterium tumefaciens* (Chabaud et al., 2003). En partenariat avec Céline Remblière de la plateforme de transformation de plantes du LIPM, nous avons ainsi généré huit lignées indépendantes de *M. truncatula* exprimant le marqueur *DR5:GUS*, et quatre exprimant le marqueur *DR5:VENUS-N7* (Figure 3.1 A).

1.2.a. Tests d'expression et de sensibilité à l'auxine

Afin de déterminer le profil d'expression de lignées *DR5:GUS*, j'ai observé des racines issues de plantes de chaque lignée à la loupe binoculaire et au microscope à fond clair, après coloration GUS. Pour les lignées *DR5:VENUS-N7*, les racines ont été observées à la loupe binoculaire et au microscope à fluorescence (*cf.* Matériel et méthodes). Ainsi, l'intensité et l'homogénéité de l'expression des marqueurs pour chaque lignée a pu être déterminée (Figure 3.1 A).

Lors de la sélection des lignées, les plantes ont été soumises à un test de sensibilité à l'auxine, pour vérifier que la construction *DR5:GUS* ou *DR5:VENUS-N7* répondait bien à l'auxine chez *M. truncatula*. Pour cela, des jeunes racines, prélevées sur les boutures issues des cals régénérés, ont été incubées 1h ou sur la nuit dans une solution d'ANA (Acide Naphtalène Acétique, analogue perméant de l'auxine) à 10^{-7} ou 10^{-6} M, puis ont été observées, après coloration GUS ou en fluorescence, en les comparant à d'autres racines non traitées incubées dans des conditions similaires (Figure 3.1 B et C). Le profil de réponse à l'auxine attendu est une intensification du signal et un élargissement de la zone d'expression du gène

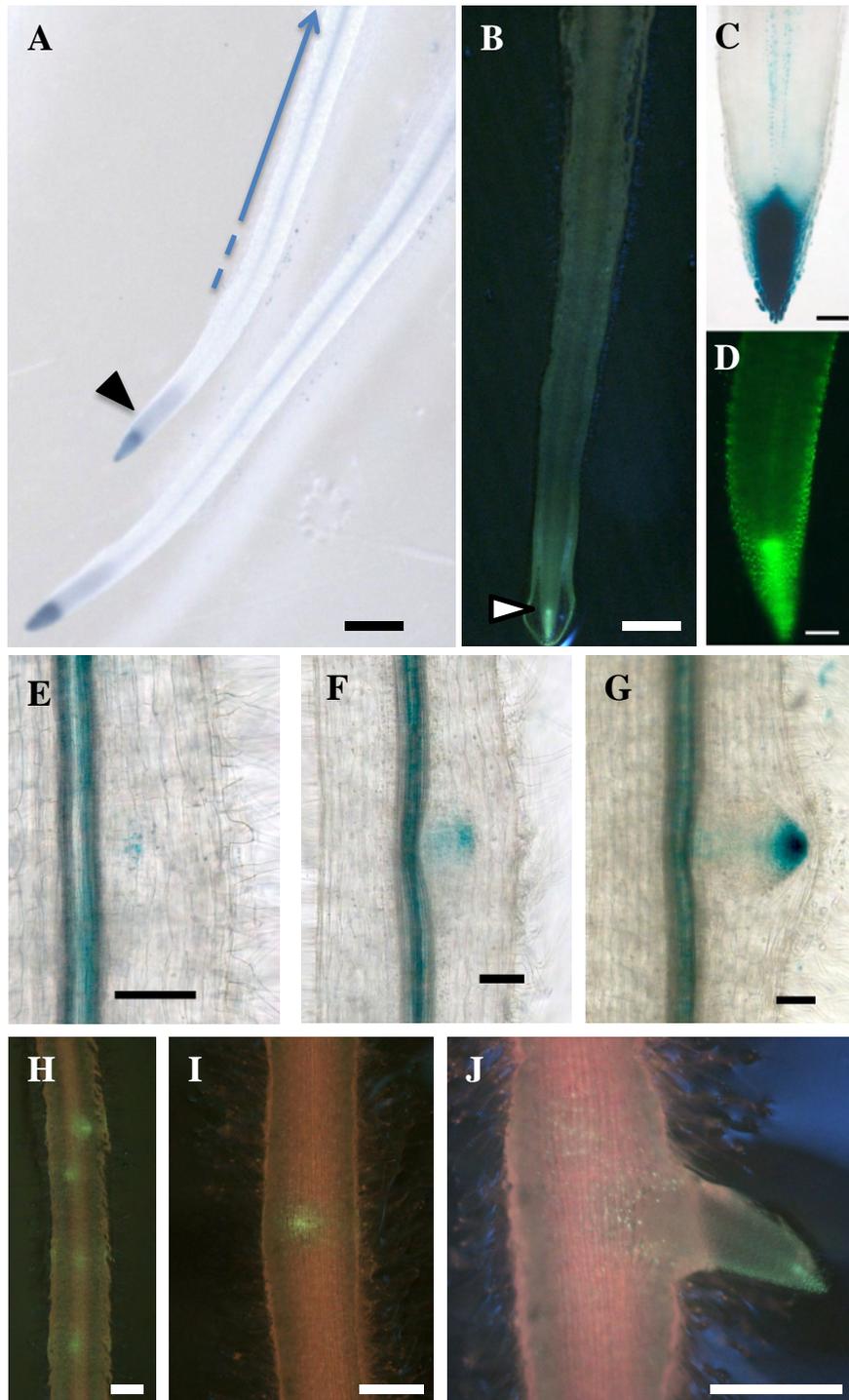


Figure 3.2 • Profil d'expression de *DR5:GUS* et *DR5:VENUS-N7* chez *M. truncatula*

Les marqueurs *DR5:GUS* (A) et *DR5:VENUS-N7* (B) s'exprime dans le cylindre central et l'apex de la racine principale. Leur expression suit un gradient distal (tête de flèche) et un autre gradient proximal (flèche bleue pour A). L'expression de *DR5:GUS* (C) et *DR5:VENUS-N7* (D) est très concentrée au niveau de l'apex de la racine principale.

DR5:GUS s'exprime au cours du développement du primordium de RL dès les stades précoces (E), puis s'intensifie lors des stades intermédiaires (F) et tardifs avant émergence (G). De même, *DR5:VENUS-N7* s'exprime lors de la formation de la RL, de façon précoce (H), avant émergence (I), et dans l'apex de la RL émergée (J).

Barres : 1 mm (A-B), 100 μ m (C-G), 500 μ m (H-J)

marqueur. Les lignées H20, B4, H3-III et H3, et les 4 autres que nous avons générées ont montré une bonne sensibilité à l'auxine.

1.2.b. Tests de ségrégation

Des plantes de plusieurs lignées ont été menées à graines afin de déterminer si l'insertion du transgène était unique et bien héritable, en vérifiant chez leur descendance l'expression de la construction à la loupe et au microscope. Les lignées H20, B4 et H3 ont présenté dans leur descendance une répartition approximativement égale à 75 % de plantes exprimant la construction (respectivement 80, 70 et 72%) (Figure 3.1 A), ce qui correspond à la répartition attendue pour une insertion unique. Nous avons donc considéré ces lignées comme utilisables. En revanche, la descendance de la lignée E8 a présenté 46% de plantes positives, ce qui paraît surprenant. Il est possible que l'expression du marqueur soit trop faible pour être repérée chez les plantes hétérozygotes (ce qui peut avoir amené des erreurs de criblage), ou encore que l'insertion soit située dans une zone génomique peu propice à l'expression du marqueur dans certaines conditions. En conséquence, nous n'avons utilisé la lignée E8 qu'avec précaution.

1.2.c. Profil d'expression au cours de la formation de la racine latérale

L'expression de nos marqueurs est cohérente avec la description chez *A. thaliana* (Benkova et al., 2003; Marhavy et al., 2013). Chez les lignées H20 et B4, le marqueur *DR5:GUS* est exprimé au niveau de l'apex des racines sur une zone allant du méristème racinaire jusqu'à l'extrémité de la coiffe racinaire, et au centre de la racine au niveau des tissus vasculaires (Figure 3.2 A et C). Comme attendu, le marqueur s'exprimait bien lors des étapes de formation de la RL. L'intensité de l'expression du marqueur s'est montrée plus importante chez H20 que chez B4. L'observation microscopique de racines de ces deux lignées a montré une grande finesse d'expression du marqueur *DR5:GUS*, permettant de différencier trois stades distincts de formation de la RL, que nous avons nommé « précoce » ou stade 1, « intermédiaire » ou stade 2, et « pré-émergent » ou stade 3 (Figure 3.2 E-G). Ces informations seront utiles par la suite pour évaluer les stades de développement des RL. Un gradient d'expression de *DR5:GUS*, et une zone de moindre expression étaient visibles dans la zone jeune au dessus de l'apex (Figure 3.2 A et 3.3), correspondant bien avec la présence d'auxine décrite dans la racine chez *A. thaliana* (Dubrovsky et al., 2011).

La lignée H3 exprimant *DR5:VENUS-N7* a présenté un profil similaire : la fluorescence a pu être observée dans les tissus vasculaires et dans l'apex racinaire (Figure 3.2 B et D). Comme attendu, la fluorescence était restreinte aux noyaux contrairement à *DR5:GUS*, en raison de l'action du signal de localisation nucléaire associé à la protéine VENUS. Dans certaines lignées (notamment H3), nous avons également noté une expression, beaucoup plus faible, du marqueur dans d'autres tissus tels l'épiderme ou le cortex. Chez *A. thaliana*, l'auxine est connue pour influencer le développement des poils racinaires (Pitts et al., 1998) ce qui paraît donc cohérent. Sa présence dans le cortex n'est pas non plus anormale. Cela montre que le marqueur *DR5:VENUS-N7* est plus sensible que *DR5:GUS*. Au niveau de la RL, le

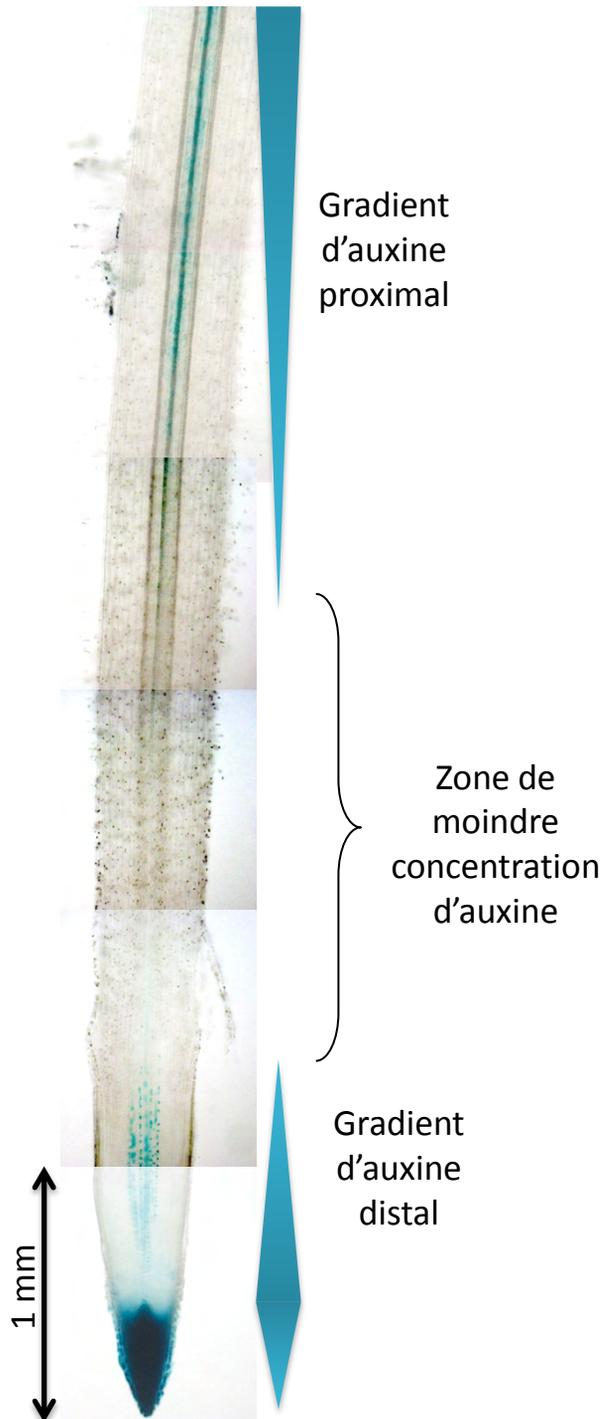


Figure 3.3 • Expression du marqueur *DR5::GUS* dans la zone jeune de la racine de *M. truncatula*

Observation au microscope à fond clair d'une racine de *M. truncatula* exprimant *DR5::GUS*. Les deux gradients d'auxine, proximal et distal, sont visibles, ainsi qu'une zone où l'auxine est moins concentrée.

marqueur était correctement exprimé, dès les stades précoces, et cette expression visualisable sur des plantes vivantes (Figure 3.2 H-J). *DR5:VENUS-N7* est donc un marqueur efficace du développement des primordia de RL, même s'il ne permet pas une différenciation des stades de formation des RL aussi fine que *DR5:GUS*, du moins pas sur une plante vivante.

Ces deux marqueurs peuvent donc être utilisés de façon complémentaire. Les lignées H20, B4 et H3 ont ensuite été menées à la génération T3 afin d'obtenir un stock de graines homozygotes.

1.3. Marqueurs *pSCR1:GUS* et *pSCR2:GUS*

Chez *A. thaliana*, le gène *SCARECROW* (*AtSCR*) code pour un facteur de transcription impliqué dans la structuration radiale de la racine, et est spécifiquement exprimé dans l'endoderme (Di Laurenzio et al., 1996). *LaSCR1* et *LaSCR2*, les orthologues du gène *AtSCR* chez le lupin (*Lupinus albus*), qui appartient à la famille de légumineuses, semblent également s'exprimer dans l'endoderme chez le lupin (Sbabou et al., 2010). Ces deux marqueurs semblent également s'exprimer chez *M. truncatula*, mais leur profil n'a pas été décrit avec précision (Sbabou, 2009).

Des racines portant les constructions *pSCR1:GUS* ou *pSCR2:GUS* (gène rapporteur GUS sous le contrôle des promoteurs des gènes *LaSCR1* ou *LaSCR2*, respectivement) ont été générées à l'aide d'*Agrobacterium rhizogenes* (Boisson-Dernier et al., 2001). Pour chacun des marqueurs, une dizaine de racines transformées indépendamment ont été obtenues.

1.3.a. Profil d'expression de *LaSCR1* et *LaSCR2* chez *Medicago truncatula*

Afin de vérifier l'expression de ces marqueurs chez *M. truncatula*, j'ai d'abord observé les racines à la loupe binoculaire après coloration GUS, puis j'ai effectué des coupes histologiques longitudinales dans des zones d'expression.

Comme le montre la figure 3.4 A, la coloration GUS dans *pSCR1:GUS* est visible à la loupe dans les tissus internes de la racine (vaisseaux conducteurs), dans les zones jeunes (proches de l'apex), et au niveau de l'apex racinaire (flèche). Les racines exprimant *pSCR2:GUS* présentaient également une coloration située dans les tissus internes, mais généralement moins forte et plus diffuse (pas montré).

Si l'on observe des coupes histologiques des racines transformées avec *pSCR1:GUS*, la coloration dans la racine est bien localisée dans l'endoderme, mais aussi dans le cortex interne et dans le péricycle, dans une moindre mesure (Figure 3.4 B). Sur les coupes de racines portant *pSCR2:GUS*, la coloration était beaucoup plus faible, et souvent non visible, même sur des tissus jeunes. Aux endroits où j'ai pu l'observer, j'ai constaté que la coloration était également présente dans les couches moyennes et externes du cortex (Figure 3.4 C), ce qui corrèle avec l'observation à la loupe montrant une coloration plus diffuse. Ces profils ont été observés sur 15 coupes racinaires, sur des prélèvements effectués parmi 45 plantes transformées, pour chaque marqueur.

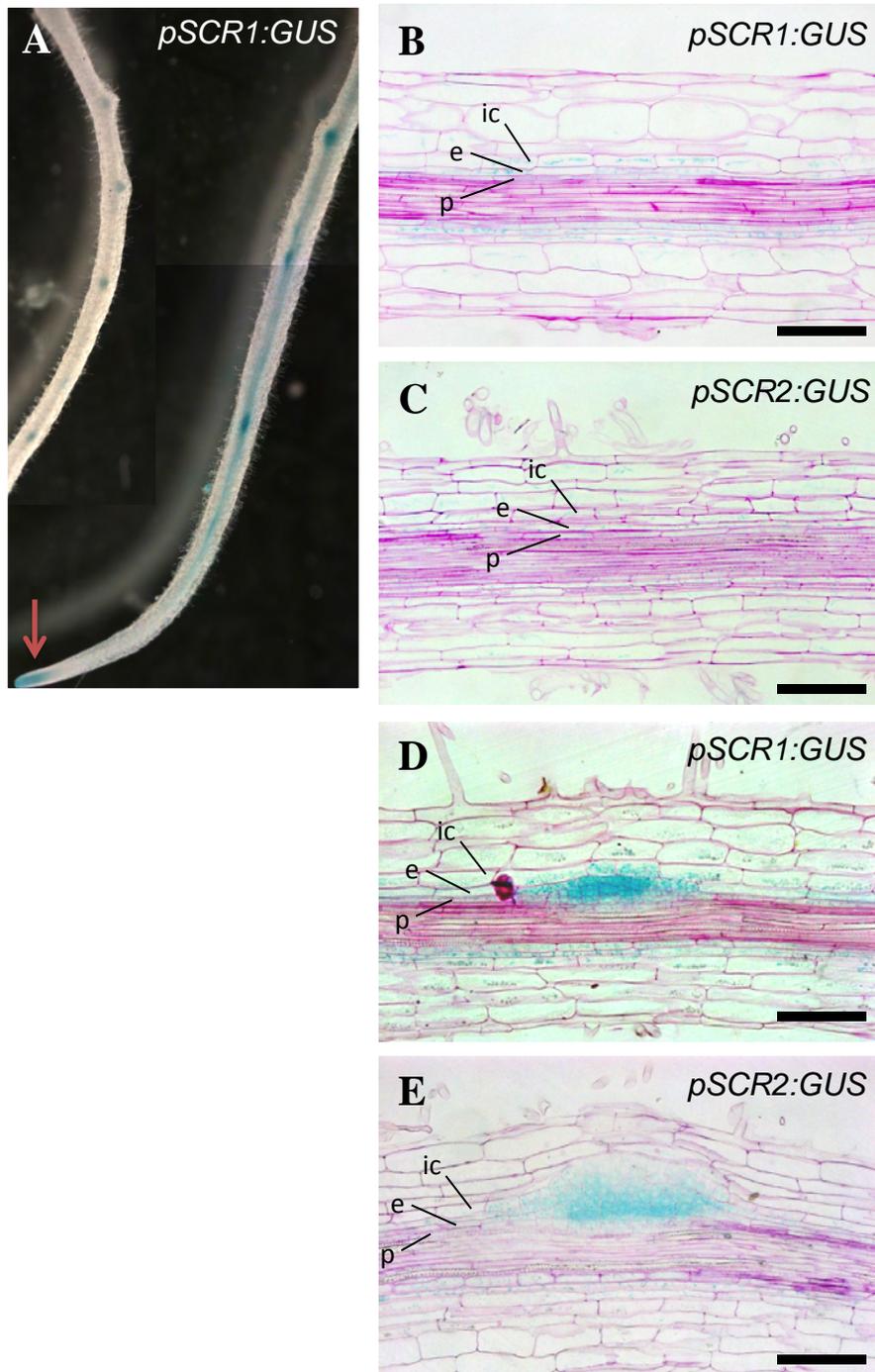


Figure 3.4 • Expression des marqueurs *pSCR1:GUS* et *pSCR2:GUS* dans la racine de *M. truncatula*

(A, B, D) Expression de *pSCR1:GUS*, et (C, E) expression de *pSCR2:GUS*.

SCR1 est exprimé dans les tissus internes de la racine jeune, ainsi que des primordia de RL dans les racines jeunes et plus anciennes, et dans l'apex de la racine principale (A, flèche). Dans la racine principale, *SCR1* est exprimé dans le péricycle, l'endoderme et le cortex interne (B), tandis que l'expression de *SCR2* n'est pas visible (C). Dans la racine latérale, *SCR1* et *SCR2* sont tous deux exprimés dans le péricycle et l'endoderme, et beaucoup plus faiblement dans le cortex interne (D et E).

(B-E) p: péricycle, e: endoderme, ic: cortex interne. L'activité GUS est colorée en bleu, les parois cellulaires sont colorées au rouge de ruthénium. Barres d'échelle : 100 μm .

La spécificité de ces deux gènes rapporteurs pour l'endoderme n'a donc pas pu être observée chez *M. truncatula*. Ce résultat suggère que chez *M. truncatula*, les domaines d'expression de *SCR1* et *SCR2* ne se limitent pas à l'endoderme, comme décrit dans d'autres espèces, mais s'étendent également au péricycle et aux cellules corticales. Toutefois, il n'est pas sûr que les gènes *SCR1* et *SCR2* du lupin soient bien les orthologues de ceux (ou celui) de *M. truncatula* ; et même dans le cas de vrais orthologues les séquences promotrices peuvent varier, ce qui peut provoquer une régulation différente entre les deux plantes. Enfin, il n'est pas impossible que le profil particulier de *SCR1* et 2 s'expliquent par un artefact de transformation liée à l'utilisation de plantes chimériques.

1.3.b. *SCR1* et *SCR2* s'expriment dans la racine latérale chez *M. truncatula*

En observant les racines transformées à la loupe, j'ai constaté que l'expression des marqueurs *pSCR1:GUS* et *pSCR2:GUS* chez *M. truncatula* était fortement associée aux primordia de RL, et particulièrement aux stades précoces de développement des primordia de RL. Avec *pSCR1:GUS*, cette expression était visible au niveau des zones jeunes, mais j'ai également observé une coloration nette des primordia racinaire dans des zones vieilles, où le marqueur n'était pas visible à l'œil nu dans les tissus internes (Figure 3.4 A). Bien que l'expression de *pSCR2:GUS* soit très difficilement repérable dans les tissus internes sur l'ensemble de la racine, elle était également forte dans les primordia de RL. Dans les deux cas, l'expression de ces marqueurs permettait de voir la localisation des jeunes RL.

Des coupes longitudinales ont confirmé ces observations, et ont permis de montrer que leur expression restait, au niveau des RL, plus forte dans l'endoderme que dans le cortex (Figure 3.4 D et E), ce qui permet de désigner facilement l'endoderme dans les primordia.

Même si les marqueurs *SCR1* et *SCR2* ne se sont pas révélés spécifiques à l'endoderme dans la racine primaire, ils ont été très utiles afin de mettre en évidence les primordia de RL, et pour différencier l'endoderme du cortex à l'intérieur de ces primordia. Ce matériel a donc été utilisé pour procéder à la description des étapes successives de formation de la racine latérale (point 2), mais nous n'avons pas généré de plantes stables pour ces marqueurs.

2. Description de la formation et de l'organisation des racines latérales chez

Medicago truncatula (article)

Malgré les avantages agronomiques des légumineuses, et la taille de la communauté scientifique travaillant sur la plante modèle *Medicago truncatula*, les caractéristiques de la racine latérale chez cette plante et chez les légumineuses en général sont peu documentées.

Pourtant, au vu des nombreux travaux sur l'organogénèse de la nodosité et ses liens avec la racine, et du fait que le programme développemental des RL puisse être utilisé par les LCOs symbiotiques, une

description précise des étapes cellulaires et des caractéristiques de la RL paraît indispensable chez le modèle *M. truncatula*.

Le travail que nous avons effectué, et que nous présentons dans le manuscrit qui suit, s'appuie sur l'utilisation de gènes marqueurs dont l'obtention a été détaillée en point 1 de cette partie. En premier lieu, nous avons décrit les étapes successives de formation des RL à l'aide de coupes histologiques fines, et caractérisé le profil de réponse à l'auxine à l'aide du marqueur *DR5:GUS* au cours de ces étapes. Par la suite, nous avons étudié comment apparaissent les RL le long de la racine principale, et particulièrement la zone préférentielle de formation de celles-ci.

La visée de cet article, publié dans *Journal of Plant Physiology*, est de fournir à la communauté scientifique travaillant sur la plante modèle *M. truncatula* une référence histologique et développementale de la formation des racines latérales chez cette plante. En cela, cette approche est originale et apporte de nouvelles connaissances sur les spécificités de cette plante, en comparaison aux paradigmes démontrés chez d'autres espèces, notamment *A. thaliana* (Malamy and Benfey, 1997) ou les monocotylédones (Jansen et al., 2012; Orman-Ligeza et al., 2013).



Physiology

Lateral root formation and patterning in *Medicago truncatula*Violaine Herrbach^{a,b}, Céline Remblière^{a,b}, Clare Gough^{a,b}, Sandra Bensmihen^{a,b,*}^a INRA, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR441, F-31326 Castanet-Tolosan, France^b CNRS, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR2594, F-31326 Castanet-Tolosan, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 August 2013

Received in revised form 6 September 2013

Accepted 6 September 2013

Available online 20 October 2013

Keywords:

Auxin

DR5 reporter lines

Lateral root development

Medicago truncatula

Plant–microbe interaction

ABSTRACT

The plant root system is crucial for anchorage and nutrition, and has a major role in plant adaptation, as well as in interactions with soil micro-organisms. Despite the agronomical and ecological importance of legume plants, whose roots can interact symbiotically with soil bacteria called rhizobia that fix atmospheric dinitrogen, and the evidence that lateral root (LR) development programmes are intercepted and influenced by symbiotic organisms, very little is known concerning the cellular and molecular events governing LR development in legumes. To better understand the interconnections between LR formation and symbiotic processes triggered by rhizobia or symbiotic molecules such as lipo-chitoooligosaccharides (LCOs), we first need a detailed description of LR development mechanisms in legumes. Using thin sections, we have described the cellular events leading to the formation of a new LR primordium (LRP) in *Medicago truncatula*, and divided them into seven stages prior to LR emergence. To monitor auxin accumulation we generated transgenic DR5:GUS and DR5:VENUS-N7 reporter lines of *M. truncatula*, and used them to analyze early stages of LR development. Interesting differences were observed for LR ontogeny compared to *Arabidopsis thaliana*. Notably, we observed endodermal and cortical contributions to LRP formation, and the associated DR5:GUS expression profile indicated that endodermal and cortical cell divisions were correlated with auxin accumulation. As described for *A. thaliana*, we observed a preferential zone for LR initiation at 4.45 mm from the root tip. Finally, we studied LR emergence and showed that a significant proportion of new LRP do not emerge straight away and could thus be an additional source of root plasticity. Our results shed new light on the patterning and early development of LRs in *M. truncatula*.

© 2013 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

The plant root system has a major impact on plant adaptation to its environment and is crucial for its anchorage and nutrition, as well as for interactions with soil micro-organisms. Plant root development is therefore of great agronomical and ecological interest. In higher plants, only the main root is determined embryonically and new lateral roots are formed post-embryonically, making root branching highly plastic and responsive to external cues. It is generally accepted that the primary root of Angiosperms can be divided into different developmental zones along the proximo-distal axis. Close to the root tip is the root apical meristem whose cells divide

to form initials that will give different cell layers. Then, the rate of cell divisions slows and cells start to elongate in the elongation zone. Finally, the zone where epidermal root hair cells start to differentiate is called the differentiation zone. On the radial axis, the organization of root tissues is as follows: the most internal part of the root is the vascular bundle (with xylem and phloem vessels), surrounded by the endodermis, the cortex and the root epidermis. Lateral roots (LR) originate by dedifferentiation of some cells of the outermost root layer of the vascular bundle, called the pericycle, which recapitulate divisions. In many species, the first signs of LR formation are the anticlinal (i.e. perpendicular to the cell layer axis) asymmetrical divisions of such pericycle cells opposite a protoxylem pole (Casero et al., 1995; Malamy and Benfey, 1997). In the model plant *Arabidopsis thaliana*, where extensive cellular descriptions of LR ontogeny are available (Malamy and Benfey, 1997), both anticlinal and periclinal (i.e. parallel to the cell layer axis) divisions of pericycle cells contribute to the formation of a new lateral root primordium (LRP) and 8 different anatomical stages have been described. The primordium progressively organizes to resemble the structure of a primary root meristem. Eventually, cell expansion leads to the emergence of the LR (Malamy and Benfey, 1997) that grows through the endodermal and cortical cell layers. The root

Abbreviations: DAG, days after germination; ELR, emerged lateral roots; LCO, lipo-chitoooligosaccharide; LR, lateral root; LRF, lateral root formation; LRI, lateral root initiation; LRP, lateral root primordium; Myc-LCO, mycorrhizal lipo-chitoooligosaccharide; NF, Nod factor.

* Corresponding author at: Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes (LIPM), UMR CNRS-INRA 2594/441, 24, chemin de borderouge – Auzeville, CS 52627, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France. Tel.: +33 561285463; fax: +33 561285061.

E-mail address: sandra.bensmihen@toulouse.inra.fr (S. Bensmihen).

apical meristem only becomes active after LR protrusion from the main root (Malamy and Benfey, 1997).

While the cellular events leading to the formation of LRP are very well described in the model plant *A. thaliana*, little is known about the contributions of root layers to LRP formation in other species. However, the case of *A. thaliana*, where the whole LRP originates from pericycle cell divisions only, may not but be such a common phenomenon since it has been reported in some other species that the endodermis and the cortex may contribute to LRP formation (Bell and McCully, 1970; Byrne et al., 1977; Casero et al., 1996; Mallory et al., 1970). Among other plants, legumes are of special interest (Byrne et al., 1977; Op den Camp et al., 2011) since they are able to form new root organs called nodules, which will host symbiotic nitrogen fixing rhizobia (Jones et al., 2007). Strikingly, it has been shown that nodules also originate from pericycle cell divisions (Timmers et al., 1999) and that rhizobia can “hijack” LR developmental programmes (Mathesius et al., 2000), suggesting that nodulation may have intercepted an endogenous LR developmental programme (Desbrosses and Stougaard, 2011). Mycorrhization is also known to enhance root system development (Gutjahr and Paszkowski, 2013). Moreover, it has been shown that the symbiotic molecules secreted by symbiotic rhizobia or an arbuscular mycorrhizal (AM) fungus, respectively called Nod factors (NFs) or mycorrhizal lipo-chitoooligosaccharides (Myc-LCOs) are able to stimulate, in the absence of the corresponding micro-organism, lateral root formation (LRF) in the model legume *Medicago truncatula*. This stimulation requires plant genes from the common symbiotic signalling pathway (Maillet et al., 2011; Olah et al., 2005), suggesting that nodulation and mycorrhization are able to interfere with the plant root developmental programme.

The regulatory mechanisms that control the initiation and development of new LRs have also mainly been described in *A. thaliana*. It has been shown that pericycle founder cell specification (i.e. fate determination of pericycle cells that will divide to give a LR), called “priming”, occurs in a zone of the root just below the elongation zone (towards the root tip) called the basal meristem (De Smet et al., 2007). Subsequently, first asymmetrical divisions of pericycle cells, called lateral root initiation (LRI), occur in the differentiation zone of the root (Dubrovsky et al., 2011). In *A. thaliana*, the time and spatial developmental window where LRI can occur is very precise and no LRI occurs outside of the differentiation zone (Dubrovsky et al., 2006). Extensive studies (Overvoorde et al., 2010) have shown that the phytohormone auxin is the major regulator of LRI and LR patterning along the main root.

Such a detailed description of LR formation and regulation was possible in *A. thaliana* because of the simple organization of the primary root (only one cell per layer of every root tissue) and the fact that the root is small and amenable to observation under a confocal microscope. There is also a wealth of genetic tools and reporter lines to address developmental and hormonal questions. Among these, the DR5:GUS and DR5:GFP reporter lines have been helpful to describe the different steps of LR development and patterning (Benkova et al., 2003). DR5 is a synthetic promoter made from auxin responsive regulatory elements from a soybean GH3 gene (Ulmasov et al., 1997) that marks local auxin accumulation. Since LRI is triggered by auxin accumulation (Dubrovsky et al., 2008), the DR5 promoter is active from the very onset of LRI (Benkova et al., 2003).

Our global aim is to describe how symbiotic molecules such as NFs and Myc-LCOs intercept LR development. This will help us understand the relationship between nodule development and LRF in legumes. To achieve this goal, we first need a cellular description of LRF in *M. truncatula*, as well as a better understanding of LR patterning and its regulation. Firstly, using DR5:GUS and the endodermis marker SCARECROW (SCR):GUS, we have performed thin sections to describe at the cellular level the different stages of LRF in

M. truncatula. We have determined 7 stages of LRF and specific root cell layer contributions to LRP formation. Then, using newly generated DR5:GUS and DR5:VENUS-N7 *M. truncatula* reporter lines, we performed time-lapse experiments to monitor LRP appearance and emergence, as well as auxin accumulation in different cell layers during LRF. Based on these results, we propose a novel insight into LR patterning in *M. truncatula* and discuss differences and similarities compared to *A. thaliana*.

Materials and methods

Plant and plasmids material

To select early LRP stages for the cellular description of LRF, DR5:GUS (kindly provided by L. Laplaze (IRD, Montpellier, France) in a pBI binary vector containing the kanamycin resistance gene (Perrine-Walker et al., 2010)) and the endodermis reporter LaSCR1:GUS and LaSCR2:GUS genes (kindly provided by C. Vance, University of Minnesota, U.S. (Sbabet et al., 2010)) were introduced in *Medicago truncatula* A17 roots using *Agrobacterium rhizogenes* transformation (Boisson-Dernier et al., 2001).

Stable, *M. truncatula* transgenic plants carrying the same DR5:GUS construct or the fluorescent nuclear version DR5:VENUS-N7 were obtained in the 2HA accession by transformation with the *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 strain, as described in Chabaud et al. (2003) and <http://www.noble.org/medicagohandbook>. Selection was performed using kanamycin resistance for DR5:GUS and phosphinotricine resistance for the DR5:VENUS-N7 lines. The DR5:VENUS-N7 construct (in the pMLBART binary vector carrying the BASTA resistance gene) was kindly provided by M. Heisler (EMBL, Heidelberg, Germany, Heisler et al., 2005).

Eight independent DR5:GUS and 4 DR5:VENUS-N7 lines were tested for β -glucuronidase (GUS) and VENUS activity, respectively, and 2 of each line displaying good reporter expression and 3/1 transgene segregation in the T2 progeny were selected for further studies.

Plant growth conditions

M. truncatula Jemalong seeds were scarified, surface-sterilized, stratified at 4 °C for 3 days and germinated by incubating overnight at 25 °C. After germination, seeds were aligned in square plates with oblique modified M medium (Bécard and Fortin, 1988; Olah et al., 2005) containing 4 g/l Phytigel (Sigma–Aldrich), and grown vertically in a growth chamber at 21 °C (16 h light/8 h dark cycles) enveloped with kraft paper and aluminium foil covers to reduce light exposure of roots.

To enrich for LRF events, LaSCR1:GUS and LaSCR2:GUS transgenic roots were grown on M medium containing 3% sucrose for 4 days (Gonzalez-Rizzo et al., 2006).

For auxin treatments, a 10 mM stock solution of naphthalene acetic acid (NAA) was obtained first by solubilization of NAA powder (Sigma) with a small volume of ethanol (500 μ l) and 0.1 N KOH, then by sterile dilution in water (up to 10 ml). For NAA assays, plants were grown for 48 h on M medium containing 0.01, 0.1 or 1 μ M NAA. Control plants were treated with the corresponding solvent amount. A 10 mM stock solution of naphthylphthalamic acid (NPA, Duchefa Biochemie) was obtained in DMSO. For NPA assays, plants were grown for 24 h on M medium containing 10 μ M NPA.

Histochemical analysis

Histochemical staining for β -glucuronidase (GUS) activity was performed according to Journet et al. (2001), by incubating plant tissues overnight at 37 °C in a pH 7 phosphate buffer containing 2.5% X-gluc as substrate. Tissues were subsequently fixed in a 2.5%

glutaraldehyde/2.5% paraformaldehyde solution buffered at pH 7, for 2 h at room temperature.

Microscopic analysis

LRP were embedded in Technovit 7100 resin (Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany), according to the manufacturer's recommendations. Thin, 8–10 μm , sections were made using a microtome (2040 Reichert Jung). The sections were counter-stained with 0.05% ruthenium red for 10 min and observed with an Axioplan 2 microscope (Zeiss). DR5:VENUS-N7 expression was followed using a Leica MZFLIII stereomicroscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) or an Axioplan (Zeiss) microscope using the (470/40; 515) nm band pass (excitation; emission) filter.

Results

Cellular events of lateral root formation (LRF) in *M. truncatula*

Our first objective was to describe the cellular events leading to the formation of LRP in *M. truncatula*. To detect early LRP developmental stages more easily, we used the DR5:GUS and LaSCARECROW:GUS (LaSCR:GUS) marker genes. SCARECROW (*SCR*) is a transcription factor specifically expressed in the endodermis in *Arabidopsis* (Di Laurenzio et al., 1996). In this study, we used *LaSCR1* and *LaSCR2* from *Lupinus albus*, which are *SCR* orthologues expressed at early LR development stages in both white lupin and *M. truncatula* (Sbabou et al., 2010). The expression domains of *LaSCR1:GUS* and *LaSCR2:GUS* we observed in *M. truncatula* were similar and, although stronger in the endodermis, also extended to the pericycle and, to a lesser extent, to the inner cortical layer. DR5:GUS expression was also associated with early stages of LRF (see later, Fig. 2F and Fig. 3). Although not very informative for cell layer identity, these constructs were helpful to select root zones showing divisions associated with early steps of LRF. Longitudinal and transverse thin sections were performed and microscopic observations allowed different cellular stages of LRF in *M. truncatula* to be discriminated (Fig. 1). As shown in Fig. 1, we identified 7 developmental stages of LRP formation, prior to emergence.

The earliest stage of LRF that we observed consisted of anticlinal cell divisions in two or three pericycle cells (Stage Ia, Fig. 1A) next to a protoxylem pole (see Fig. 3A). This was followed by periclinal divisions of these pericycle cells and, approximately at the same time, anticlinal divisions were observed in about two cells of the endodermis overlying the divided pericycle cells (Stage Ib, Fig. 1B, arrowheads). Subsequently, we observed more periclinal divisions in the pericycle, generating a two-layer LRP of approximately 10 cells long (Stage II, Fig. 1C). In a few cases, one or two of the inner cortical layer cells were seen to have divided anticlinally at this stage but, more frequently, inner cortical cell divisions accompanied the next stage of LRP formation (Stage III, Fig. 1D, black arrowheads). At Stage III, between three and six cell divisions were typically observed in the innermost cortical layer (inner cortex), and, in about 20% of studied LRP, either one or two cell divisions could be seen in the second cortical cell layer (data not shown). No cell divisions were ever seen in other cortical layers. Stage III was also characterized by new periclinal divisions in the two layers of the pericycle of the LRP, generating four pericycle layers (Fig. 1D, white arrowheads). At approximately the same time, periclinal divisions were seen in the endodermis (Fig. 1D, grey arrowhead), and anticlinal divisions continued in the dividing pericycle and endodermis cells. The next stage of LRF, which we called Stage IV (Fig. 1E), was characterized by an extensive cell proliferation in the pericycle and the endodermis, and further anticlinal divisions of inner cortical cells (Fig. 1E, arrowheads). Stage

IV LRP took up approximately half of the depth of the cortex of the main root, and caused a bulge on the root surface. This bulge was accompanied by the separation of surrounding cortical cells that consequently showed relatively large intercellular spaces and often became displaced (Fig. 1E). First divisions of vascular parenchyma cells could be observed at this stage, suggesting initiation of the new root vasculature (Fig. 1E, arrow). At Stage V (Fig. 1F), LRP were larger, taking up more than half of the depth of the cortex of the main root. New cell divisions were responsible for the increase in size, but were increasingly difficult to characterize, except for periclinal divisions clearly visible in inner cortical cells at the periphery of the LRP (Fig. 1F, grey arrowheads). At this stage, surrounding cortical cells became more separated as the LRP continued to expand in size. In the next developmental stage, Stage VI (Fig. 1G), LRP consisted of a compact mass of small cells that progressed through the remaining cortical and epidermal cells of the main root. Finally, the new LR emerged through the remaining cortical and epidermal cell layers (Fig. 1H). Since cells of emerging LRs were larger in size than at previous stages of LRP formation, we assume that newly formed LR emerged, as in *A. thaliana*, primarily by expansion of pre-existing cells rather than by cell division (Malamy and Benfey, 1997). Concomitantly, a vascular connection between the newly emerged LR and inner vascular tissues was observed (Fig. 1H, arrow).

LR development and patterning in *M. truncatula*

To further characterize LR development and to study LR patterning along the primary root of *M. truncatula*, as well as linking it to auxin regulation as described for *A. thaliana* (Dubrovsky et al., 2006), we generated stable DR5:GUS and DR5:VENUS-N7 transgenic lines of *M. truncatula*. First, patterns of DR5 activity in planta and DR5 sensitivity to exogenous auxin application were studied in these plants (Fig. 2 and Fig. S1). DR5:GUS (Fig. 2A and Fig. S1) and DR5:VENUS-N7 (Fig. 2B) lines displayed good sensitivity to exogenous synthetic auxin (1-naphthaleneacetic acid, NAA,) or to an auxin transport inhibitor (N-1-naphthylphthalamic acid, NPA) (Fig. 2C). Indeed, extension of the GUS or VENUS expression pattern was observed upon treatment with 0.01 μM NAA for 48 h (Fig. 2A and B), and loss of the DR5 activity gradient was observed upon treatment with 10 μM NPA, resulting in DR5 activity being restricted to the apical part of the root (Fig. 2C, arrowhead), as expected for the impairment of polar auxin transport. In non treated conditions, DR5 activity was observed in the root apical meristem and root vascular tissues (Fig. 2D and E), and at different stages of LRP formation (Fig. 2F–I) for both types of construct. Sections of this material at early stages of LRF (Fig. 3 and Fig. S2, data not shown) confirmed the tissular organization observed in the hairy root system. DR5 activity started close to the vascular bundle of the main root at early stages of LRP development (Fig. 2F) and was clearly marking the LR apical meristem and new vasculature at later stages (Fig. 2G and H). Thus, these lines were suitable for studies on LR formation and auxin accumulation associated with developmental processes such as LRF in *M. truncatula*.

Next, we exploited the DR5:GUS lines to further characterize auxin accumulation during LRF in *M. truncatula*. As shown in Fig. 3A (and Fig. 5C), we observed an early DR5:GUS activity in pericycle, endodermal and cortical cells facing protoxylem poles, upon the first pericycle periclinal divisions. DR5:GUS expression was then clearly visible in dividing pericycle and endodermal cells during subsequent early stages of LRF (Fig. 3B) and then progressively moved towards the LR apical meristem and the developing LR vasculature (Fig. 3C). Interestingly, DR5:GUS expression was also observed in inner cortical cells of the LRP and in cortical cells surrounding the growing LRP (Fig. 3B and C), suggesting that auxin accumulation can accompany cortical cell divisions and cortical cell “loosening” necessary for LRP growth and LR emergence. Similar

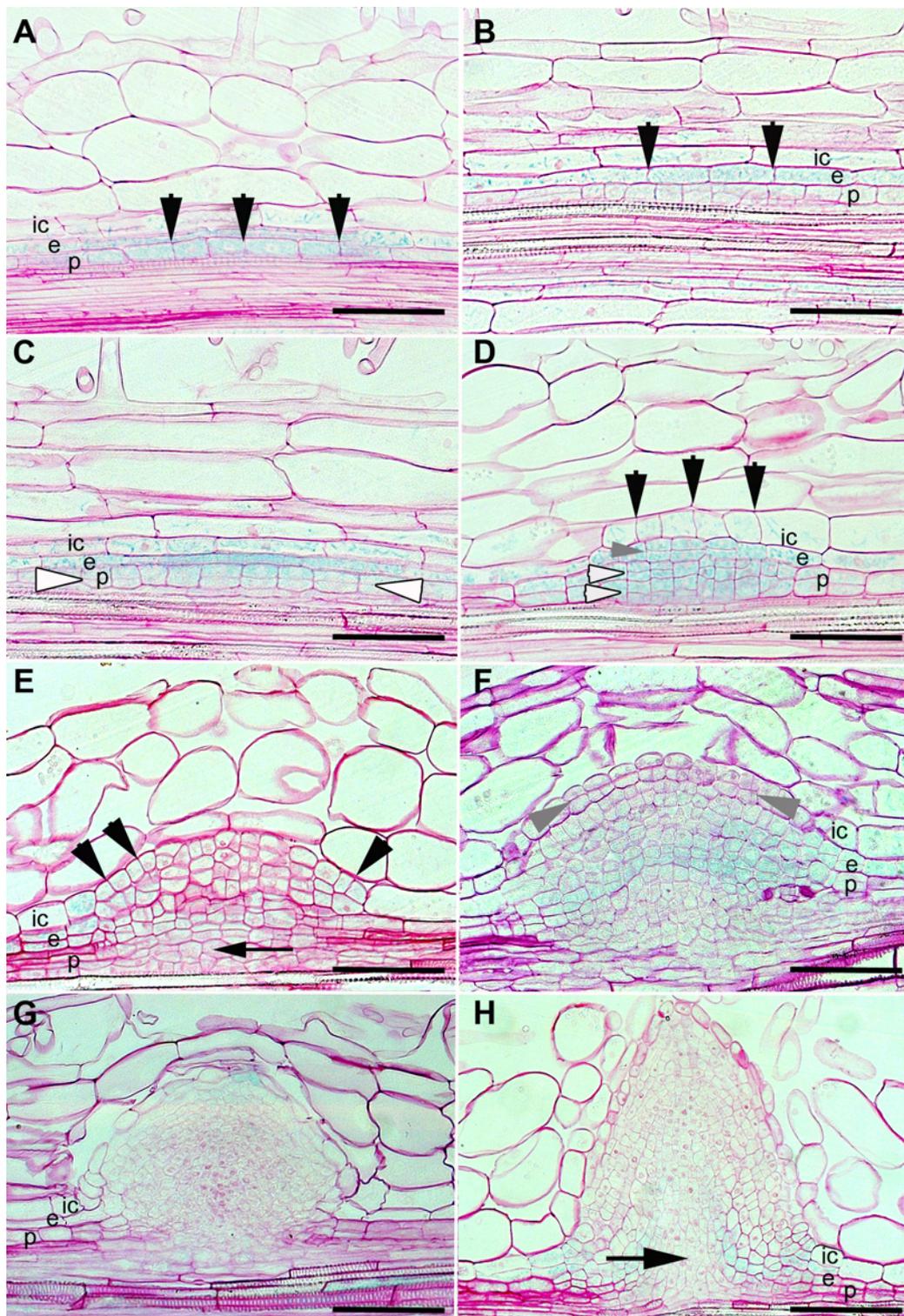


Fig. 1. Developmental stages of lateral root formation in *Medicago truncatula*. Longitudinal thin sections (8–10 μm) of roots with ruthenium red counter staining. LaSCR1:GUS (A, D, E and H) or LaSCR2:GUS (B, C and F) expression, marking the endodermis but also pericycle cells, and DR5:GUS (G) expression is shown in blue. (A) Stage Ia. First anticlinal divisions in the pericycle (black arrowheads). (B) Stage Ib. Anticlinal divisions in the endodermis (black arrowhead) while the pericycle continues dividing anticlinally. (C) Stage II. Periclinal divisions in the pericycle (white arrowheads) forming a 2-layered pericycle, while the endodermis continues dividing anticlinally. (D) Stage III. Periclinal divisions in the pericycle (4-layered, white arrowheads) and the endodermis (2-layered, grey arrowhead), and anticlinal divisions in the inner cortex (black arrowheads). (E) Stage IV. Further divisions in the pericycle, endodermis and inner cortex. Note the anticlinal divisions in the inner cortex forming the external part of the LRP (black arrowhead), suggesting a real contribution of this layer to the primordium, and the proliferation of the parenchyma (arrow), showing the formation of the future vasculature. (F) Stage V. Cell proliferation in the pericycle, the endodermis and the inner cortex allows the primordium to extend, while adjacent cortical cells begin to collapse. Note the periclinal divisions in the most external layer of the LRP (grey arrowheads). (G) Stage VI. The LRP reaches the epidermis and is just about to emerge from the main root. DR5:GUS expression (in blue) localizes at the apical part of the primordium. (H) Emergence. The LRP crosses the epidermis. The central vasculature of the new root is visible with many elongated cells (arrow). p: pericycle; e: endodermis; ic: inner cortex. Bars = 100 μm .

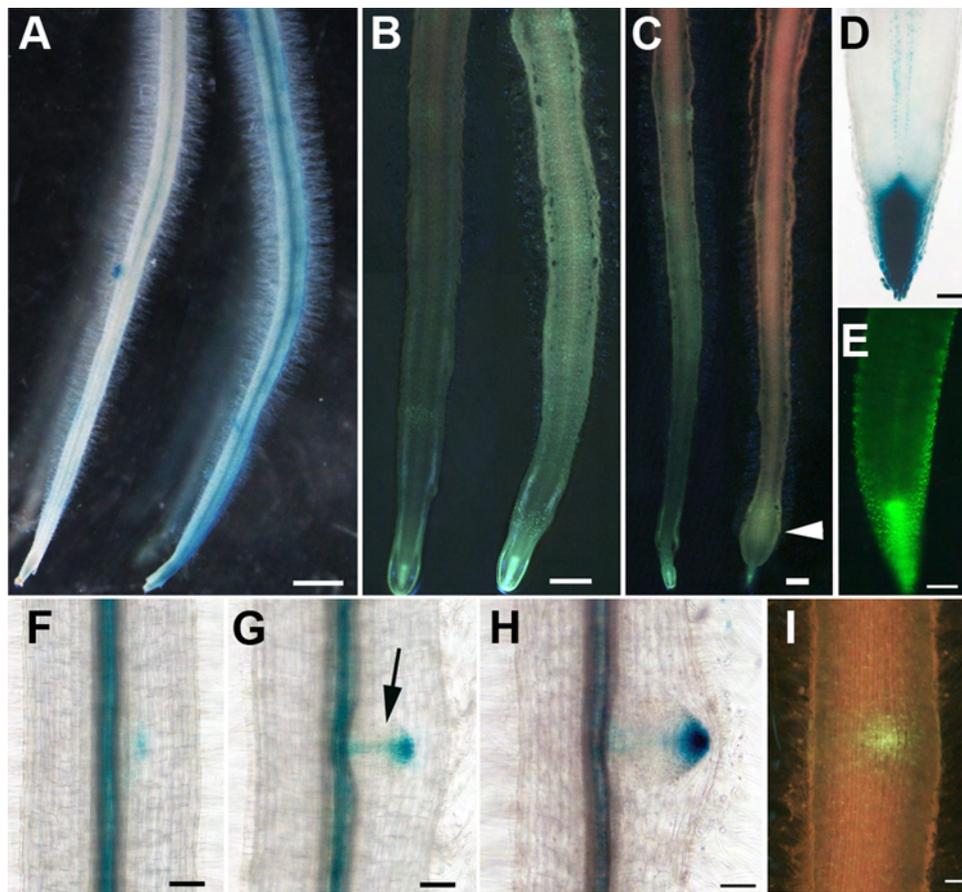


Fig. 2. Characterization of DR5:GUS and DR5:VENUS-N7 *Medicago truncatula* transgenic lines. (A, right) Root response of a DR5:GUS seedling after 48 h on M medium containing 0.01 μ M naphthalene acetic acid (NAA) compared to a mock-treated plant (A, left). (B, right) Root response of a DR5:VENUS-N7 seedling after 48 h on M medium containing 0.01 μ M NAA compared to a mock-treated plant (B, left). (C, right) Root response of a DR5:VENUS-N7 3 day-old plant after 24 h on M medium containing 10 μ M of the auxin transport inhibitor naphthylphthalamic acid (NPA), compared to the same 3 day-old plant before treatment (C, left). Note the restricted DR5:VENUS-N7 fluorescence in a zone above the root tip (arrowhead), suggesting that auxin accumulates in this zone following inhibition of polar auxin transport by NPA. (D and E) Expression pattern of DR5:GUS (D) and DR5:VENUS-N7 (E) *M. truncatula* transgenic lines in the apical part of the primary root. In both cases, expression is localized in the root apical meristem, the root cap and the central vasculature. DR5:VENUS-N7 expression is also visible in the epidermis, particularly in young parts of the root (E). (F, G and H) DR5:GUS expression in lateral root primordia at stage II–III (F), stage V (G) (with the GUS staining in the future vasculature of the LRP (arrow)) and stage VI (H). (I) DR5:VENUS-N7 expression in a LRP at a late un-emerged stage. GUS staining is shown in blue. VENUS fluorescence is shown in green. 40 to 50 plants from two independent lines for each construct were tested and gave similar results. Bar in A = 1 mm. Bars in B and C = 500 μ m. Bars in D–I = 100 μ m.

results were obtained at early stages of LRF with the DR5:VENUS-N7 transgenic lines (Fig. S2). Thus, auxin accumulation, as visualized by the DR5:GUS profile, seemed to accompany LRP formation.

To further understand LRF and patterning, we used the transgenic *M. truncatula* plants carrying the fluorescent reporter DR5:VENUS-N7 grown *in vitro*. We observed that among the local high levels of DR5:VENUS-N7 fluorescence, there was always a fluorescent spot visible in the distal part of the primary root, close to the root tip, in a zone corresponding to the root hair differentiation zone (Fig. 4A, white arrowhead). This is similar to the region that has been described for LRI (i.e. early stages of pericycle founder cells divisions) in *A. thaliana* (De Smet, 2012; Dubrovsky et al., 2011) and we assumed that such fluorescent spots corresponded to early stages of LRF. To confirm this and determine if LRI was also occurring in this region in *M. truncatula*, we followed both the developmental fate and the position of this fluorescent spot (Fig. 4A). To assess the position, the location of the spot on the main root was first marked at 3 days after germination (DAG) and its position relative to the root apex and to the root crown was followed daily for the next 4 days (until 7 DAG, Fig. 4B, green and orange arrows). As shown in Fig. 4C we observed that the fluorescent spot remained at the same distance from the root crown over time (orange bars), but became increasingly distant from the root

apex (green bars). The location of this fluorescent spot therefore marked a limit of fast growing versus practically no growth region (Fig. 4C), which supports an initiation of the spot in a zone that has stopped dividing or enlarging. Concerning the developmental fate of the fluorescent spot, we observed that LR originated from this spot and emerged in 43% of cases, at 13 DAG. The remaining cases presumably corresponded to non emerged LRP, consistent with subsequent observations that not all LRP give rise to emerged LR straight away (see later). Next, to further characterize the potential LRI zone of *M. truncatula*, we measured the distance from the root apex to the newly formed lowermost visible fluorescent spot every day for 7 days (Fig. 4B, blue arrow). Measurement of this distance over the first 7 DAG gave an average distance of 4.45 ± 0.4 mm (95% confidence interval), indicating that new spots always appeared at the same distance from the root apex. Altogether, the correlation of the appearance, positioning and fate of this first fluorescent spot support the existence of a precise LRI zone in the distal region of *M. truncatula* roots that can be followed by the DR5:VENUS-N7 fluorescence profile.

Next, we used the DR5:VENUS-N7 fluorescence not only to detect LRP as they first appeared, but also to follow all LRP over the first 7 days, in order to determine whether or not they would form emerged LRs. We never observed emerged lateral roots (ELRs)

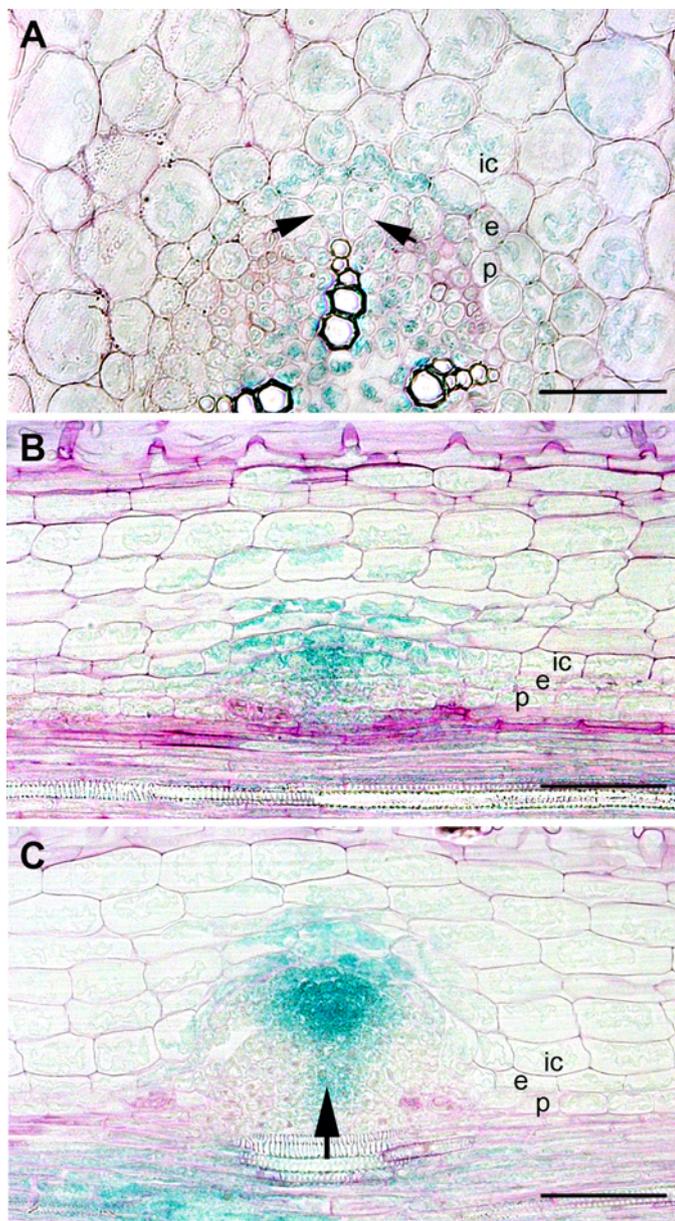


Fig. 3. DR5:GUS expression pattern during lateral root formation in *Medicago truncatula*. Thin sections (8–10 μm) of roots with ruthenium red counter staining. GUS expression is shown in blue. (A) Transverse section of an early stage of LRF. Upon the first pericycle divisions (arrows), DR5:GUS activity, suggesting an accumulation of auxin, is seen in the pericycle, the endodermis and the cortex. (B) Longitudinal section of a stage III LRP. GUS staining is seen in dividing cells of the pericycle, endodermis and inner cortex, indicating that auxin accumulation may support the active proliferation of cells in the LRP. GUS staining is also seen in at least two adjacent non-dividing cortical layers. (C) Longitudinal section of a stage VI LRP. DR5:GUS activity is present in the upper part of the LRP, corresponding to the apex of the future root (future meristem), and along the cells of the future central vasculature (arrow). Staining is still visible in the adjacent layers of cortex that do not contribute to the primordium suggesting auxin accumulation in these cells that could prepare cell wall loosening for emergence. p: pericycle; e: endodermis; ic: inner cortex. Bars = 50 μm in A, 100 μm in B and C.

that were not marked at the LRP stage by the VENUS fluorescence. Mean numbers of ELRs and remaining un-emerged LRP (LRP) were assessed after 13 days (0–13 DAG interval) or for the 0–7 DAG and 7–13 DAG time intervals. As shown in Table 1, only 5.19 (± 0.58) LRs per plant had emerged at 13 DAG, compared to 14.09 (± 1.73) un-emerged LRP per plant (giving approximately 27% of ELRs). When we compared, using a chi-squared test for independence, the proportion of ELRs between the 0–7 DAG and the 7–13 DAG intervals,

no significant difference in the proportion of emerged LRs (along the whole primary root) was observed. However, emergence speed was dependent on the part of the primary root where the LRP were located at 7 DAG, with a mean time of 6.3 days (± 0.61) for LR located in the older half of the primary root and 3.31 days (± 0.44) for the younger (closest to the root apex) half (Fig. 4D). This suggests that if newly formed LRP do not emerge straight away while they are in the younger part of the primary root, then they have a lower chance to emerge once they are positioned in an older zone of the primary root.

Finally, we also observed that two LRs could often arise next to each other on the primary root (Fig. 5A). 14.3% (110/749) of LRs or LRP present at 7 DAG were formed at the same position. This was already visible at the LRP stage (Fig. 5B), and even at very early stages indicating that two LRs can initiate next to neighbouring protoxylem poles (Fig. 5C). However, those double LRs did not often emerge simultaneously, since we mostly observed such double events as a LRP next to an already emerged LR (Fig. 5D).

Discussion

Despite the apparent variations that exist in the cellular events of LRP formation between different plant spp., a detailed description is only available for *A. thaliana*. Some data is now available in monocots such as maize or barley (Jansen et al., 2012; Orman-Ligeza et al., 2013) and, among other plants, there are several reasons to study the model legume *M. truncatula*. Firstly, *M. truncatula*, like the majority of legume plants, is able to form root nodules in the presence of nitrogen-fixing rhizobial bacteria, and nodules share characteristics with LRs (Mathesius, 2008). Thus, both structures are new organs formed by dedifferentiation of root cells and both originate from divisions in the pericycle (although most of the nodule originates from cortical cell divisions) (Timmers et al., 1999). Secondly, there are overlaps in the developmental pathways involved in LR and nodule formation (Desbrosses and Stougaard, 2011). For example, plant mutants have been described that form nodules with varying degrees of similarity to LRs (Couzigou et al., 2012; Guan et al., 2013). The fact that rhizobial Nod factors stimulate LRF (Olah et al., 2005) is also evidence that Rhizobia have exploited the developmental pathway for LRF. Next, arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and symbiotic molecules such as Myc-LCOs also promote root branching in *M. truncatula* (Gutjahr and Paszkowski, 2013; Maillet et al., 2011). Moreover, Rhizobia and LCOs directly interfere with auxin transport in white clover (Mathesius et al., 1998). Our long-term aim is to exploit molecular genetic tools available in *M. truncatula* to understand the mechanisms by which Rhizobia and AM fungi exploit the endogenous pathway for LRF and, for this, we first needed to describe the cellular organization and cell divisions involved in LRF, as well as the global LR patterning along the primary root in this model plant.

By detailed cellular studies combined with thin root sections, we have described seven stages (Ia, Ib, II–VI) in LRF in *M. truncatula*, with LR emergence following Stage VI. These stages differ from the nomenclature used by Ariel et al. (2010) who did not take into account tissue specific contributions, and notably that of the endodermis, to LRF in *M. truncatula*. Our description has revealed some similarities with the process of LRF in Arabidopsis, but also some significant differences. As the novel features appear early in LRP formation in *M. truncatula*, we have schematized early steps of LRF for clarity of the discussion and for future studies (Fig. 6).

As in Arabidopsis, we have decided to include in Stage I the stages of anticlinal divisions of main tissue contributors to the future LRP. Thus, Stage Ia is anticlinal cell divisions in pericycle cells adjacent to a protoxylem pole (Fig. 6A) and Stage Ib (Fig. 6B) marks the anticlinal division of endodermal cells. This

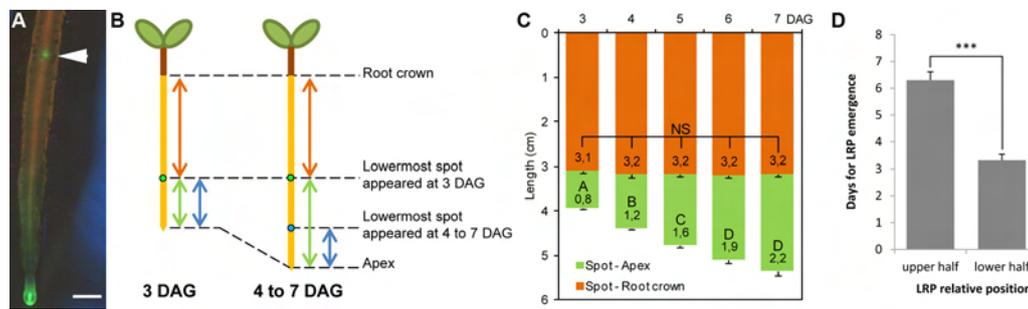


Fig. 4. Lateral root initiation and patterning in *Medicago truncatula*. (A) DR5:VENUS-N7 fluorescence in the young apical part of the root. The white arrowhead shows the lowermost detectable spot of fluorescence formed towards the root apex. (B) *M. truncatula* seedling scheme showing the position of the lowermost fluorescent spot observed at 3 DAG (coloured in green) and its position during the next 4 days. The distance between the root crown and this spot is shown by an orange arrow and the distance between the root apex and this spot is shown by a green arrow. The newly formed fluorescent spot closest to the root apex for each day (3–7) is schematized in blue, and its distance to the root apex by a blue arrow. (C) Mean distance from the fluorescent spot that was closest to the root apex at 3 DAG (coloured in green in B) to the root crown (orange), or to the root apex (green) measured at 3, 4, 5, 6 and 7 DAG. Numbers show the average distance. Uppercase letters show statistically different categories (ANOVA or Kruskal–Wallis test, p -value < 0.05, NS: non-significant difference). Bars = standard error of the mean ($n = 68$, two independent experiments). (D) Mean time between LRP appearance and LR emergence (over the 13 days of the experiment) as a function of their position along the main root. Stars show a statistical difference of the means (ANOVA, p -value < 0.001). Bars = standard error of the mean ($n = 68$, two independent experiments). DAG: days after germination; LRP: lateral root primordium. Bar in A = 500 μ m.

endodermal contribution to LRP in *M. truncatula* marks a clear difference with *Arabidopsis*, where the endodermis does not divide during LRP formation, but instead is penetrated at Stage IV by the developing LRP (Malamy and Benfey, 1997). Furthermore, observations of subsequent stages in *M. truncatula* showed that newly divided endodermal cells become an integral part of LRP. The first periclinal cell divisions of the pericycle were observed at Stage II in *M. truncatula*, which was also characterized by further anticlinal divisions of the endodermis (Fig. 6C). An endodermal contribution to LRP formation has already been described for maize and other monocots (Bell and McCully, 1970; Jansen et al., 2012; Orman-Ligeza et al., 2013) and may thus be more widespread than suggested by the *Arabidopsis* paradigm.

Stage III in *M. truncatula* consisted of further anticlinal and periclinal divisions of the pericycle, but was notably characterized by the onset of periclinal divisions of the endodermis, as well as by anticlinal divisions of inner cortical cells (Fig. 6D). This is another significant difference with *Arabidopsis*, in which there are no cortical cell divisions during LRF. As for the newly divided endodermal cells, the divided inner cortical cells contributed to LRP in *M. truncatula*. Cortical cell contribution to LRP might be quite common in legume plants, as it has been shown to occur in arachis, soybean and lotus (Mallory et al., 1970; Op den Camp et al., 2011) but is not a legume-specific feature since it has also been observed in the non legumes *Cucurbita maxima* and *Allium cepa* (Casero et al., 1996; Mallory et al., 1970). We observed further cortical cell divisions of the second innermost cortical cell layer in subsequent stages of LRP formation in *M. truncatula* and these always occurred uniquely at the periphery of the developing LRP and not in the surrounding cells of the primary root cortex. From stage IV onwards we observed the separation of surrounding undivided cortical cells culminating in large intercellular spaces and loss of cells during LR emergence. There is also separation of cortical cells during LR emergence in *Arabidopsis*, and this is controlled by expression of cell wall remodelling enzymes triggered by auxin (Swarup et al.,

2008). The presence of multiple cortical cell layers in the roots of some plants, like *M. truncatula*, compared to the single cortical cell layer in *Arabidopsis* roots, has led to the hypothesis that divisions of the cortex during LRF could facilitate LR development and emergence (Op den Camp et al., 2011; Péret et al., 2009). In rice, cortical cell divisions around LRP are proposed to facilitate LR emergence (Sreevidyaa et al., 2010). After emergence, *M. truncatula* and *Arabidopsis* LRs also differ by having an open or a closed root meristem, respectively (Hamamoto et al., 2006).

Despite the growing interest to understand the differences and similarities between LRF and nodule development in legumes, and the importance of auxin in these phenomena, very few auxin reporter lines are available in legumes. A DR5:GFP-NLS line has recently been described for *Lotus japonicus* (Suzaki et al., 2012), a DR5:GUS line is available in pea (DeMason and Polowicky, 2009) and GH3:GUS reporter lines are described for lotus and clover (Larkin et al., 1996; Pacios-Bras et al., 2003). So far, very little has been described for *M. truncatula*, although the DR5:GUS and revDR5:mRFP expression pattern was partly assessed in nodules and roots (Guan et al., 2013; Huo et al., 2006; Couzigou et al., 2013). We have generated stable DR5:GUS and DR5:VENUS-N7 reporter lines of *M. truncatula* that showed good auxin sensitivity and expected DR5 activity in the root apical meristem, root vasculature and at different stages of LRF. These reporter lines should be useful to the scientific community for both developmental and plant–microbe interaction studies.

As in *Arabidopsis*, we observed early DR5:GUS expression associated with pericycle cell divisions in *M. truncatula*. Unlike *Arabidopsis*, however, DR5 activity also extended to the endodermis and the cortex, and this pattern accompanied endodermal and cortical cell divisions. From this, we can say that endodermal and cortical cell divisions in LRP formation in *M. truncatula* might be due to increased auxin levels, although we cannot exclude that the division of these cell layers is due, at least partly, to differential auxin sensitivity. The observation that DR5:GUS activity can

Table 1
Emergence frequencies of lateral roots in *M. truncatula* DR5:VENUS-N7 plants.

Time interval	0–13 DAG		0–7 DAG		7–13 DAG	
	LRP	ELR	LRP	ELR	LRP	ELR
Mean number per plant (\pm 95% confidence interval)	14.09 \pm 1.73	5.19 \pm 0.58	16.69 \pm 1.65	2.59 \pm 0.48	14.09 \pm 1.73	2.60 \pm 0.37

Mean numbers of emerged lateral roots (ELR) or lateral root primordia (LRP) per plant formed in the time intervals of 0–13 DAG, 0–7 DAG or 7–13 DAG were assessed on 68 plants from 2 independent experiments. The 95% confidence interval is shown. DAG: days after germination. Chi-squared test for independence showed no significant difference in the LRP and ELR populations at 0–7 DAG and 7–13 DAG.

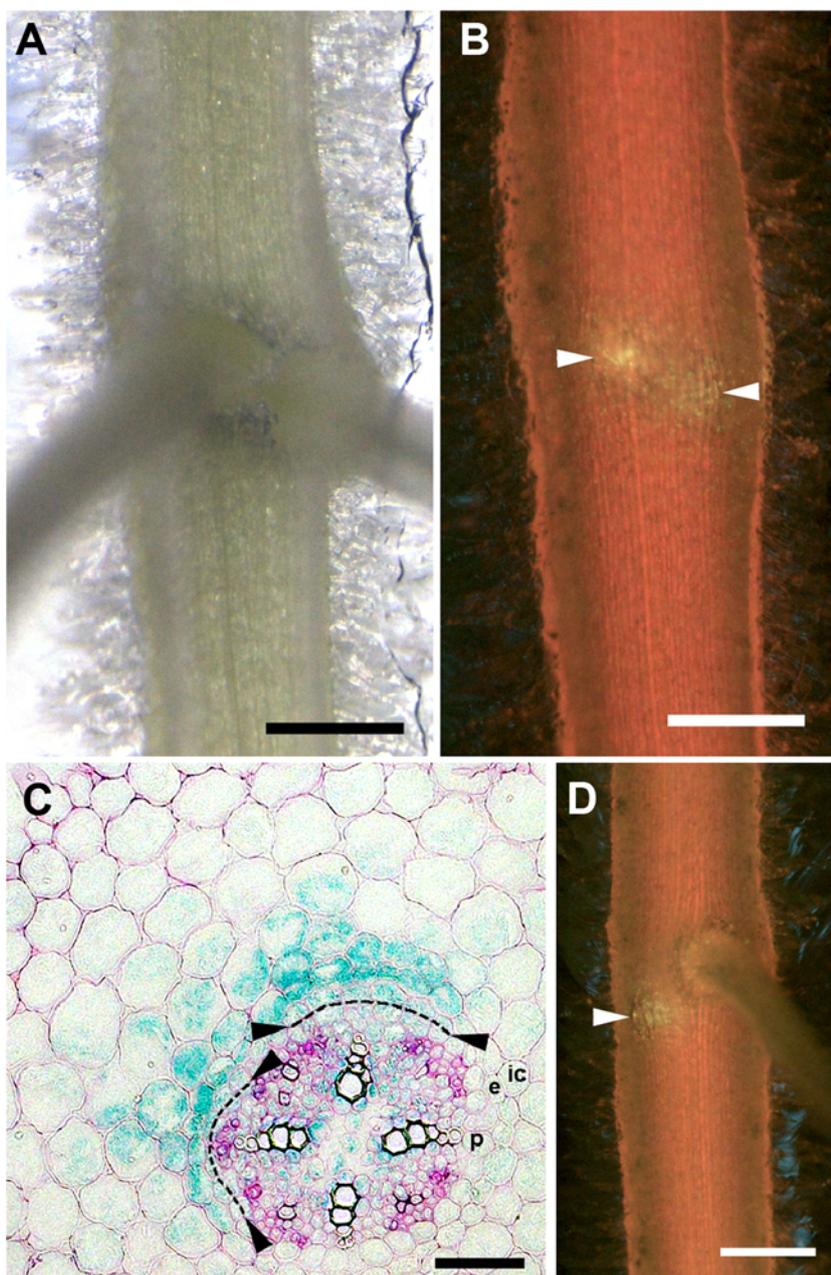


Fig. 5. *Medicago truncatula* roots often show two LRs at the same location. (A) Brightfield observation of two LRs emerged at the same place along the main root. (B) DR5:VENUS-N7 expression of the same root as in (A), but 3 days before, showing two adjacent fluorescent spots indicating two LRP developing close together (arrowheads). (C) Transverse thin section (8–10 μm) of a DR5:GUS root showing the concomitant formation of two LRP (dashed lines indicate pericycle divisions), in front of two neighbouring protoxylem poles. Counter staining is ruthenium red and GUS activity is shown in blue. (D) DR5:VENUS-N7 expression in a *M. truncatula* root, showing a fluorescence spot (arrowhead) near an already emerged root, indicating the presence of an adjacent LRP. Bars = 500 μm in A, B, D and 50 μm in C. p: pericycle; e: endodermis; ic: inner cortex.

be observed in *M. truncatula* cortical cells in association with early stages of LRF, as well as in later stages preceding LR emergence, is reminiscent of observations made with another auxin sensitive reporter, GH3:GUS, in white clover and rice (Larkin et al., 1996; Mathesius et al., 1998; Sreevidyaa et al., 2010). Indeed, in these two plant species where no cortical contribution to LRP formation was observed (but where cortical “disruption” is needed for LR emergence), enhanced GUS expression indicating local auxin accumulation was also seen in cortical cell layers surrounding LRP. In Arabidopsis, auxin induces the expression of the *LAX3* auxin transporter, necessary for LR emergence, in the root cortex and epidermis (Swarup et al., 2008). It is difficult to assess *in vivo* the exact auxin content of those cells, however, a transient expression of DR5:VENUS-N7 in Arabidopsis endodermal cells seems to be

associated with the induction of the *PIN3* auxin transporter, responsible for a feedback loop necessary for auxin canalization and founder cell specification (Marhavy et al., 2013). To better understand auxin dynamics during LRF in *M. truncatula*, it would be interesting to assess the expression of auxin transporters in different cell layers at different steps of LRF. Taken together, auxin accumulation in *M. truncatula* seems to determine the site of LRI and could be a key player in LR formation and emergence.

Using our DR5:VENUS-N7 line, we gained insights into LR patterning in *M. truncatula*. We have thus described a zone for LRI in the differentiation zone of the main root, at an average distance of 4.45 mm from the root tip, as shown for *A. thaliana* (Dubrovsky et al., 2011). Also, LRI can occur at neighbouring protoxylem poles,

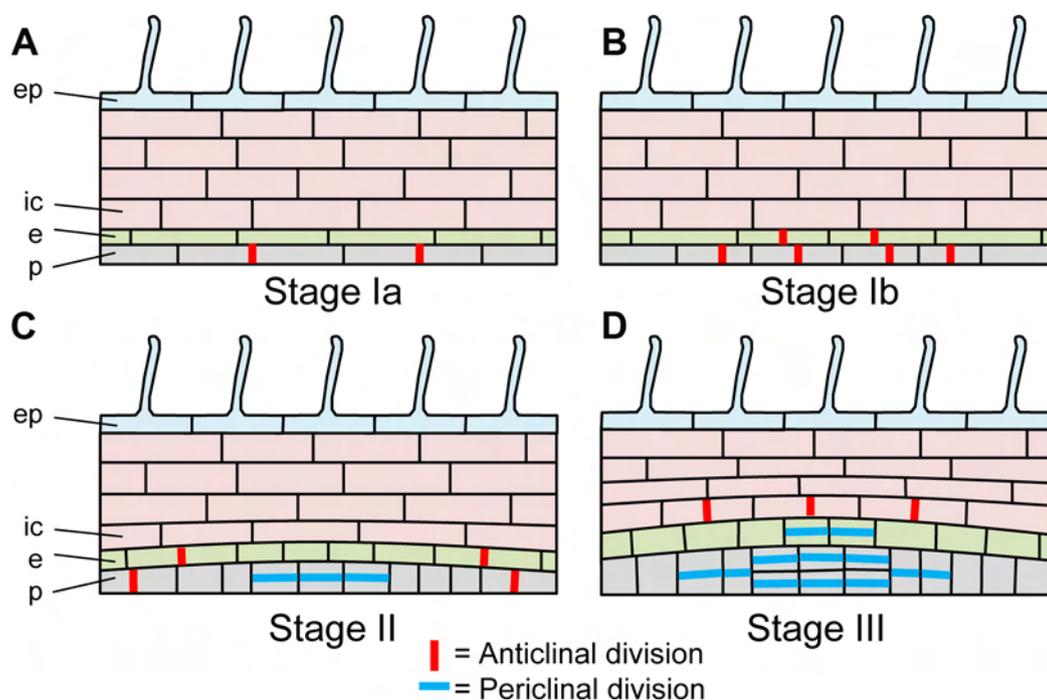


Fig. 6. Schematic representation of the early developmental stages of lateral root formation in *Medicago truncatula*. Scheme of longitudinal sections in the main root of *M. truncatula* during LRF, showing the main type of cell divisions but not the precise number of dividing cells. (A) Stage Ia. Anticlinal divisions in the pericycle. (B) Stage Ib. Anticlinal divisions in the endodermis and the pericycle. (C) Stage II. Periclinal divisions in the pericycle and anticlinal divisions in the endodermis and the pericycle. (D) Stage III. Periclinal divisions in the endodermis (2 cell layers) and the pericycle (4 cell layers), and anticlinal divisions in the inner cortex. p: pericycle; e: endodermis; ic: inner cortex, ep: epidermis.

suggesting that there is no lateral inhibition of neighbouring founder cells specification in that case. This could be explained by a difference in auxin sensitivity between *M. truncatula* and *A. thaliana*. Indeed, legumes could have different hormonal sensitivities that could predispose them to nodulate. For example, both nodulating and non-nodulating legume plants show increased LRF in response to low concentrations of abscisic acid (ABA), whereas non legumes decrease LRF in response to ABA (Liang and Harris, 2005). The auxin/cytokinin balance in the pericycle or the cortex could also control LR versus nodule development programmes in legumes (Desbrosses and Stougaard, 2011; Mathesius, 2008). Un-emerged, potentially “quiescent” LRP seem quite frequent in *M. truncatula* since only 15.6% of the LRP formed at 7 DAG had emerged at 13 DAG. Whole root observations of the DR5:VENUS-N7 fluorescence profile were not sufficient to provide a precise determination of the stage(s) at which LRP could be blocked. The analysis at multiple time points of thin sections along the main root would be needed for this. The description of blocked LRP is quite common in different plant species, including legumes, maize and Arabidopsis (Dubrovsky et al., 2006; MacLeod and Thompson, 1979). Lucas et al. have modelled alternating patterns of ELR/LRP and suggested that emergence could depend on competition for an auxin pool between neighbouring LRP (Lucas et al., 2008). This could also explain why we frequently observed 2 LRP formed very close to each other but one emerging faster than the other. The fact that we observed a longer emergence time for LRP present in the older part of the primary root is consistent with a “developmental window” for LRF already reported in Arabidopsis and correlated with a threshold in auxin concentration (Dubrovsky et al., 2006; Lucas et al., 2008). Quiescent LRP are probably an additional source of developmental plasticity in plants, since their emergence can be triggered rapidly by environmental factors. For example, an HD-ZIP gene that controls LR emergence in response to salt-stress and abscisic acid was identified recently in *M. truncatula* (Ariel et al., 2010).

We are now interested in testing whether symbiotic factors such as NFs and Myc-LCOs can stimulate the initiation, growth and/or emergence of LRP, and if there is a zone of the main root that is more responsive to LCO action. This would lead to a better understanding of the intersections between developmental processes of LRF and symbioses.

Acknowledgments

We thank the LIPM cytology platform for help with thin-sections and Ton Timmers for help with the confocal microscope.

V. Herrbach was supported by a fellowship from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, INEE) and the Novozymes company (Bagsvaerd, Denmark). This work was supported by funds from the “Laboratoire d’Excellence (LABEX)” entitled TULIP (ANR-10-LABX-41).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2013.09.006>.

References

- Ariel F, Diet A, Verdenaud M, Gruber V, Frugier F, Chan R, et al. Environmental regulation of lateral root emergence in *Medicago truncatula* requires the HD-Zip I transcription factor HB1. *Plant Cell* 2010;22:2171–83.
- Bécard G, Fortin JA. Early events of vesicular arbuscular mycorrhizal formation on *Rhizoglyphus* transformed roots. *New Phytol* 1988;108:211–8.
- Bell JK, McCully ME. A histological study of lateral root initiation and development in *Zea mays*. *Protoplasma* 1970;70:179–205.
- Benkova E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertova D, Jurgens G, et al. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 2003;115:591–602.
- Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, Bécard G, Rosenberg C, Barker DG. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of

- nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol Plant Microbe Interact* 2001;14:695–700.
- Byrne JM, Pesacreta TC, Fox JA. Development and structure of the vascular connection between the primary and the secondary root. *Am J Bot* 1977;64:946–59.
- Casero PJ, Casimiro I, Lloret PG. Lateral root initiation by asymmetrical transverse divisions of pericycle cells in 4 plant-species – *Raphanus sativus*, *Helianthus annuus*, *Zea mays*, and *Daucus carota*. *Protoplasma* 1995;188:49–58.
- Casero PJ, Casimiro I, Lloret PG. Pericycle proliferation pattern during the lateral root initiation in adventitious roots of *Allium cepa*. *Protoplasma* 1996;191:136–47.
- Chabaud M, de Carvalho-Niebel F, Barker DG. Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. *Plant Cell Rep* 2003;22:46–51.
- Couzigou JM, Zhukov V, Mondy S, Abu el Heba G, Cosson V, Ellis TH, et al. NODULE ROOT and COHLEATA maintain nodule development and are legume orthologs of Arabidopsis BLADE-ON-PETIOLE genes. *Plant Cell* 2012;24:4498–510.
- Couzigou JM, Mondy S, Sahl L, Gourion B, Ratet P. To be or not to be: evolutionary tinkering for symbiotic organ identity. *Plant Signal Behav* 2013;8:8.
- De Smet I. Lateral root initiation: one step at a time. *New Phytol* 2012;193:867–73.
- De Smet I, Tetsumura T, De Rybel B, Frey NF, Laplaze L, Casimiro I, et al. Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of Arabidopsis. *Development* 2007;134:681–90.
- DeMason DA, Polowicky PL. Patterns of DR5::GUS expression in organs of pea (*Pisum sativum*). *Int J Plant Sci* 2009;170:1–11.
- Desbrosses GJ, Stougaard J. Root nodulation: a paradigm for how plant-microbe symbiosis influences host developmental pathways. *Cell Host Microbe* 2011;10:348–58.
- Di Laurenzio L, Wysocka-Diller J, Malamy JE, Pysh L, Helariutta Y, Feshour G, et al. The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root. *Cell* 1996;86:423–33.
- Dubrovsky JG, Gambetta GA, Hernandez-Barrera A, Shishkova S, Gonzalez I. Lateral root initiation in Arabidopsis: developmental window, spatial patterning, density and predictability. *Ann Bot* 2006;97:903–15.
- Dubrovsky JG, Napsucially-Mendivil S, Duclercq J, Cheng Y, Shishkova S, Ivanchenko MG, et al. Auxin minimum defines a developmental window for lateral root initiation. *New Phytol* 2011;191:970–83.
- Dubrovsky JG, Sauer M, Napsucially-Mendivil S, Ivanchenko MG, Friml J, Shishkova S, et al. Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:8790–4.
- Gonzalez-Rizzo S, Crespi M, Frugier F. The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* 2006;18:2680–93.
- Guan D, Stacey N, Liu C, Wen J, Mysore KS, Torres-Jerez I, et al. Rhizobial infection is associated with the development of peripheral vasculature in nodules of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 2013;162:107–15.
- Gutjahr C, Paszkowski U. Multiple control levels of root system remodeling in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Front Plant Sci* 2013;4:204.
- Hamamoto L, Hawes MC, Rost TL. The production and release of living root cap border cells is a function of root apical meristem type in dicotyledonous angiosperm plants. *Ann Bot* 2006;97:917–23.
- Heisler MG, Ohno C, Das P, Sieber P, Reddy GV, Long JA, et al. Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the Arabidopsis inflorescence meristem. *Curr Biol* 2005;15:1899–911.
- Huo X, Schnabel E, Hughes K, Frugoli J. RNAi phenotypes and the localization of a Protein::GUS fusion imply a role for *Medicago truncatula* PIN genes in nodulation. *J Plant Growth Regul* 2006;25:156–65.
- Jansen L, Roberts I, De Rycke R, Beeckman T. Phloem-associated auxin response maxima determine radial positioning of lateral roots in maize. *Phil Trans R Soc Lond B: Biol Sci* 2012;367:1525–33.
- Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME, Walker GC. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:619–33.
- Journet EP, El-Gachtouli N, Vernoud V, de Billy F, Pichon M, Dedieu A, et al. *Medicago truncatula* ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Mol Plant Microbe Interact* 2001;14:737–48.
- Larkin PJ, Gibson JM, Mathesius U, Weinman JJ, Gartner E, Hall E, et al. Transgenic white clover. Studies with the auxin-responsive promoter, GH3, in root gravitropism and lateral root development. *Transgenic Res* 1996;5:325–35.
- Liang Y, Harris JM. Response of root branching to abscisic acid is correlated with nodule formation both in legumes and non legumes. *Am J Bot* 2005;92:1675–83.
- Lucas M, Guedon Y, Jay-Allemand C, Godin C, Laplaze L. An auxin transport-based model of root branching in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 2008;3:e3673.
- MacLeod RD, Thompson A. Development of lateral root primordia in *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Zea mays* and *Phaseolus vulgaris*: rates of primordium formation and cell doubling times. *Ann Bot* 1979;44:435–49.
- Maillet F, Poinsot V, André O, Puech-Pages V, Haouy A, Gueunier M, et al. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 2011;469:58–63.
- Malamy JE, Benfey PN. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 1997;124:33–44.
- Mallory TE, Chiang S-H, Cutter EG, Gifford EMJ. Sequence and pattern of lateral root formation in five selected species. *Am J Bot* 1970;57:800–9.
- Marhavy P, Vanstraelen M, De Rybel B, Zhaojun D, Bennett MJ, Beeckman T, et al. Auxin reflux between the endodermis and pericycle promotes lateral root initiation. *EMBO J* 2013;32:149–58.
- Mathesius U. Auxin: at the root of nodule development? *Funct Plant Biol* 2008;35:651–68.
- Mathesius U, Schlaman HR, Spaik HP, Of Sautter C, Rolfe BG, Djordjevic MA. Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant J* 1998;14:23–34.
- Mathesius U, Weinman JJ, Rolfe BG, Djordjevic MA. Rhizobia can induce nodules in white clover by “hijacking” mature cortical cells activated during lateral root development. *Mol Plant Microbe Interact* 2000;13:170–82.
- Olah B, Briere C, Bécard G, Dénarié J, Gough C. Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *Plant J* 2005;44:195–207.
- Op den Camp RH, De Mita S, Lillo A, Cao Q, Limpens E, Bisseling T, et al. A phylogenetic strategy based on a legume-specific whole genome duplication yields symbiotic cytokinin type-a response regulators. *Plant Physiol* 2011;157:2013–22.
- Orman-Ligeza B, Parizot B, Gantet PP, Beeckman T, Bennett MJ, Draye X. Post-embryonic root organogenesis in cereals: branching out from model plants. *Trends Plant Sci* 2013;18:459–67.
- Overvoorde P, Fukaki H, Beeckman T. Auxin control of root development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a001537.
- Pacios-Bras C, Schlaman HR, Boot K, Admiraal P, Langerak JM, Stougaard J, et al. Auxin distribution in *Lotus japonicus* during root nodule development. *Plant Mol Biol* 2003;52:1169–70.
- Péret B, De Rybel B, Casimiro I, Benkova E, Swarup R, Laplaze L, et al. Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci* 2009;14:399–408.
- Perrine-Walker F, Doumas P, Lucas M, Vaissayre V, Beauchemin NJ, Band LR, et al. Auxin carriers localization drives auxin accumulation in plant cells infected by *Frankia* in *Casuarina glauca* actinorhizal nodules. *Plant Physiol* 2010;154:1372–80.
- Sbabou L, Bucciarelli B, Miller S, Liu J, Berhada F, Filali-Maltouf A, et al. Molecular analysis of SCARECROW genes expressed in white lupin cluster roots. *J Exp Bot* 2010;61:1351–60.
- Sreevidya VS, Hernandez-Oanea RJ, Gyaneshwarb P, Lara-Floresc M, Ladhaa JK, Reddy PM. Changes in auxin distribution patterns during lateral root development in rice. *Plant Sci* 2010;178:531–8.
- Suzaki T, Yano K, Ito M, Umehara Y, Suganuma N, Kawaguchi M. Positive and negative regulation of cortical cell division during root nodule development in *Lotus japonicus* is accompanied by auxin response. *Development* 2012;139:3997–4000.
- Swarup R, Benkova E, Swarup R, Casimiro I, Peret B, Yang Y, et al. The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat Cell Biol* 2008;10:946–54.
- Timmers AC, Auriac MC, Truchet G. Refined analysis of early symbiotic steps of the Rhizobium-Medicago interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* 1999;126:3617–20.
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 1997;9:1963–70.

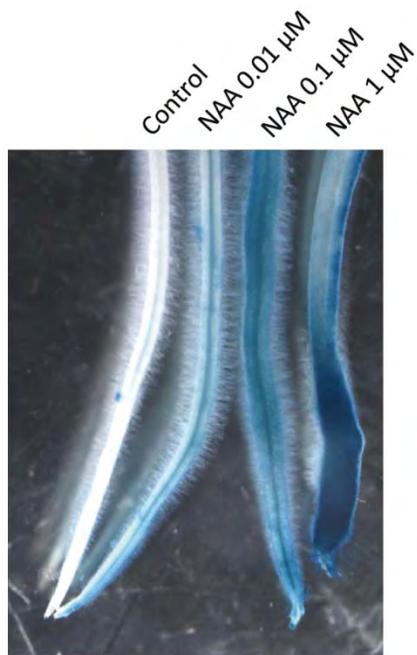


Figure S1. DR5:GUS response to a range of NAA concentrations.

Plants were grown in M medium containing NAA (Naphthalene Acetic Acid) at 0, 0.01, 0.1 or 1 μM for 48h. Control plants were treated with the amount of solvent corresponding to 1 μM of NAA. These treatments were performed on about 40 plants, a representative picture of the typical response obtained is shown for each concentration.

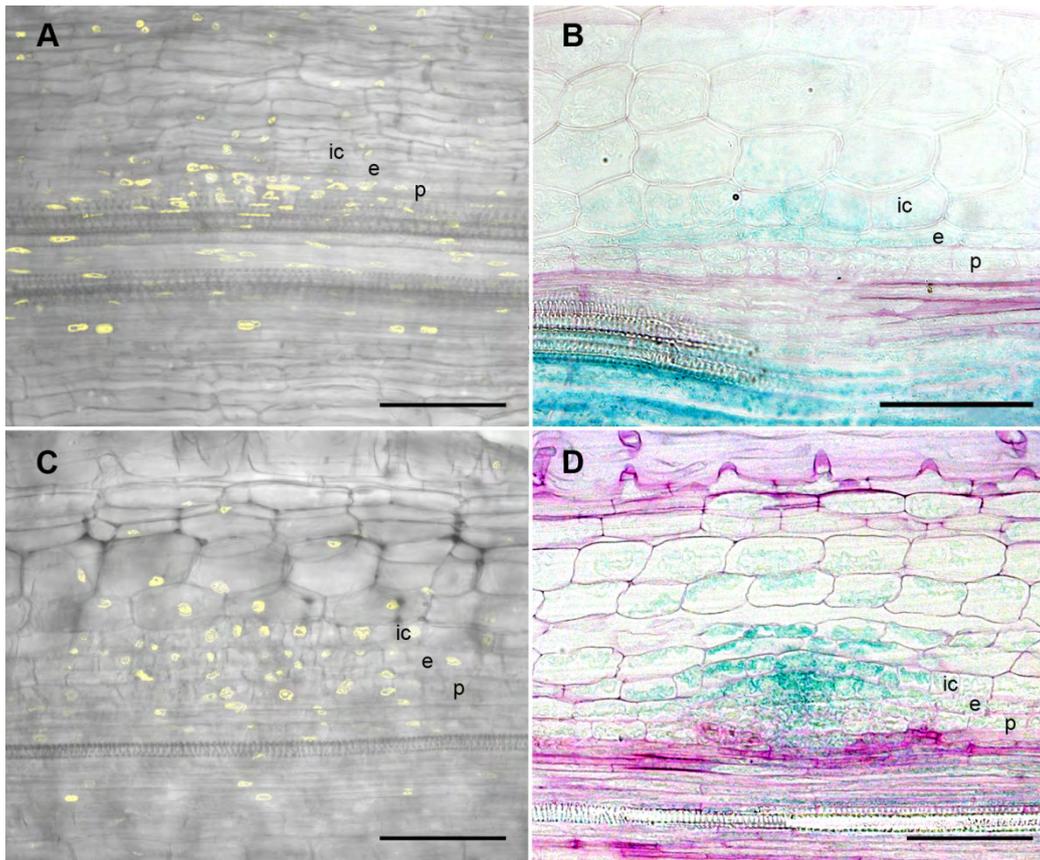


Figure S2. DR5:VENUS-N7 and DR5:GUS expression profiles in developing lateral root primordia.

Longitudinal sections of developing LRPs of stably transformed plants expressing DR5:VENUS-N7 (A, C) or DR5:GUS (B, D).

(A, B) stage II LRP. (C, D) stage III LRP.

A and C are average projections of confocal sections covering a depth of 20 µm and 40 µm, respectively. B and D are 8 µm thin sections (transmission microscopy).

Nuclear VENUS fluorescence is shown in yellow overlaid on the transmission image (A,C), GUS staining in blue and cell walls stained with ruthenium red as counter stain (B, D).

Bars = 100 µm. p: pericycle; e: endodermis; ic: inner cortex.

Supporting Information Methods

Confocal microscopy images of DR5:VENUS-N7 plants

Roots were fixed in 4% paraformaldehyde in 1 M phosphate buffer (pH 7) for 1 h, embedded in 4 % agarose and 100 µm sections were performed using a LEICA VT 1000S Vibratome. Images were acquired using a Leica TCS SP2 AOBS confocal microscope with laser excitation at 514 nm for YFP/VENUS (emission window between 520 and 600 nm) and the pinhole set at 1 AU. Bright field images were acquired simultaneously, using the transmission detector of the microscope.

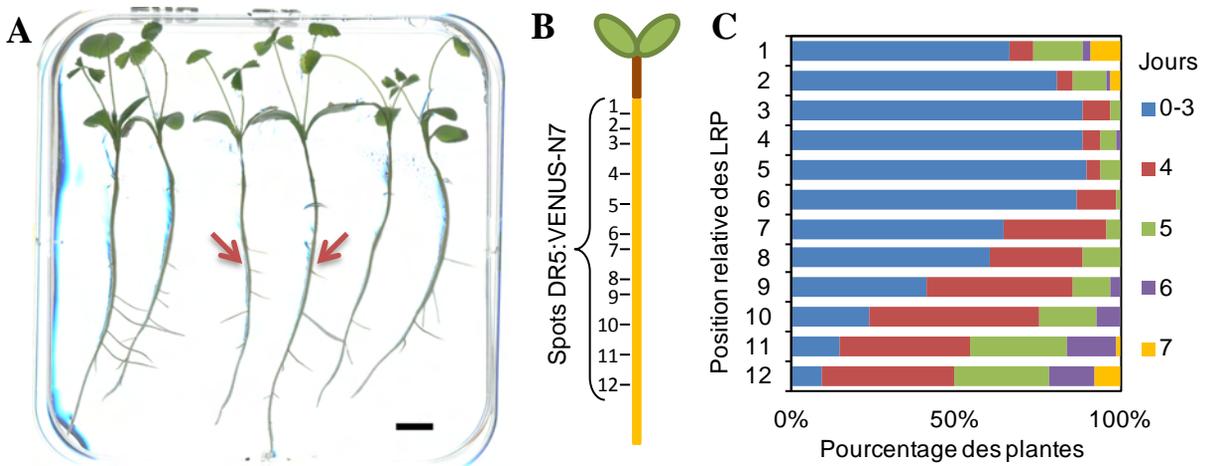


Figure 3.5 • Développement macroscopique de la racine latérale chez *M. truncatula*

(A) Mode de culture des plantules de *M. truncatula* (lignée 2HA) en boîte de Petri. Les plantules présentent des RL jeunes et courtes dans des zones vieilles de la racine principale (flèches).

(B) Les LRP sont mis en évidence à l'aide des spots de fluorescence *DR5:VENUS-N7* sont numérotées de haut en bas (position relative des LRP).

(C) Pour chaque position relative de LRP (de 1 à 12), la répartition du jour d'apparition est indiquée au cours d'une période de 7 jours (LRP apparus de 0 à 3 jours, ou à 4, 5, 6 ou 7 jours après germination). Les résultats présentés sont issus de deux expériences indépendantes, sur 50 plantes chacune (lignée 2HA *DR5:VENUS-N7* H3, génération T2).

3. Organisation spatio-temporelle des RL sur la racine primaire

(complément à l'article)

Le marqueur *DR5:VENUS-N7* nous a permis de recueillir de nombreuses observations sur l'organisation spatio-temporelle des RL le long de la racine primaire, que nous n'avons pas tous utilisés dans le manuscrit, en partie parce qu'il s'agit de travaux préliminaires. Cette partie a pour objectif de compléter les résultats d'organisation spatio-temporelle (*patterning*) présentés dans le manuscrit « *Lateral Root Formation and Patterning in Medicago truncatula* ».

Nous y avons démontré qu'il existait une zone préférentielle de formation des RL chez *M. truncatula*. En effet, un spot de fluorescence VENUS aboutissant à la formation d'un primordium de RL (LRP) est visible avec le marqueur *DR5:VENUS-N7* en moyenne à 4,45 mm au dessus de l'apex de la racine principale (Herrbach et al., 2014). Nous avons formulé l'hypothèse que cette zone correspond à la zone préférentielle des premières divisions de la formation d'une RL (*cf.* Introduction, partie A), telle que décrite chez *A. thaliana* par (Dubrovsky et al., 2006).

Lorsque des plantules de *M. truncatula* sont placées sur un milieu M pendant quelques jours, on peut observer l'émergence de RL dans des zones vieilles de la racine principale, en amont de RL déjà formées et émergées (Figure 3.5 A, flèche). Ceci suggère la formation de nouveaux primordia dans d'autres zones que celle que nous avons décrite, ou la présence de primordia dormants.

À l'aide du marqueur *DR5:VENUS-N7*, j'ai suivi au cours du temps l'apparition des LRP le long de la racine principale, de 3 à 7 jours. Pour pouvoir me référer à une localisation relative des LRP, je les ai numérotés de haut en bas de la racine primaire (Figure 3.5 B). Ce numéro n'indique pas l'ordre d'apparition des LRP, mais leur position l'un par rapport à l'autre à la fin de la cinétique (7 jours).

La figure 3.5 C présente, pour chaque position de LRP, la répartition de son jour d'apparition au cours des 7 jours. On peut y observer que les LRP apparus tôt (0-3 jours) sont globalement situés dans la partie haute (donc plus ancienne) de la racine principale, ce qui paraît tout-à-fait logique. En revanche, on peut voir que les LRP apparus tardivement (5-7 jours) sont certes situés dans la partie basse (donc jeune), mais sont aussi présents dans la partie la plus ancienne (figure 3.5 C). Cela suggère que des LRP sont apparus dans des zones vieilles, en amont de LRP déjà formés. Le profil d'apparition des LRP le long de la racine chez *M. truncatula* diffère en cela de celui d'*A. thaliana*, où les LRP apparaissent de façon ordonnée et prédictible (Dubrovsky et al., 2006).

Ce résultat peut être interprété de deux façons : soit ces RL sont néoformées dans les parties vieilles, et dans ce cas, d'autres zones de la racines peuvent être le lieu de l'initiation des RL, soit ces LRP se sont développés à des stades trop précoces pour être visibles avec le marqueur *DR5:VENUS-N7*, et ils sont restés dormants jusqu'à ce qu'une stimulation, pour le moment inexplicée, leur permette de poursuivre leur croissance. Il est toutefois possible que cette observation découle en partie d'un artefact de culture *in*

in vitro ; d'autres expériences menées dans des conditions de culture différentes permettront de confirmer ou non ce résultat.

Afin de déterminer s'il s'agit de primordia néoformés ou de primordia bloqués, des expériences complémentaires seront nécessaires. En particulier, des coupes devront être réalisées dans les zones vieilles de la racine primaire pour comprendre à quel stade de développement sont les primordia qui s'y trouvent.

4. Conclusions

À l'aide des marqueurs *DR5:GUS*, *DR5:VENUS-N7*, *pSCR1:GUS* et *pSCR2:GUS*, nous avons apporté de nouvelles connaissances sur la formation et le développement de la RL chez *M. truncatula*. Grâce à des outils cellulaires, nous avons décrit précisément six stades de développement du primordium de RL. Celui-ci met en jeu trois tissus internes : le pericycle, l'endoderme et le cortex interne, et se forme en face d'un pôle de protoxylème. Nous avons mis en évidence la présence d'une zone préférentielle d'initiation des RL à 4.45 mm de l'apex, qui est cohérente avec la zone décrite chez *A. thaliana*. Nous avons également constaté que malgré la présence de cette zone, des RL semblent pouvoir également se former dans des zones plus anciennes de la racine principale. Nous avons enfin observé que deux racines peuvent être initiées au niveau de deux pôles de protoxylème voisins.

Globalement, ces résultats montrent que *M. truncatula* est une plante au système racinaire plus complexe et moins prédictible qu'*A. thaliana*. Toutefois, nous avons réussi à mettre au point des outils d'analyse très utiles, et apportons un cadre scientifique pour l'étude de la RL chez *M. truncatula*. L'ensemble de ces outils et connaissances seront utilisés dans l'objectif de comprendre comment agissent les LCOs sur la formation des RL chez *M. truncatula* dans les parties suivantes.

Partie B

Effet des lipo-chitooligosaccharides sur la formation des racines latérales

Les nouvelles connaissances sur le développement de la racine latérale que nous avons apportées dans la première partie de la thèse (Résultats, partie A) nous permettent à présent de nous intéresser à la description des effets que peuvent avoir les lipo-chitooligosaccharides (LCOs) symbiotiques sur le développement de la RL.

La première étape, résumée en point 1 de cette partie, a consisté à optimiser les techniques de traitement qui permettent de favoriser le développement des RL en réponse aux LCOs. Nous y présentons également d'autres mises au point utiles à l'étude de l'effet des LCOs.

À l'aide de ces techniques, nous avons procédé à une analyse de la stimulation des RL par les facteurs Nod (LCOs issus du symbionte rhizobien de *M. truncatula*), présentée en point 2, avec l'objectif de situer l'action de ces facteurs de façon spatio-temporelle. Ainsi, nous avons voulu savoir si une zone précise, ou un tissu donné, de la racine primaire était sensible aux facteurs Nod, et si ces derniers agissaient au cours d'un stade particulier de développement de la RL, en s'appuyant sur la description précise des stades successifs que nous avons réalisé.

1. Effets des lipo-chitooligosaccharides : mises au point préliminaires

1.1. Miniaturisation des traitements de plantes

En amont de la thèse, les études ayant permis de mettre en évidence l'effet positif des LCOs sur la formation des racines latérales (Maillet et al., 2011; Olàh et al., 2005) ont été menées de la façon suivante : les LCOs sont incorporés dans un milieu de culture *in vitro* minimal appelé M, favorisant la formation de racines latérales (*cf.* Matériel et Méthodes). Ce milieu a notamment la particularité d'être solidifié par du Phytigel peu concentré et non par de l'agar, ce qui permet de réduire les contraintes mécaniques pour la formation des RL. Des plantules germées de *M. truncatula* (lignée A17) ont été disposées sur des boîtes de Petri contenant ce milieu, et le nombre de RL émergées a été compté quotidiennement sur 50 plantes, et pendant 5 jours successifs, afin de pouvoir utiliser un modèle statistique.

Je me suis servi de cette méthode de traitement au cours de la thèse étant donnée sa robustesse, afin de caractériser les effets des LCOs, ou d'autres molécules (hormones, *etc.*), sur la formation des RL. Toutefois, cette méthode a l'inconvénient de nécessiter de grandes quantités de molécules : le volume de milieu nécessaire à une boîte de Petri (contenant 6 à 10 plantules) est de 75 ml, et les plantes ne sont en contact qu'avec la surface du milieu. Par exemple, un traitement à 10^{-7} M de LCOs revient à utiliser

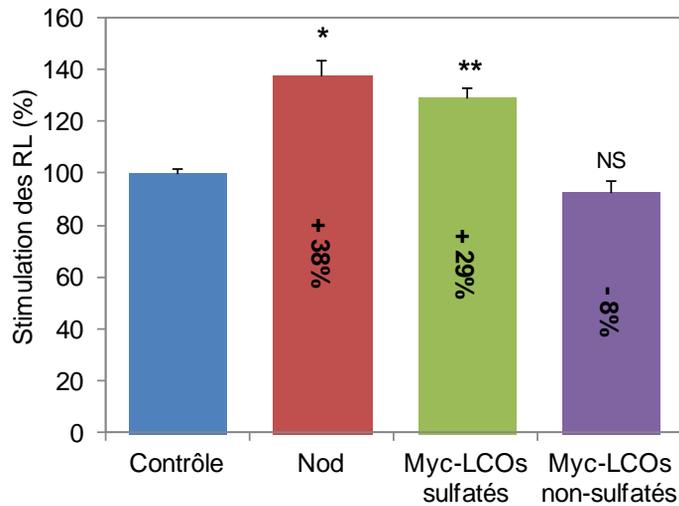


Figure 4.1 • Stimulation de la formation des racines latérales par un traitement court de LCOs en milieu liquide

Effet des facteurs Nod (Nod) à une concentration de 10^{-8} M (rouge), des Myc-LCOs sulfatés à 10^{-7} M (vert) et des Myc-LCOs non-sulfatés à 10^{-7} M (violet) sur la formation des RL chez la lignée A17. Les plantules ont été traitées à 3 jours par un trempage de 4 heures dans des solutions de milieu M liquide + LCOs, puis suivies durant 5 jours d'affilée après retransfert sur milieu M solide. Ces résultats sont issus de 3 expériences indépendantes au moins. Les données répétées ont été compilées afin d'obtenir le pourcentage de stimulation sur 5 jours. Le pourcentage supplémentaire par rapport au contrôle est indiqué sur les colonnes. Les barres représentent le SEM. Les données ont été testées par GLM (* = p -value < 0,05 ; ** = p -value < 0,01 ; NS = non significatif).

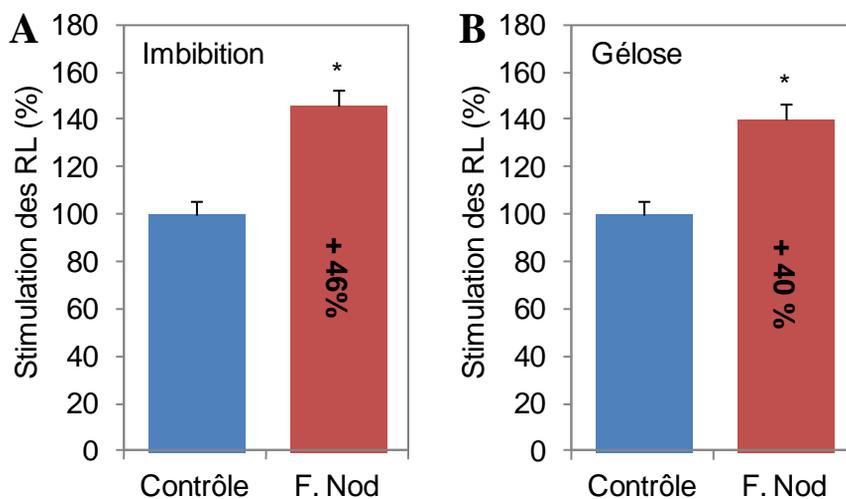


Figure 4.2 • Stimulation de la formation des racines latérales par un traitement des graines aux facteurs Nod

Effet des facteurs Nod à une concentration de 10^{-8} M, appliqués sur des graines de *M. truncatula* A17 par imbibition d'une heure dans une solution d'eau + facteurs Nod (A), ou par germination sur des boîtes de Petri contenant de la gélose dans laquelle les facteurs Nod ont été incorporés (B). Ces résultats sont issus d'une expérience pour chaque test. Les RL ont été comptées 5 jours d'affilée. Les données répétées ont été compilées afin d'obtenir le pourcentage de stimulation sur 5 jours. Le pourcentage supplémentaire par rapport au contrôle est indiqué sur les colonnes. Les barres représentent le SEM. Les données ont été testées par GLM (* = p -value < 0,05).

environ 7,5 ng de molécules pour 6 à 10 plantules, sans que l'ensemble soit effectivement perçu par la plante au cours de la cinétique. Ce problème concernait particulièrement les Myc-LCOs qui sont des molécules de synthèse, dont nous ne disposions qu'en quantité limitée.

Il était donc nécessaire de trouver une manière de miniaturiser le traitement afin de réduire la quantité de molécule par plante requise pour une bonne stimulation.

1.1.a. Traitements de plantules en milieu liquide

J'ai expérimenté des traitements courts en milieu liquide sur des plantules développées 3-4 jours sur boîte de Petri contenant du milieu M, qui ont été transférées pendant 4 ou 24 heures dans une solution composée de milieu M liquide contenant des LCOs, puis transférées à nouveau sur milieu M solide pour suivre la formation des RL. Cette méthode ne nécessite que 15 ml de milieu liquide pour 25 plantes soit environ 1,5 ng de LCOs (pour un traitement à 10^{-7} M). J'ai testé cette méthode au cours de 8 expériences, avec à chaque fois 50 plantes par traitement.

Les résultats que j'ai obtenus ont montré que les facteurs Nod à 10^{-8} M et les Myc-LCOs sulfatés à une concentration de 10^{-7} M étaient capables de stimuler la formation des RL après un traitement en milieu liquide de 4h, mais pas les Myc-LCOs non-sulfatés à 10^{-7} M (Figure 4.1). Toutefois, sur l'ensemble des expériences, l'effet stimulateur des LCOs sur la formation des RL n'était pas toujours clairement visible, et difficilement répétable. De plus, les données se sont avérées beaucoup plus variables que pour un traitement en milieu solide. En outre, le transfert des plantes des boîtes de Petri à la solution liquide, puis leur transfert dans de nouvelles boîtes de Pétri, a tendance à perturber le développement des plantes et à générer des problèmes de contamination des milieux. Les traitement liquides longs (24h) n'ont pas donné de meilleurs résultats, et ont encore augmenté la variabilité (pas montré).

Ces traitements en milieu liquide ont montré que les LCOs peuvent agir sur la formation des RL à la suite d'un contact court (4h), conclusion limitée toutefois à l'assurance que les molécules n'étaient plus présentes après le traitement (les plantules n'ont pas été rincées). En revanche, ils manquaient de robustesse et introduisaient trop de variabilité, je ne m'en suis donc pas servi dans le cadre de mon projet. Il a toutefois été utilisé par d'autres personnes dans l'équipe, sans transférer les plantes à nouveau sur un milieu M, afin d'obtenir du matériel pour des analyses transcriptomiques.

1.1.b. Traitements de graines en milieu liquide

Par la suite, afin de voir si les LCOs pouvaient aussi agir au stade graine, j'ai testé trois méthodes de traitement de graines, la première en imbibant les graines dans une solution de LCOs, la seconde en ajoutant les LCOs dans le milieu de germination, et la troisième en baignant des graines germées dans de l'eau contenant des LCOs. Ces méthodes permettent également de réduire les volumes de milieu de traitement dans notre objectif de miniaturisation.

J'ai pu observer une stimulation de la formation des RL sur les plantes après imbibition des graines 1h dans une solution de facteurs Nod à 10^{-8} M, et en faisant germer les graines sur de la gélose contenant

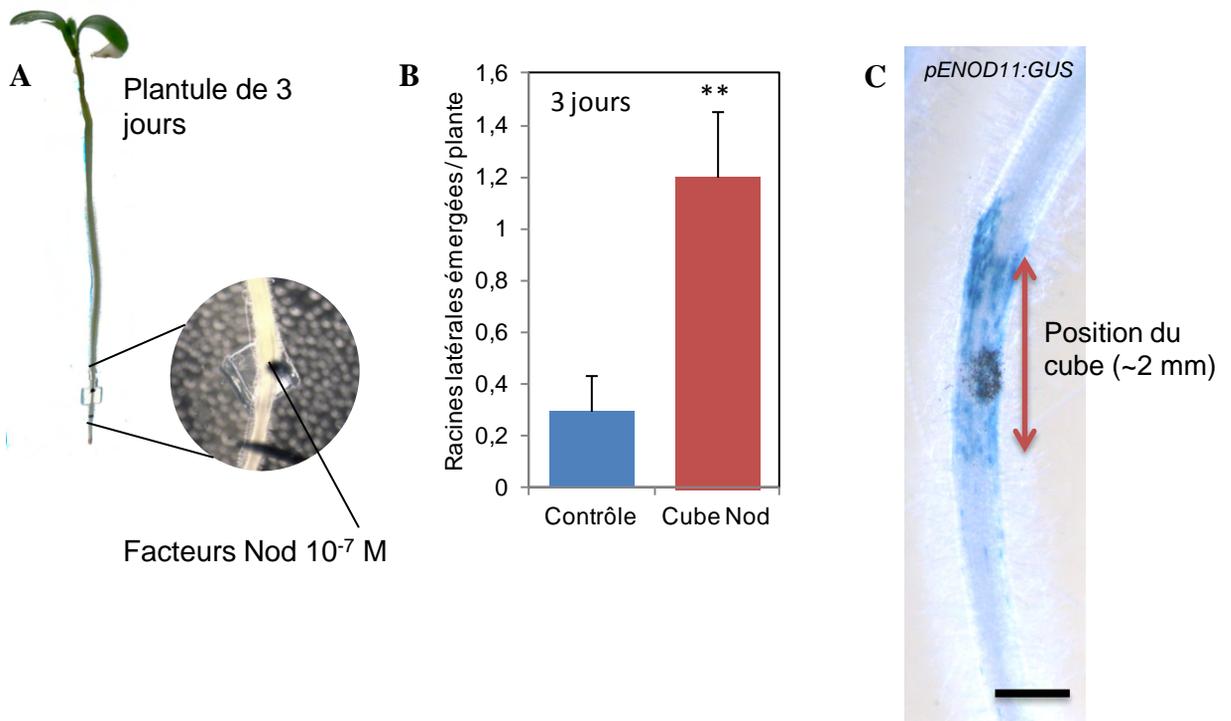


Figure 4.3 • Efficacité d'une application locale de facteurs Nod sur la stimulation de la formation des racines latérales

(A) Afin de tester l'efficacité d'une application locale de facteurs Nod, des cubes d'agarose 2% contenant des facteurs Nod à 10^{-7} M ont été déposés sur la zone de réponse aux facteurs Nod (3-5 mm de l'apex) sur des plantules de 3 jours de *M. truncatula* 2HA ou A17.

(B) Après 3 jours de traitement, le nombre de RL émergées sur l'ensemble de la racine (comptage global) a été déterminé. Le cube de facteurs Nod a induit une forte stimulation du nombre de RL. (une expérience, 20 plantes). Les barres d'erreur représentent le SEM. Les données ont été analysées par des ANOVA (** = p -value < 0,01).

(C) La même expérience a été réalisée sur des plantes exprimant le marqueur de réponse aux facteurs Nod *ENOD11:GUS* (A17). Les plantes ont été prélevées après 2 jours et l'activité GUS a été révélée (en bleu). Au niveau de la zone où le cube de facteurs Nod, le gène *ENOD11* s'exprime de façon localisée (une expérience, 20 plantes). Le point central de la position du cube est indiqué par une trace de charbon, le cube mesurant 2 mm de large. Barre d'échelle : 1 mm.

des facteurs Nod à 10^{-8} M (Figure 4.2). Un traitement court et précoce de LCOs est donc suffisant pour stimuler la formation des RL, conclusion limitée toutefois à l'assurance que les molécules n'étaient plus présentes après le traitement (les graines n'ont pas été rincées). Cependant, cette stimulation restait plus faible qu'avec un traitement classique (GLM, 40%, p -value<0.05 comparé à 70%, p -value<0.001 avec le traitement classique, cf figure 1.26A), or nous souhaitions obtenir un effet fort des LCOs afin de percevoir des variations fines et surtout d'être capable de voir l'effet des Myc-LCOs qui est 10 fois moins fort que celui des facteurs Nod (Maillet et al., 2011). Ces expériences ont été répétées deux fois, sans améliorer la variabilité. Par conséquent, je n'ai pas utilisé le traitement de graines par la suite.

1.1.c. Application locale de LCOs

Le fait de mettre en contact l'ensemble de la racine principale avec des LCOs permet de quantifier et de comparer l'effet de ces molécules sur le développement racinaire. En revanche, cela ne permet pas de savoir si les LCOs sont actifs sur une zone préférentielle de la racine primaire, et si oui quelle est cette zone, à moins d'effectuer une analyse globale (milieu solide) à l'aide du marqueur *DR5:VENUS-N7*. Par ailleurs, l'ensemble des racines latérales en formation, quel que soit leur stade de développement, sera en contact avec les molécules. Dans un objectif de synchronisation locale du traitement LCO, et afin d'obtenir une meilleure précision qu'avec l'analyse globale (milieu solide), nous avons tenté de développer une méthode d'application locale de LCOs, telle que celle utilisée par Mathesius et coll. (Mathesius et al., 1998).

Les traitements locaux de LCOs ont été réalisés en appliquant sur la racine primaire un petit cube d'agarose contenant des facteurs Nod concentrés. Le cube est disposé au niveau de la zone de développement et croissance des poils racinaires, à environ 3-5 mm de l'apex (Figure 4.3 A). Nous avons ciblé cette zone très jeune de la racine primaire car Bhuvanewari et coll. la décrivent chez *Medicago sativa* comme étant la zone de réponse à son symbionte rhizobien (Bhuvanewari et al., 1981). De plus, cette zone est la plus sensible pour la réponse de déformation des poils racinaires, pour l'activité du marqueur symbiotique *ENOD11*, et pour les oscillations calciques en réponse aux facteurs Nod (Gough and Cullimore, 2011). Enfin, comme nous l'avons montré dans le manuscrit (Résultats, partie A, point 2), il existe une zone préférentielle d'initiation des primordia de RL autour de 4,45 mm au dessus de l'apex ; cette zone paraît donc particulièrement intéressante.

Dans un premier temps, afin de valider l'efficacité de l'application locale dans cette zone, j'ai placé des cubes de facteurs Nod sur des plantules de *M. truncatula* A17 germées depuis 3 jours, et j'ai comparé leur ramification racinaire à des plantules traitées avec un cube d'agarose contenant le solvant des facteurs Nod. Par cette méthode, les racines latérales émergées étaient plus nombreuses après 3 jours de traitement avec un cube de facteur Nod (Figure 4.3 B). Par ailleurs, le marqueur de réponse aux facteurs Nod *pMtENOD11:GUS* s'exprime localement là où le cube de facteurs Nod était posé (la coloration GUS a été effectuée 48h après le dépôt du cube) (Figure 4.3 C).

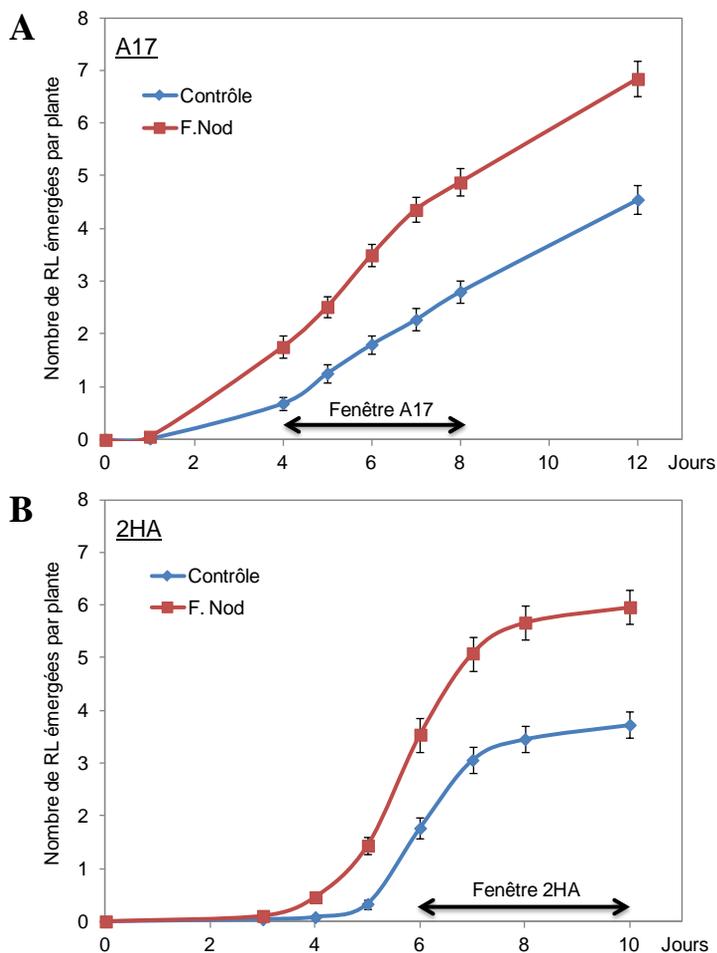


Figure 4.4 • Cinétique d'apparition des racines latérales chez les génotypes A17 et 2HA de *M. truncatula* en réponse aux facteurs Nod

Des plantules des génotypes A17 (A) et 2HA (B) ont été mises en culture dans les conditions classiques sur milieu M, contenant ou non des facteurs Nod (F. Nod) concentrés à 10^{-8} M. Le nombre de RL émergées a été suivi au cours d'une cinétique de 7 ou 8 jours afin de déterminer le profil de ramification de ces deux lignées dans nos conditions. A17 présente un profil légèrement plus précoce de formation des RL.

Les résultats sont un exemple représentatif de 5 expériences indépendantes au moins, réalisées sur environ 50 plantes chacune. Les barres d'erreur représentent le SEM. Les flèches présentent les fenêtres d'analyse statistique choisies pour les deux lignées : 4 à 8 jours pour A17 (A) et 6 à 10 jours pour 2HA (B).

Les applications locales ont été utilisées pour étudier les événements précoces de la formation de la RL, en plaçant les cubes d'agarose sur des plantules plus jeunes (1 jour), tandis que les traitements classiques (en milieu solide) ont été conservés pour les autres expériences.

1.2. Sensibilité des lignées A17 et 2HA de *M. truncatula* aux LCOs

Les lignées *DR5:VENUS-N7* et *DR5:GUS* ont été obtenues dans le fond génétique 2HA de *M. truncatula* (Rose et al., 1999). Celle-ci est dérivée de la lignée Jemalong A17, un génotype généralement utilisé par la communauté scientifique, mais elle a été rendue plus sensible aux hormones par plusieurs cycles de régénération, afin de faciliter l'obtention de plantes entières à partir de cals. Par conséquent, avant de me servir des lignées transformées pour étudier l'effet des LCOs sur les RL, j'ai d'abord vérifié que la lignée 2HA de *M. truncatula* répondait de la même manière aux LCOs que la lignée A17.

Lorsque l'on fait pousser des plantules de chacune des deux lignées sur un milieu M solide, contenant ou non des facteurs Nod à une concentration de 10^{-8} M, on peut constater que le profil d'apparition des RL au cours du temps diffère entre les deux lignées : la lignée A17 présente une stimulation plus rapide du nombre de RL que 2HA en réponse aux facteurs Nod (Figure 4.4). De plus, en condition contrôle, A17 a globalement plus de RL émergées à 4 ou 5 jours. Toutefois, à la fin de la cinétique (10-12 jours), les deux lignées ont le même nombre de RL émergées (environ 4 RL). Il paraît donc y avoir un décalage temporel de formation des RL entre les 2 lignées, la lignée 2HA présentant un retard par rapport à A17.

Par conséquent, j'ai adapté la fenêtre d'observation des RL utilisée pour calculer l'induction des RL, en décalant celle de 2HA à la fenêtre 6-10 jours, comparé à 4-8 jours pour A17 (Figure 4.4). De cette façon, en ajoutant les facteurs Nod au milieu M et en calculant l'induction des RL chez A17 et 2HA grâce à ces fenêtres, j'ai pu obtenir des résultats similaires de stimulation des RL pour les deux lignées.

1.3. Réponse de la racine primaire aux LCOs

Pour évaluer la ramification racinaire, nous nous sommes placés dans le cadre des travaux déjà réalisés sur *M. truncatula* (Maillet et al., 2011; Olàh et al., 2005), et qui ne tiennent compte que du nombre de racines latérales, et non de l'ensemble de l'architecture racinaire. Afin de normaliser nos mesures par rapport à l'architecture globale de la racine, nous avons étudié l'action des LCOs sur la longueur de la racine primaire de jeunes plantules, dans les différentes conditions utilisées.

En mesurant la racine primaire de plantules traitées avec des facteurs Nod ou des Myc-LCOs à l'aide d'un traitement classique (molécules incorporées dans le milieu), même à forte concentration (10^{-7} M), je n'ai pas mis en évidence de différence significative de longueur (pas montré). Dans nos conditions, les LCOs n'ont donc pas d'effet sur la croissance de la racine primaire.

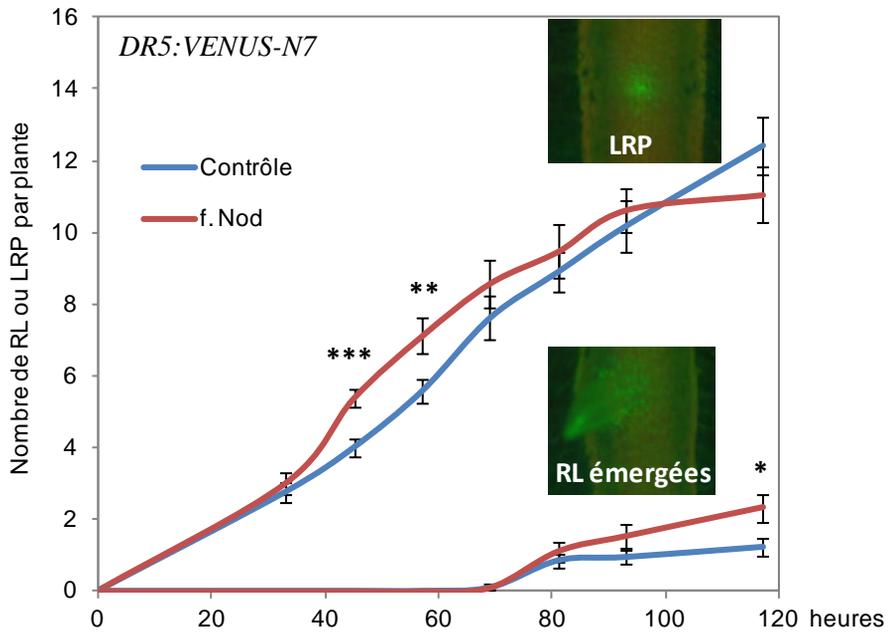


Figure 4.5 • Cinétique d'apparition des primordia de RL (LRP) et des RL émergées

Des plantes *DR5:VENUS-N7* ont été disposées sur milieu M dans les conditions classiques, avec ou sans facteurs Nod à une concentration de 10^{-8} M. Le nombre de LRP a été déterminée grâce aux spots *DR5:VENUS N7*, et les RL émergées ont été comptées visuellement au long d'une cinétique précoce de 24 à 120 heures.

Ces résultats représentent une expérience sur 50 plantes. Les barres d'erreur représentent le SEM. Les données ont été analysées par des ANOVA (** = p -value < 0,01 ; *** = p -value < 0,001).

2. Les facteurs Nod agissent sur les étapes précoces de la formation des RL

Au début du projet de thèse, notre objectif était de caractériser les effets des deux principaux types de LCOs impliqués dans les interactions symbiotiques avec *Medicago truncatula*, à savoir les facteurs Nod produits par son rhizobium symbionte *Sinorhizobium meliloti*, et les Myc-LCOs produits par le champignon mycorhizien *Rhizophagus irregularis*. Toutefois, des complications au cours des mises au point, ainsi que la faible disponibilité des Myc-LCOs, ces derniers étant des molécules de synthèses produites par un autre laboratoire, ont occasionné des retards dans l'analyse des effets des Myc-LCOs. Par ailleurs, les facteurs Nod présentent la particularité d'avoir un autre rôle développemental démontré sur la formation du nodule racinaire. Pour ces raisons, je me suis particulièrement focalisé sur les facteurs Nod de *Sinorhizobium meliloti* lors de ma thèse.

2.1. Effet des facteurs Nod sur l'apparition et l'émergence des primordia de RL

Les travaux ayant permis de mettre en évidence la stimulation de la formation des RL par les LCOs ont été réalisés en observant le nombre de RL émergées. Par conséquent, cette stimulation peut avoir différentes origines: par une action précoce, les facteurs symbiotiques pourraient induire l'initiation de nouveaux primordia de RL ; ou par une action plus tardive, ils pourraient stimuler le développement et/ou l'émergence de primordia déjà existants.

2.1.a. Cinétique de formation des RL

La formation des primordia de RL en réponse aux facteurs Nod a été suivie précisément (toutes les 12h) sur des plantules *DR5:VENUS-N7* en incorporant des facteurs Nod à 10^{-8} M dans le milieu de culture. L'apparition des primordia de RL (LRP) a été mise en évidence par l'apparition des spots de fluorescence VENUS, tandis que les racines émergées ont été comptées sur les mêmes plantes tout au long de la cinétique.

Sur la figure 4.5, on peut constater que les premiers effets des facteurs Nod sont visibles dès 45h avec une augmentation significative du nombre de LRP présents, en se référant au nombre de spot VENUS. Les premières émergences de racines latérales ont lieu au bout de 80h, et l'augmentation du nombre de RL émergées en réponse aux facteurs Nod est visible après environ 120h. Par conséquent, la stimulation est visible sur le nombre de LRP avant que l'émergence n'ait lieu, et même bien avant, étant donné que le nombre de LRP est plus important en présence de facteurs Nod 15h avant toute émergence de RL.

Cela soutient donc l'hypothèse selon laquelle les facteurs Nod agissent de façon précoce sur le nombre de primordia de RL. Toutefois, cela n'empêche pas que les facteurs Nod puissent également agir sur l'émergence.

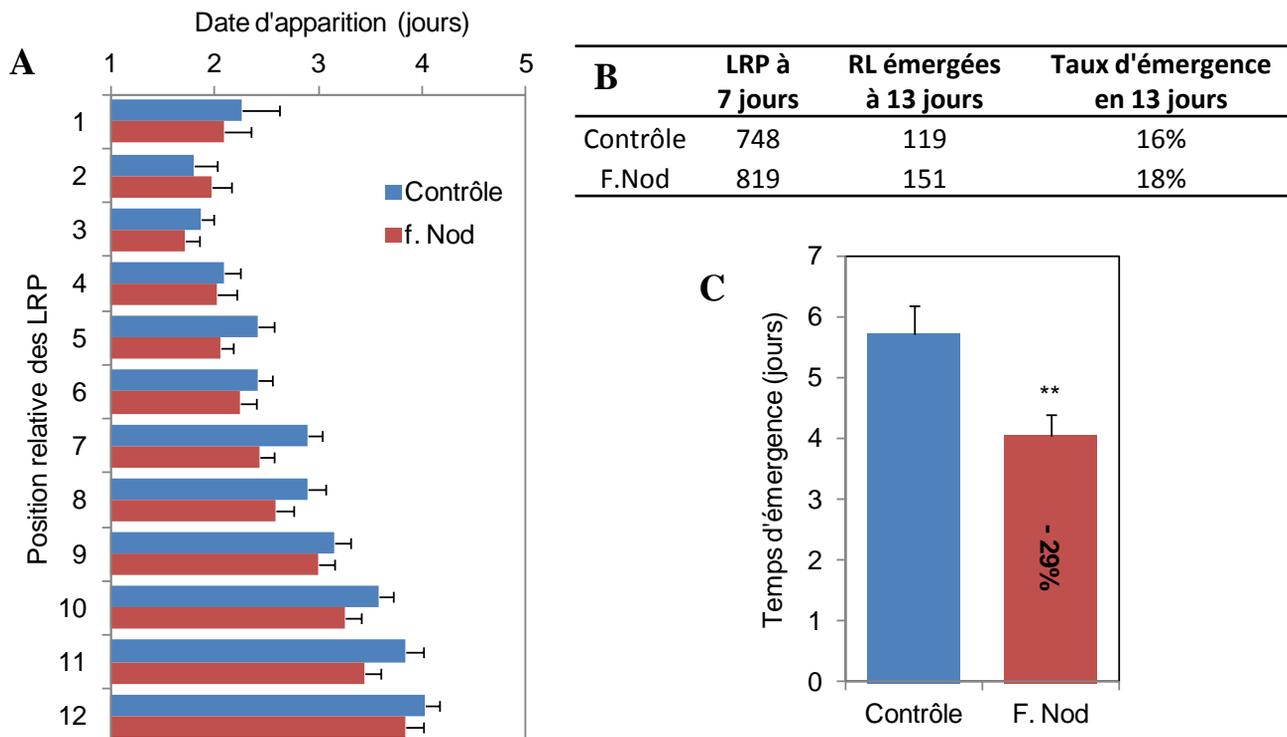


Figure 4.6 • Apparition et émergence des LRP en réponse aux facteurs Nod

Des plantes *DR5:VENUS-N7* ont été disposées sur milieu M avec ou sans facteurs Nod à une concentration de 10^{-8} M. L'apparition des LRP a été déterminée grâce aux spots *DR5:VENUS N7*, et l'émergence de ces LRP a été suivie visuellement.

(A) Date moyenne d'apparition des LRP sur une période de 7 jours après germination, en fonction de la position relative des LRP le long de la racine principale (cf. Figure 3.5 B), et du traitement. Les barres présentent le SEM.

(B) Taux d'émergence des LRP présents à 7 jours, sur une période de 13 jours après germination, en fonction du traitement. Le nombre total de LRP est compté à 7 jours sur 50 plantes par traitement. A 13 jours le nombre de LRP ayant émergé sur le pool présent à 7 jours est compté, afin de déterminer ce pourcentage. L'absence de différence entre les deux proportions a été vérifiée par un test de χ^2 .

(C) Temps moyen entre date d'apparition et date d'émergence, en fonction du traitement. Le pourcentage de réduction par rapport au contrôle est indiqué sur la colonne. Les barres présentent le SEM, le test statistique est une ANOVA (**= p -value < 0,01).

2.1.b. Apparition et émergence des primordia de RL

Pour préciser l'effet des facteurs Nod sur l'apparition des LRP et leur émergence, je me suis servi de plantes *DR5:VENUS-N7* cultivées sur un milieu contenant des facteurs Nod à 10^{-8} M. En me basant sur l'apparition et le suivi des spots de fluorescence VENUS, j'ai évalué le moment d'apparition, et le nombre de jours nécessaires à l'émergence des LRP. L'expérience a été réalisée au cours d'une cinétique de 13 jours. L'apparition des LRP a été évaluée de 0 à 7 jours, puis ces LRP ont été annotés en fonction de leur position relative le long de la racine primaire à 7 jours. L'émergence des LRP a été évaluée de 0 à 13 jours, suivant ces mêmes positions. La figure 4.6 décrit les résultats obtenus.

En comparant des plantes en contact avec les facteurs Nod à des plantes non traitées, j'ai constaté que dans l'ensemble, les facteurs Nod permettaient une apparition plus précoce des LRP (Figure 4.6 A), avec des dates d'apparition globalement plus tardives chez les plantes en condition contrôle (barres bleues) comparé aux plantes en présence de facteurs Nod (barres rouges). Ceci est cohérent avec les résultats précédents suggérant que l'action des facteurs Nod se déroule dans les 45h heures après dépôt de la plante sur milieu additionné de facteurs Nod.

Le taux d'émergence après 13 jours était de 18% en réponse aux facteurs Nod et de 16% chez les plantes non traitées (Figure 4.6 B). Cette différence n'est pas significative selon le test de χ^2 (p -value = 0.186), il ne semble donc pas y avoir de différence de taux d'émergence en réponse aux facteurs Nod. Par contre, j'ai observé que le temps entre apparition et émergence (temps d'émergence) était réduit de 29 % en réponse aux facteurs Nod (Figure 4.6 C). Au vu de ce résultat, on peut proposer que les facteurs Nod accélèrent les étapes antérieures à l'émergence des LRP.

Par la suite, nous allons donc nous focaliser sur les étapes précoces de formation des RL, à l'aide du marqueur *DR5:GUS*.

2.2. Etude des stades pré-émergents en réponse aux facteurs Nod

Étant donné que nous souhaitons nous focaliser sur les stades précoces de formation des RL, nous avons choisi d'utiliser les applications locales de LCOs pour la suite des expériences. Des cubes contenant des facteurs Nod ont été appliqués sur des plantules *DR5:GUS* âgées d'un jour, comparées à des plantules sur lesquelles a été appliqué un cube contrôle contenant le solvant des facteurs Nod (Figure 4.7 A). Les LRP ont été dénombrés sur l'ensemble de la racine, grâce à l'observation des spots de coloration GUS, 1 à 4 jours après dépôt du cube. Comme l'indique la figure 4.7 B, les cubes de facteurs Nod sont actifs sur la formation des LRP sur l'ensemble de la racine principale, à 1 et 2 jours après contact avec le cube.

En fonction du profil et de l'intensité d'expression du marqueur *DR5:GUS*, j'ai pu décomposer la formation des RL en 3 stades distincts, appelés « précoce » ou stade 1, « intermédiaire » ou stade 2, et

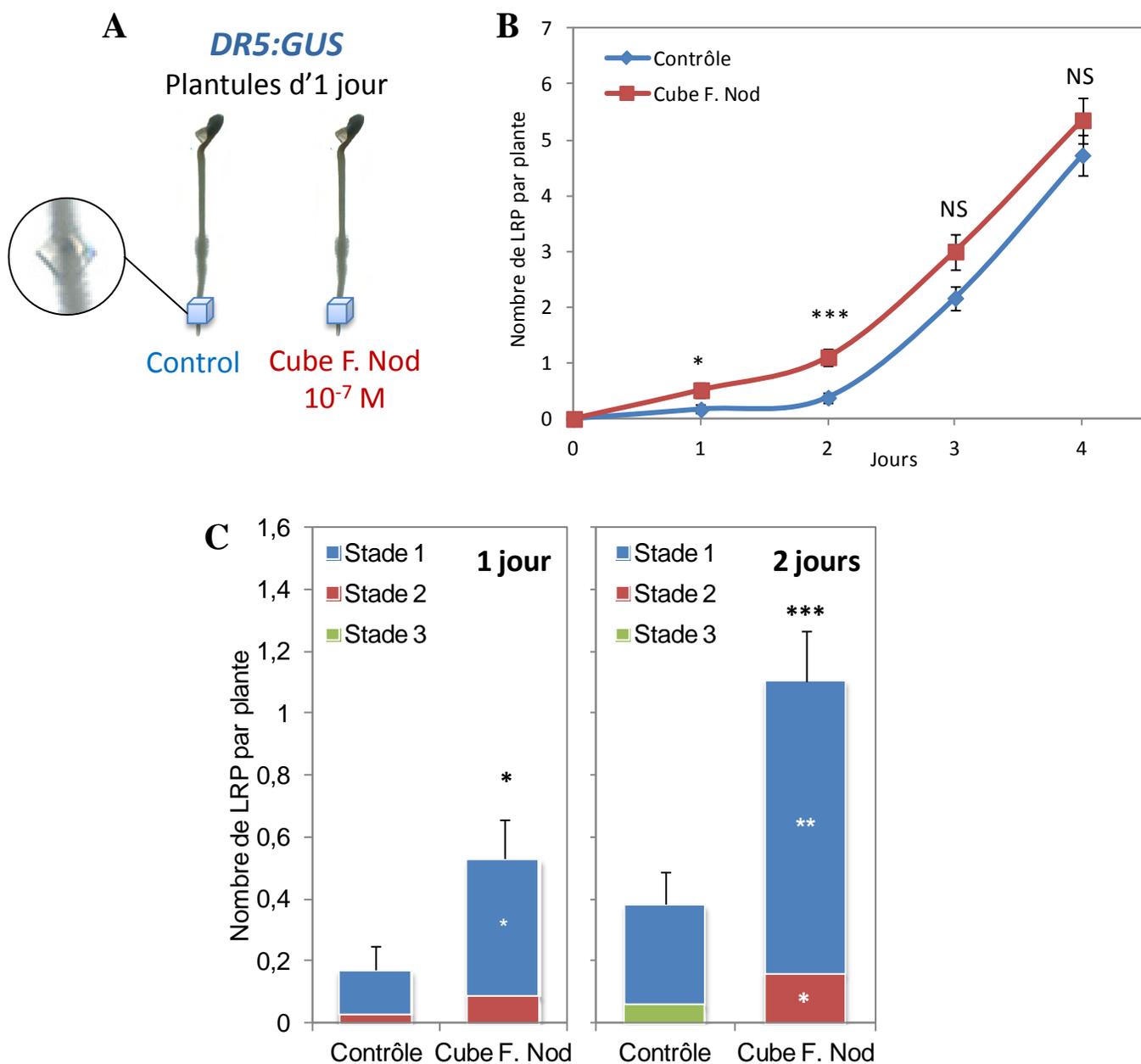


Figure 4.7 • Effet d'une application locale précoce de facteurs Nod sur la répartition des stades de développement de la RL chez des plantes *DR5:GUS*

(A) Application locale d'un cube d'agarose 2% sur la zone de sensibilité aux facteurs Nod (3-5 mm de l'apex) de plantules d'un jour après germination. L'expérience a été réalisée sur des plantes 2HA *DR5:GUS* (lignée H20). (B) Les racines de ces plantules (40 par traitement et par jour) ont été prélevées, colorées pour l'activité GUS et observées au microscope. Pour chaque jour, le nombre de LRP a été compté. Après 1 et 2 jours de traitement, les facteurs Nod induisent un enrichissement global. (C) En détaillant les stades de formation des LRP présents à 1 et 2 jours sur la même expérience, à l'aide du profil *DR5:GUS*, on constate que les LRP sont majoritairement au stade 1. Ces résultats représentent une expérience sur 40 plantes. Les barres d'erreur représentent le SEM. Les données ont été analysées par des ANOVA (NS = non-significatif ; * = p -value < 0,05 ; ** = p -value < 0,01 ; *** = p -value < 0,001).

« pré-émergent » ou stade 3 (cf. Figure 3.2, partie A), ce qui m'a permis de détailler l'état développemental des LRP présents en réponse au facteurs Nod.

J'ai ainsi constaté que les LRP présents à 1 ou 2 jours après dépôt des cubes étaient majoritairement des stades 1 (figure 4.7 C), et donc que les facteurs Nod stimulent l'apparition de ce stade, donc agissent de façon précoce. On peut formuler l'hypothèse que les facteurs Nod permettent la formation d'un nombre supplémentaire de LRP précoces. Toutefois, il est possible également que les facteurs Nod se comportent comme un accélérateur de formation de LRP précoces, en agissant sur les étapes antérieures aux premières divisions. Dans ce cas, les facteurs Nod raccourciraient le temps entre la spécification des cellules fondatrices de la RL et l'apparition des premières divisions et agiraient sur une fenêtre temporelle antérieure aux premières divisions.

Afin d'aborder cette question, il faudrait avoir une meilleure précision d'observation de nos marqueurs, pour mettre en évidence l'étape de spécification des cellules fondatrices. Ceci pourrait être fait, par analogie avec *A. thaliana*, en localisant les impulsions d'auxine grâce à l'activité cyclique de *DR5:GUS* au niveau du xylème ou du péricycle, et en comparant cette étape avec ou sans facteurs Nod. Avec cette méthode d'observation des étapes précoces, il serait intéressant de tester l'effet d'une application locale de facteurs Nod sur une zone plus proche de l'apex, afin de déterminer si la zone de spécification des cellules fondatrices est modifiée (plus précoce) en réponse aux facteurs Nod.

2.3. Effet de l'application locale de facteur Nod sur la zone néoformée de la racine

Comme l'application locale de facteurs Nod permet de situer exactement où ont été déposés les facteurs Nod, nous avons dénombré les LRP après 48h de traitement grâce aux spots *DR5:GUS*, en séparant ceux apparus au niveau du cube (zone c, cube \pm 2 mm), en amont du cube (zone a, partie vieille) et en aval du cube (zone b) (Figure 4.8 A). Après 48h de traitement, nous avons constaté que les facteurs Nod étaient actifs sur la zone en aval du traitement (Figure 4.8 B).

Cela nous renseigne sur le fait que les facteurs Nod agissent bien sur une zone préférentielle dans la partie jeune de la racine principale, et que cette zone se décalant au fur et à mesure de la croissance de la plantule, a continué à être stimulée. Il y a pour cela plusieurs explications : soit les facteurs Nod ont diffusé dans le milieu au cours de l'expérience, et étaient toujours disponibles dans la zone jeune, soit les facteurs Nod ont induit une modification globale de la capacité à former des RL. Par ailleurs, il est possible aussi que les facteurs Nod puissent avoir diffusé par les poils racinaires (par exemple par les gouttelettes d'eau formées sur les poils), même si l'application locale de facteurs Nod induit l'activation locale du promoteur *pENOD11* (cf. Figure 4.3 C).

Nous avons vérifié la diffusion des facteurs Nod par le milieu, en appliquant des fines couches de parafilm entre le milieu de culture et le cube d'agarose, tout en maintenant le contact entre le cube et la racine. Nous avons obtenu le même type de résultat que sans parafilm, avec une stimulation de l'initiation des RL dans la zone jeune (zone b) après traitement (Figure 4.8 C).

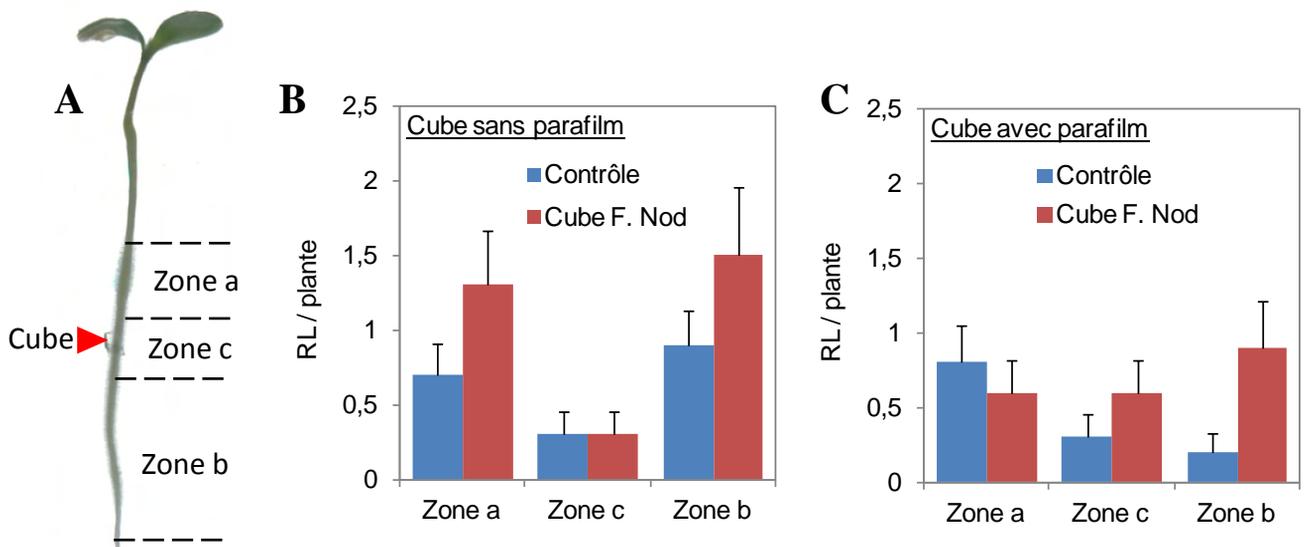


Figure 4.8 • Test de l'étanchéité d'une application locale précoce de facteurs Nod sur la position des LRP au long de la racine primaire

Application locale d'un cube d'agarose 2% sur la zone de sensibilité aux facteurs Nod (3-5 mm de l'apex) de plantules d'un jour après germination, puis prélevées à 48 h (10 plantules par traitement), colorées pour l'activité GUS et observées au microscope. L'expérience a été réalisée sur des plantes 2HA *DR5::GUS* (lignée H20).

(B) Sur ces racines, le nombre de LRP a été compté, en tenant compte de la position des LRP : en amont du cube (zone a), au niveau du cube, à ± 2 mm (zone c) ou en aval du cube (zone b) (cf. schéma A)

(C) La même expérience a été réalisée en introduisant un feuillet de parafilm entre le cube et la surface du milieu M. Les données n'étaient pas suffisantes pour faire des statistiques, mais la tendance montre que les facteurs Nod sont également actifs sur la zone b (en aval du cube), c'est-à-dire sur la partie jeune, malgré l'étanchéité fournie par le parafilm.

Il est donc possible que les facteurs Nod agissent également de façon globale sur l'ensemble de la racine, même s'ils ne sont appliqués que localement. Toutefois, cette expérience n'a pas été répétée, et il sera nécessaire de compléter ces résultats avant d'en tirer des conclusions. De plus, il reste à vérifier si les facteurs Nod ne diffusent pas par les poils racinaires.

2.4. Etude des effets cellulaires des facteurs Nod sur les primordia racinaires

Comme les facteurs Nod agissent très tôt au cours du développement des RL, et sachant que les facteurs Nod participent également à la formation du nodule, nous nous sommes demandés si les LRP formés en réponse aux facteurs Nod présentaient des différences au niveau cellulaire avec les LRP formés sans eux, ou bien des ressemblances avec le primordium de nodosité.

Pour répondre à cette question, j'ai effectué des applications locales de facteurs Nod à l'aide de cube d'agarose disposés sur la racine primaire dans la zone de réponse aux facteurs Nod, et prélevé les zones racinaires sous le cube de traitement, de même que sur des plantes témoin. Les prélèvements ont été réalisés à 24h pour obtenir des stades précoces synchronisés. J'ai réalisé des coupes histologiques dans ces zones.

L'observation au microscope de ces coupes (15 LRP ont été observés) n'a pas permis de mettre en évidence les différences cellulaires entre les LRP traités aux facteurs Nod et les LRP non-traités (pas montré). Bien que nous nous sommes placés à 24h et que le traitement a été synchronisé par l'application locale, les LRP que j'ai observés n'étaient pas tous au même stade, et cela au sein d'un même traitement. De ce fait, nous ne pouvons pas conclure sur la possibilité que les facteurs Nod aient agi sur une accélération des divisions, ou sur un type de couche cellulaire, pour augmenter le nombre de RL. Ce travail devra donc être poursuivi sur plus de matériel, en essayant aussi à d'autres stades de développement, notamment des temps plus précoces (5-10h), et en améliorant la synchronisation des LRP (*cf.* Résultats, partie C).

3. Conclusions

Dans cette partie, nous avons analysé de façon spatio-temporelle comment les facteurs Nod agissent sur la formation des racines latérales chez *Medicago truncatula*.

À l'aide des marqueurs de réponse à l'auxine, et d'applications globales et locales de facteurs Nod, nous avons mis en évidence qu'une zone sensible aux facteurs Nod correspondait à la zone d'initiation des LRP, proche de l'apex. De plus, nous avons montré que les facteurs agissaient sur les stades précoces de formation des RL, et cet effet était visible sur le nombre de primordia de RL après environ 45h de contact. Nos résultats suggèrent aussi que les facteurs Nod n'agissent pas sur l'émergence. Nous n'avons pas mis en évidence d'effet cellulaire des facteurs Nod sur les primordia en stade précoce, mais ces études restent préliminaires.

Les facteurs Nod agissent donc très tôt au cours de la formation des RL, et stimulent l'apparition de plus de LRP en créant de nouveaux sites d'initiation, ou en accélérant le processus d'initiation. Les outils que nous avons utilisés ne permettent pas de donner le moment exact d'action des facteurs Nod au cours des étapes précédant l'initiation. Pour ce faire, d'autres outils devront être mis en œuvre afin de répondre à cette question, comme par exemple des marqueurs dynamiques plus précoces et sensibles que le promoteur DR5 (comme par exemple *DII:VENUS*, cf. Discussion). En outre, d'autres techniques d'applications locales de LCOs pourront y être associées, telles que la micro-injection ou l'application de billes (Mathesius et al., 1998). Toutefois, nous avons très finement resserré la fenêtre temporelle et spatiale d'action des facteurs Nod.

Partie C Interactions entre les lipo-chitooligosaccharides et les voies hormonales

Les phytohormones, des molécules végétales endogènes influant sur la plante, sont les acteurs clé des programmes développementaux. Les travaux impliquant les phytohormones dans le développement de la racine sont nombreux (*cf.* Introduction, partie B). Par ailleurs, chez *Medicago truncatula*, ces molécules sont indispensables à la formation et à la régulation de la nodosité symbiotique, et leur influence sur ces deux types d'organes racinaires (RL et nodosité) peut être différente. Ces éléments tendent à soutenir l'hypothèse selon laquelle l'effet des lipo-chitooligosaccharides (LCOs) d'origine symbiotique sur la formation des racines latérales chez *M. truncatula* impliquerait les voies hormonales, et donc que les LCOs pourraient interagir avec les voies hormonales.

Dans cette partie sont présentés les résultats des expériences visant à comprendre les interactions que peuvent avoir les LCOs avec les voies hormonales chez *M. truncatula*. Nous avons utilisé différentes stratégies afin de répondre à cette question : une approche pharmacologique, pour mettre en évidence des effets d'interactions entre LCOs et hormones ; une approche génétique basée sur l'étude de mutants liés aux hormones ; et une approche transcriptomique visant à trouver sans *a priori* des régulateurs clé des racines latérales en réponse aux LCOs et à l'auxine.

1. Approche pharmacologique

Cette approche est basée sur des traitements combinés de LCOs et d'hormones en milieu solide. Nous présentons ici uniquement les résultats obtenus avec deux hormones : l'auxine et l'éthylène. En premier lieu est décrite la sensibilité des plantes de *M. truncatula* à l'auxine.

1.1. Sensibilité à l'auxine des lignées A17 et 2HA

En premier lieu, il était nécessaire de connaître les doses d'auxine permettant de stimuler la formation des RL dans nos conditions, sur les deux génotypes de *M. truncatula* utilisés, A17 et 2HA. En effet, le génotype 2HA peut présenter une sensibilité modifiée à l'auxine, ayant été sélectionnée justement sur des critères hormonaux. Pour analyser la réponse à l'auxine de la lignée 2HA, j'ai effectué des traitements de plantules A17 et 2HA, en incorporant différentes doses d'ANA (analogue de l'auxine) au milieu de culture, puis j'ai évalué la stimulation de la formation des RL. En effet, l'auxine a un effet positif sur le développement des RL chez *A. thaliana* et beaucoup de légumineuses (Mathesius, 2008; Overvoorde et al., 2010).

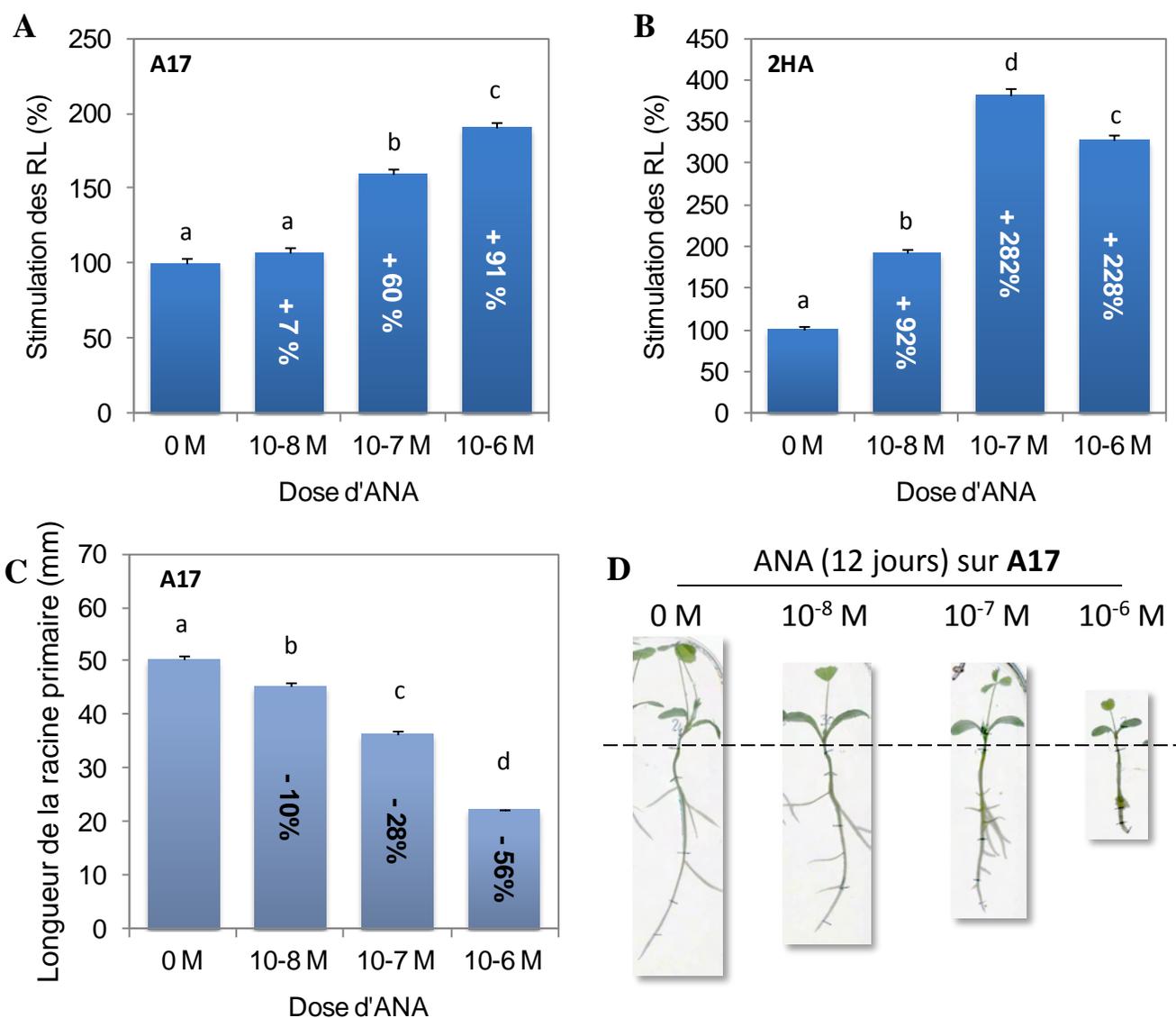


Figure 5.1 • Influence de l'auxine (ANA) sur la ramification racinaire et la racine primaire chez les lignées A17 et 2HA de *M. truncatula*

Des plantules de *M. truncatula* A17 et 2HA ont été déposées dans les conditions classiques sur des milieux contenant différentes doses d'ANA.

(A et B) Effet des doses d'ANA sur la formation des racine latérales chez les lignées A17 (A) et 2HA (B)

(C et D) Effet des doses d'ANA sur la longueur de la racine principale chez la lignée A17. (C) présente les données de mesures de la taille de la racine primaire, montrant une forte réduction de longueur à forte dose d'ANA, et celle-ci est drastique sur le développement de la plante, comme il peut être observé sur des photos (D).

Les résultats présentés en (A-C) sont issus de deux expériences indépendantes pour chaque test. Les RL ont été comptées 5 jours d'affilée. Les données répétées ont été compilées afin d'obtenir le pourcentage de stimulation sur 5 jours. Le pourcentage supplémentaire par rapport au contrôle est indiqué sur les colonnes. Les barres représentent le SEM. Les données ont été testées par GLM (a, b, c, d représentent les groupes homogènes indépendants).

La figure 5.1 A et B montre les résultats de ce test dose-réponse à l'ANA, sur les lignées A17 et 2HA. On peut constater qu'une concentration d'auxine faible (10^{-8} M) est suffisante pour stimuler de 92% le nombre de RL chez la lignée 2HA, alors qu'A17 est peu sensible à cette concentration. Il faut augmenter la dose d'ANA à 10^{-7} M chez la lignée A17 pour parvenir à une stimulation de 60%. De plus, chez 2HA, on observe une saturation de l'effet de l'auxine à haute concentration (10^{-6} M).

Il a paru évident, en observant les plantes de la lignée A17, que l'ANA agit sur la longueur de la racine primaire (Figure 5.1 C et D) ; cette action devenant drastique à 10^{-6} M. L'ana agissait également sur la longueur de la racine primaire chez la lignée 2HA (pas montré).

Il semblait nécessaire de quantifier cette inhibition de la croissance de la racine primaire chez A17, afin d'en tenir compte dans le dénombrement des RL. J'ai donc mesuré la longueur des racines primaires de plantes A17 au cours d'une cinétique, à l'aide de scans réguliers des boîtes de culture des plantes, et du logiciel ImageJ. La longueur de la racine primaire est 10% plus petite à une dose de 10^{-8} M d'ANA, et se trouve drastiquement réduite d'un quart à 10^{-7} M, et de plus de la moitié à 10^{-6} M (Figure 5.1 C).

Au vu de ce résultat, la longueur de la racine primaire a été prise en compte dans l'analyse de la ramification lors des expériences en présence d'ANA, en calculant la densité racinaire en RL/cm (chez les deux lignées, A17 et 2HA).

1.2. Les facteurs Nod interagissent avec l'auxine

Dans un premier temps, nous avons souhaité étudier l'interaction entre les facteurs Nod et l'auxine. Afin de tester l'auxine, nous avons utilisé un de ses analogues, l'ANA (Acide Naphtalène Acétique), qui possède des propriétés de perméance, ce qui lui permet d'agir sur les cellules végétales sans avoir besoin d'un transporteur. Des plantules germées de *M. truncatula* A17 ont été disposées sur des milieux M contenant soit des facteurs Nod (10^{-8} M), soit de l'ANA à différentes doses (10^{-8} , 10^{-7} et 10^{-6} M), soit un mélange des deux aux mêmes concentrations, soit aucun des deux (contrôle), comme le montre la figure 5.2. J'ai donc réparti les plantes sur 8 milieux différents (les quatre concentrations d'auxine, avec ou sans facteurs Nod). Les racines latérales ont été dénombrées, et la longueur de la racine latérale a été mesurée, de 4 à 8 jours après transfert des plantules sur les milieux. En raison de la quantité de données recueillies lors de cette expérience, il n'était pas possible de réaliser un GLM sur l'ensemble de ces données. Je me suis donc contentée d'étudier l'effet des molécules à 4 jours après transfert des plantules, ce jour étant représentatif de l'ensemble de la cinétique chez A17 (cf. Figure 4.4).

1.2.a. Effet sur la formation des RL

Après 4 jours, les facteurs Nod provoquent une stimulation des RL de 76% par rapport au contrôle, et l'ANA à 10^{-8} M stimule la formation des RL de 37% (Figure 5.2 A). Lorsque les deux molécules sont présentes dans le milieu, j'ai constaté que la stimulation était bien plus importante que l'addition des effets des molécules indépendantes ($76 + 37 = 113\%$), avec une stimulation de 165%. Les facteurs Nod

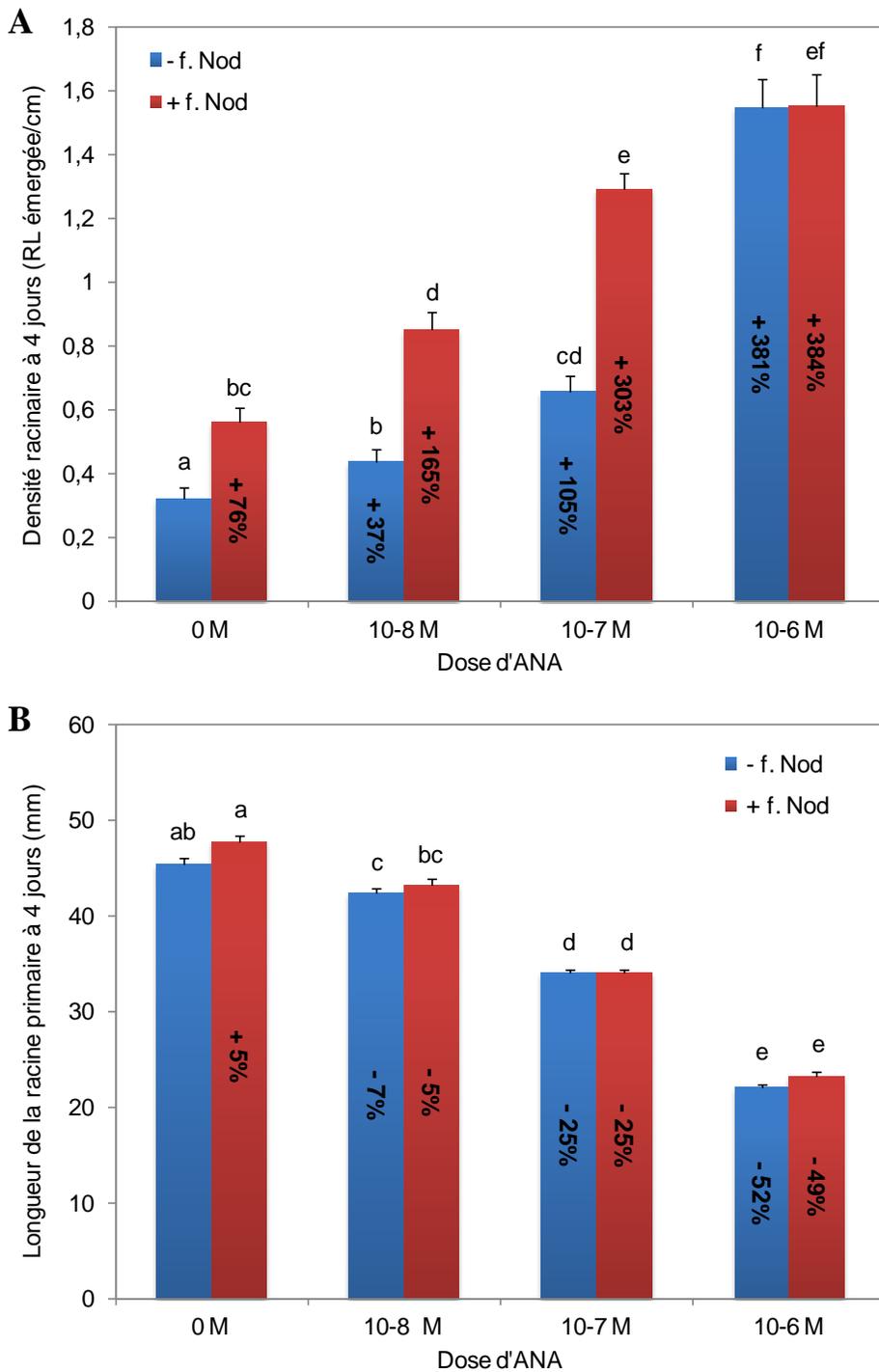


Figure 5.2 • Effets et interaction de l’auxine et des facteurs Nod sur la ramification racinaire et la racine primaire chez *M. truncatula* A17

Effet des facteurs Nod (f. Nod), de différentes doses d’ANA (0 à 10^{-6} M), et leurs interactions sur la formation des RL (A) et sur la longueur de la racine primaire (B) à 4 jours après germination et dépôt sur les différents milieux dans les conditions classiques. Ces résultats sont représentatifs de 2 expériences indépendantes sur 50 plantes chacune. Le pourcentage supplémentaire par rapport au contrôle est indiqué sur les colonnes. Les barres représentent le SEM. Les données ont été testées par GLM (a, b, c, d, e, f représentent les groupes homogènes indépendants).

additionnés à l'auxine, permettent une meilleure stimulation des RL que l'aurait fait l'auxine ou les facteurs Nod seuls, ce qui suggère une action synergique entre ces deux molécules. Cette synergie est visible à concentration faible d'auxine (10^{-8} M), et aussi particulièrement à 10^{-7} M, avec une stimulation combinée de 303%, alors que l'auxine seule stimule la formation des RL de 105% seulement. En revanche, cet effet synergique a totalement disparu en interaction avec une concentration plus forte d'ANA (10^{-6} M), indiquant que la synergie devient limitée par des doses saturantes d'ANA. Ceci s'explique par l'effet drastique de l'ANA à 10^{-6} M sur la racine primaire, réduisant sa longueur de plus de 50 %, et empêchant une stimulation supplémentaire par les facteurs Nod.

L'interaction synergique entre facteurs Nod et l'auxine que nous avons mis en évidence par ces expériences suggère que les facteurs Nod potentialisent l'action de l'auxine sur les RL, permettant aux facteurs Nod de stimuler la formation des RL. Ce résultat a fait l'objet d'un dépôt de brevet par le CNRS et l'INRA, et pourrait être développée en tenant compte d'autres résultats liés à la synergie entre auxine et LCOs, notamment avec les Myc-LCOs (paragraphe suivant), ainsi que les résultats attendus en analyse transcriptomique (point 3).

1.2.b. Effet sur la racine primaire

Nous avons souhaité savoir si l'interaction synergique entre facteurs Nod et ANA était également visible sur la longueur de la racine primaire. La figure 5.2 B présente les mesures de taille de la racine primaire après 4 jours sur les différents milieux ANA, F. Nod ou ANA+F. Nod. Comme présenté précédemment, la présence d'ANA dans le milieu de culture réduit la longueur de la racine. En revanche, les facteurs Nod n'ont pas induit de différence de longueur supplémentaire, quelle que soit la concentration d'ANA. Il n'y a donc pas de synergie entre les facteurs Nod et l'ANA concernant l'action sur la racine primaire. L'interaction synergique que nous observons est donc spécifique à la formation de RL.

1.3. Interaction de l'auxine et des Myc-LCOs

Comme il existe une interaction synergique entre facteurs Nod et auxine pour la formation des RL, on peut se demander si c'est également le cas avec les Myc-LCOs. J'ai testé l'interaction des Myc-LCOs avec l'ANA à 10^{-8} M. J'ai choisi cette concentration car elle permettait d'observer l'interaction entre facteurs Nod et ANA. Les Myc-LCOs ont été utilisés à la dose de 10^{-7} M, sachant qu'ils sont globalement moins actifs que les facteurs Nod, et ont été séparés en deux groupes : les Myc-LCOs sulfatés (MS) et les Myc-LCOs non-sulfatés (MNS), car ces molécules n'ont pas la même activité sur *M. truncatula*, en fonction de la présence du groupement sulfate. Les traitements ont été réalisés sur la lignée 2HA pour des raisons pratiques, car d'autres expériences sur cette lignée ont été conduites au même moment. Pour cette raison, j'ai également testé l'interaction des facteurs Nod, pour voir si les résultats sont similaires à

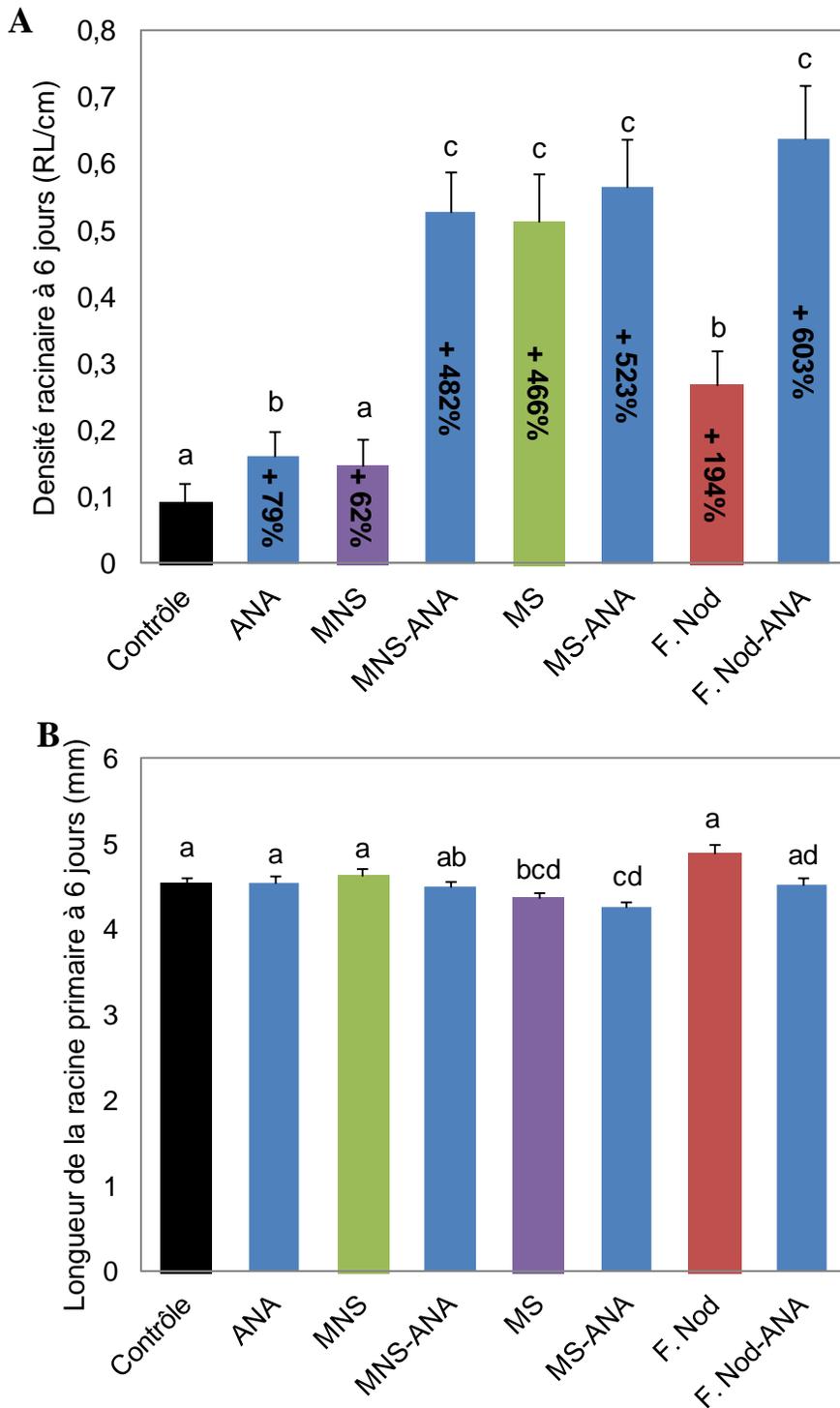


Figure 5.3 • Effets et interaction de l'auxine et des Myc-LCOs et facteurs Nod sur la ramification racinaire et la racine primaire chez *M. truncatula* 2HA

Effet des Myc-LCOs non-sulfatés (MNS) et sulfatés (MS) à 10^{-7} M, et des facteurs Nod à 10^{-8} M, de l'ANA (10^{-8} M), et leurs interactions sur la formation des RL (A) et sur la longueur de la racine primaire (B) à 6 jours après germination et dépôt sur les différents milieux dans les conditions classiques.

Ces résultats sont représentatifs de 1 expérience sur 50 plantes. Le pourcentage supplémentaire par rapport au contrôle est indiqué sur les colonnes. Les barres représentent le SEM. Les données ont été testées par GLM (a, b, c, d représentent les groupes homogènes indépendants).

ce qui a été obtenu sur A17. Le nombre de RL et la longueur de la racine primaire ont été mesurés 6 jours après dépôt des plantules sur les différents milieux.

1.3.a. Effet sur la formation des RL

En premier lieu, j'ai constaté que l'association des MNS avec l'ANA provoquait une stimulation de la formation des RL bien supérieure (482%) à la somme des effets indépendants de l'ANA (76%) et des MNS (62%), laissant penser que la seule présence, en faible concentration, de MNS a permis d'augmenter l'effet de l'auxine, et réciproquement (Figure 5.3 A). Ceci indique qu'il y a très probablement, comme pour les facteurs Nod, une interaction synergique entre ces molécules.

Ensuite, les résultats ont montré une bonne stimulation par les MS (466%), mais pas d'enrichissement supplémentaire en RL si on y ajoute l'ANA (Figure 5.3 A). Le fait que notre expérience n'ait pas mis en évidence d'interaction entre les MS et l'ANA peut s'expliquer par le fait que les MS, utilisés à 10^{-7} M, étaient sans doute en quantité trop importante, entraînant la saturation de leurs effets sur les RL. Cette expérience devra être conduite à nouveau, en essayant des conditions limitantes de MS (10^{-8} M ou moins).

Enfin, j'ai pu vérifier que l'effet synergique des facteurs Nod avec l'ANA était toujours visible chez le génotype 2HA, avec une stimulation combinée des RL de 600%, correspondant à plus de deux fois la somme des stimulations des facteurs Nod et de l'auxine séparés.

1.3.b. Effet sur la racine primaire

Comme pour les facteurs Nod, j'ai voulu tester si l'interaction entre Myc-LCOs et auxine était spécifique aux RL, en mesurant la longueur de la racine primaire 6 jours après dépôt sur les milieux de culture.

En premier lieu, on peut constater que chez la lignée 2HA la taille de la racine primaire est moins affectée par l'ANA que chez la lignée A17 (Figure 5.3 B comparée à la figure 5.2 B). En association avec les MNS, l'ANA n'occasionne pas de changement dans la longueur de la racine primaire (Figure 5.3 B), ce qui montre que l'interaction synergique entre MNS et ANA n'est pas visible sur la racine primaire. En revanche j'ai observé une très légère diminution (significative, $p\text{-value}<0.05$, ANOVA) occasionnée par les MS sur la longueur de la racine primaire. Ceci peut être lié à un artefact de mesure car il serait étonnant que les MS réduisent la longueur de la racine primaire.

L'interaction synergique entre Myc-LCOs et auxine est donc a priori bien spécifique aux RL.

1.4. Interaction entre l'éthylène et les facteurs Nod

L'éthylène est un régulateur important dans la formation de la RL, ainsi que lors de la formation de la nodosité (Ivanchenko et al., 2008; Penmetsa and Cook, 1997). Afin de mimer l'effet de l'éthylène, qui est un gaz produit par la plante, nous avons utilisé l'un des précurseurs de sa biosynthèse, l'ACC (Acide

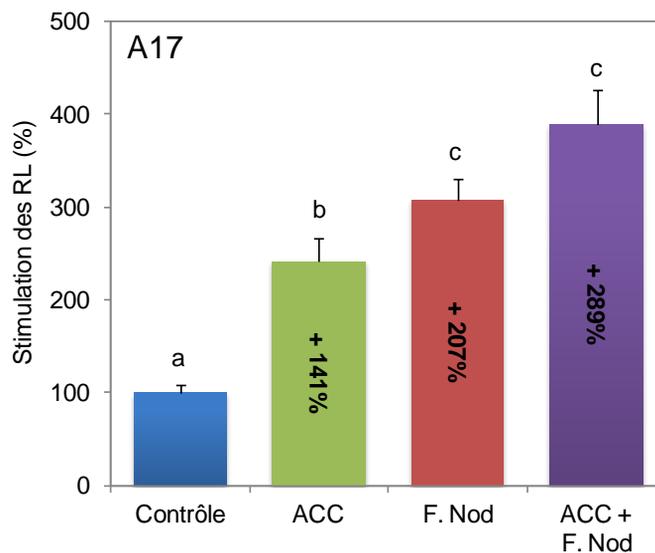


Figure 5.4 • Effets et interaction des facteurs Nod et de l'éthylène sur la ramification racinaire chez *M. truncatula* A17

Des plantules A17 ont été cultivées dans les conditions classiques sur des milieux contenant de l'ACC (précurseur de l'éthylène) à 10^{-7} M, ou des facteurs Nod à 10^{-8} M, ou un mélange des deux. Ces résultats sont issus d'une expérience réalisée sur 55 plantes par traitement. Les RL ont été comptées 5 jours d'affilée. Les données répétées ont été compilées afin d'obtenir le pourcentage de stimulation sur 5 jours. Le pourcentage supplémentaire par rapport au contrôle est indiqué sur les colonnes. Les barres représentent le SEM. Les données ont été testées par GLM (a, b, c représentent les groupes homogènes indépendants).

1-AminoCyclopropane-1-Carboxilique), que j'ai ajouté au milieu de culture à une concentration de 10^{-7} M. Cette concentration a été choisie comme étant la dose de stimulation de la formation des RL suite aux travaux de Kokoevi Agbevendou (M2R Biosciences Végétales, 2010). En effet, l'effet de l'éthylène sur le développement des RL est très dépendant de sa concentration.

Ainsi, j'ai testé l'interaction de l'ACC avec les facteurs Nod (à 10^{-8} M). Les racines latérales ont été comptées de 5 à 8 jours, et une analyse GLM a été pratiquée. Je n'ai pas observé de modification de longueur de la racine primaire en réponse à l'ACC, donc je n'ai pas tenu compte de la taille de la racine primaire dans la ramification racinaire.

Sur la période de 5 à 8 jours, l'ACC provoque une stimulation des RL de 141%, et les facteurs Nod stimulent la formation des RL de 207% (Figure 5.4). L'addition des deux molécules dans le milieu de culture permet d'observer 289% d'augmentation de la formation des RL, ce qui reste inférieur à l'addition des stimulations obtenues avec les molécules séparées ($141 + 207 = 348\%$). Il semble y avoir un petit effet additif, mais selon l'analyse statistique celui-ci n'est pas significatif (les conditions F. Nod et ACC+F. Nod appartiennent au même groupe homogène d'après le GLM). Ceci devrait être vérifié par d'autres expériences, car celle-ci n'a été réalisée qu'une fois.

L'association de l'ACC et des facteurs Nod ne permet pas d'améliorer la stimulation des RL par rapport aux molécules séparées, donc leur effet n'est pas synergique. Cela suggère que l'action des facteurs Nod sur les RL ne passe probablement peu ou pas par l'action de l'éthylène, et que ces deux molécules agissent selon des voies parallèles.

2. Approche génétique

L'approche pharmacologique permet de mettre en évidence des effets sur la plante et d'en tirer des hypothèses, mais ce type d'expérience peut induire des artefacts du fait de l'usage de molécules exogènes à des doses non-physiologiques. Par conséquent, nous avons voulu compléter cette approche par des analyses génétiques de mutants affectés dans les voies hormonales, en observant si leurs mutations affectaient également la capacité des facteurs Nod à stimuler les RL. Pour cela, nous avons utilisé le traitement classique, avec les facteurs incorporés dans le milieu.

Malheureusement, peu de mutants des voies hormonales ont été décrits chez *M. truncatula*. Nous nous sommes donc intéressés en priorité à des hormones pour lesquels un mutant était disponible chez *M. truncatula*, et bien décrit au niveau racinaire.

2.1. Mutant de la synthèse de l'éthylène : sickle

Le mutant *sickle* de *M. truncatula* a été décrit comme un mutant hyper-nodulant montrant un transport de l'auxine altéré des parties aériennes à la racine (Penmetsa and Cook, 1997; Prayitno et al., 2006b). Il est muté dans l'homologue du gène *EIN2* (*ETHYLENE INSENSITIVE 2*) d'*A. thaliana* (Bent et

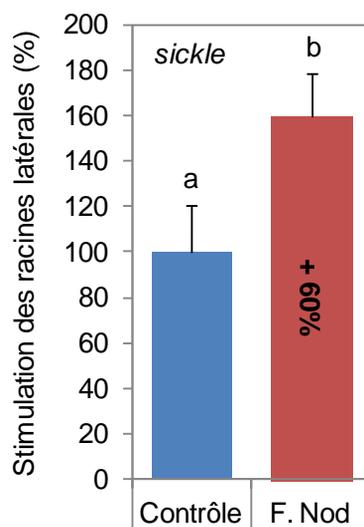


Figure 5.5 • Réponse du mutant *Mtsickle* aux facteurs Nod pour la stimulation de la formation des racines latérales

Des plantules du mutant *sickle* de *M. truncatula* (fond génétique A17) ont été cultivées dans les conditions classiques avec ou sans facteur Nod à 10^{-8} M.

Ces résultats sont issus d'une expérience réalisée sur 50 plantes par traitement. Les RL ont été comptées 4 jours d'affilée. Les données répétées ont été compilées afin d'obtenir le pourcentage de stimulation sur 4 jours. Le pourcentage supplémentaire par rapport au contrôle est indiqué sur les colonnes. Les barres représentent le SEM. Les données ont été testées par GLM (a, b représentent les groupes homogènes indépendants).

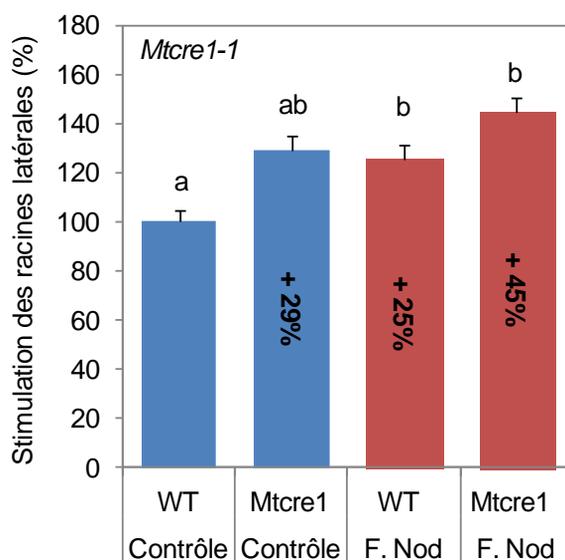


Figure 5.6 • Réponse du mutant *Mtcre1* aux facteurs Nod pour la stimulation de la formation des racines latérales

Des plantules du mutant *Mtcre1* de *M. truncatula* (fond génétique A17), ainsi que de son génotype sauvage correspondant, ont été cultivées dans les conditions classiques avec ou sans facteur Nod à 10^{-8} M.

Ces résultats sont issus d'une expérience réalisée sur 50 plantes par traitement. Les RL ont été comptées 4 jours d'affilée. Les données répétées ont été compilées afin d'obtenir le pourcentage de stimulation sur 4 jours. Le pourcentage supplémentaire par rapport au contrôle est indiqué sur les colonnes. Les barres représentent le SEM. Les données ont été testées par GLM (a, b représentent les groupes homogènes indépendants).

al., 1992) et montre une réponse altérée à l'éthylène. Le mutant *sickle* a un phénotype racinaire particulier comparé au sauvage (A17), affichant un allongement plus rapide de la racine primaire.

Nous avons voulu savoir si *sickle* est toujours sensible à l'action des facteurs Nod. Pour cela, nous avons comparé le nombre de RL chez le mutant *sickle*, avec ou sans facteurs Nod (Figure 5.5). Nous avons observé que l'effet stimulateur des facteurs Nod est toujours présent chez *sickle*, avec une stimulation de la formation des RL de 60% ($p\text{-value}>0,01$, GLM), suggérant que l'effet des facteurs Nod sur la formation des RL n'est pas affecté par la mutation de *sickle*. On peut donc supposer que l'éthylène ne joue probablement pas de rôle clé dans les mécanismes de stimulation de la formation des RL par les facteurs Nod. Ce résultat est cohérent avec notre approche pharmacologique, grâce à laquelle nous n'avons pas mis en évidence d'effet synergique entre le précurseur ACC de l'éthylène et les facteurs Nod. Nous suggérons donc que les facteurs Nod n'agissent pas sur les voies de l'éthylène pour stimuler la formation des RL.

2.2. Mutant de la réponse aux cytokinines : *Mtcre1*

Les cytokinines sont impliquées dans de nombreux processus développementaux (Vanstraelen and Benkova, 2012) et particulièrement dans le développement de la racine et de la nodosité symbiotique (Frugier et al., 2008). Elles fonctionnent en lien étroit avec l'auxine : pour de nombreux mécanismes, c'est la balance cytokinines/auxine qui est régulatrice. Chez *M. truncatula*, les mutants *Mtcre1* (Plet et al., 2011) ont été décrits comme affectés dans un récepteur aux cytokinines, *CRE1* (*CYTOKININ RECEPTOR 1*). De façon intéressante, les RL sont plus nombreuses lorsque l'expression du gène *CRE1* est réduite par RNAi/knock-down (Gonzalez-Rizzo et al., 2006), suggérant une régulation négative de la formation de la RL par les cytokinines, comme démontré chez *A. thaliana*. Par ailleurs, les cytokinines ont un effet négatif sur la formation des RL lorsqu'elles sont ajoutées au milieu de culture (Laplaze et al., 2007). Elles semblent donc être, comme l'auxine, de bons candidats pour la régulation de la formation des RL par les LCOs.

Nous avons testé l'effet des facteurs Nod sur un des mutants *Mtcre1* (*Mtcre1-1*) de *M. truncatula*. Nous avons comparé la stimulation du nombre de RL chez ce mutant à son équivalent sauvage (WT) obtenu par *back-cross*.

Sans facteurs Nod, *Mtcre1* a présenté, comme attendu, une ramification racinaire plus importante (+29%, Figure 5.6) que chez le WT. En réponse aux facteurs Nod, le WT a montré une stimulation de la formation des RL de 25%, ce qui correspond environ au nombre de RL présentes chez le mutant sans facteurs Nod. De plus, lorsque le mutant *Mtcre1* est traité aux facteurs Nod, il présente plus de racines latérales, mais cette différence n'est pas significative ($p\text{-value}<0,05$, GLM), alors que la stimulation des RL chez le WT est significative ($p\text{-value}>0,05$, GLM). Cela suggère que la réponse aux facteurs Nod est affectée chez le mutant *Mtcre1*, et donc que la bonne perception des cytokinines est tout de même importante pour la stimulation des RL par les facteurs Nod.

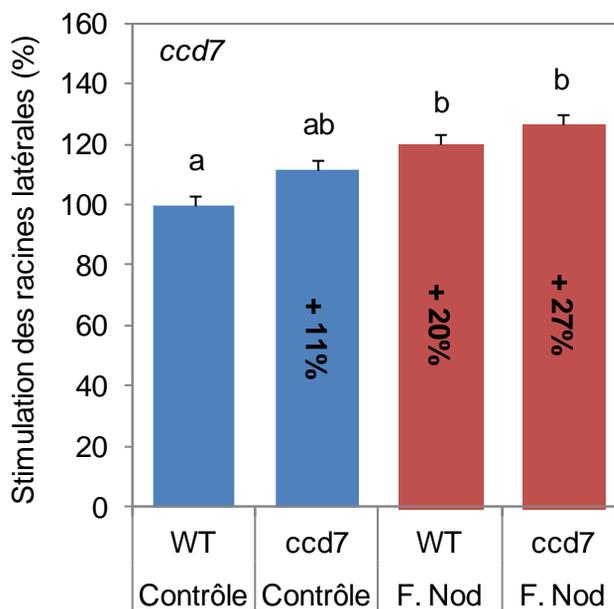


Figure 5.7 • Réponse du mutant *Mtccd7* aux facteurs Nod pour la stimulation de la formation des racines latérales

Des plantules du mutant *ccd7* de *M. truncatula* (fond génétique R108), ainsi que de son génotype sauvage correspondant, ont été cultivées dans les conditions classiques avec ou sans facteur Nod à 10^{-8} M.

Ces résultats sont issus d'une expérience réalisée sur 50 plantes par traitement. Les RL ont été comptées 4 jours d'affilée. Les données répétées ont été compilées afin d'obtenir le pourcentage de stimulation sur 4 jours. Le pourcentage supplémentaire par rapport au contrôle est indiqué sur les colonnes. Les barres représentent le SEM. Les données ont été testées par GLM (a, b représentent les groupes homogènes indépendants).

Globalement, nos résultats restent préliminaires, et il semble que le rôle des cytokinines dans la stimulation de la formation des RL soit complexe. Afin d'approfondir ces expériences, il serait intéressant de l'associer à une approche pharmacologique en utilisant des analogues de cytokinines qui sont bien perçues par CRE1 (ex. : benzylaminopurine, BAP), ou des inhibiteurs des cytokinines (ex. : 6-2-hydroxy-3-methylbenzylaminopurine, PI-55), ou encore de tester différents ratio auxine/cytokinines.

2.3. Mutant de la synthèse des strigolactones : *ccd7*

Les strigolactones sont des molécules végétales possédant plusieurs rôles dans le développement des plantes. Chez *Pisum sativum*, elles agissent comme signal systémique pour réguler la croissance des bourgeons axillaires (Gomez-Roldan et al., 2008). De plus, elles régulent la formation des racines latérales de façon différentielle selon la concentration de phosphate (Kapulnik et al., 2011; Kohlen et al., 2011). Les strigolactones ont également un rôle de signal permettant l'établissement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules, en stimulant la ramification des hyphes des champignons mycorhiziens et en activant leur métabolisme (Besserer et al., 2008; Besserer et al., 2006). Ces éléments font des strigolactones de bons candidats pour jouer un rôle dans la stimulation de la formation des RL par les facteurs Nod et Myc-LCOs.

Chez *M. truncatula*, un mutant, *ccd7*, est affecté dans le gène *CCD7*, codant pour une enzyme *carotenoid cleavage dioxygenase* (CCD) qui pourrait être impliquée dans la voie de biosynthèse des strigolactones. Afin de comprendre quel rôle peuvent jouer ces hormones dans le mécanisme de stimulation des RL par les facteurs Nod, nous avons vérifié si le mutant *ccd7* est toujours sensible aux facteurs Nod.

Nous avons constaté une légère augmentation (non-significative, $p\text{-value} < 0,05$, GLM) du nombre de racines latérales chez *ccd7* (Figure 5.7) par rapport au génotype sauvage back-crossé (WT). En réponse aux facteurs Nod, le mutant *ccd7* ne répond pas aussi bien aux facteurs Nod que le sauvage, avec un effet significatif chez le WT, mais non-significatif chez *ccd7* ($p\text{-value} > 0,05$, GLM).

Notre étude suggère que les strigolactones pourraient être impliquées dans la stimulation de la formation des RL par les facteurs Nod. En effet, nous observons que les plantes affectées dans la biosynthèse des strigolactones ont également une réponse affectée aux facteurs Nod. D'autres expériences seront nécessaires afin d'approfondir cette hypothèse, en particulier l'application de GR24 (un analogue synthétique des strigolactones) en association avec des facteurs Nod, afin de comprendre leur interaction. Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier leur interaction avec les Myc-LCOs, qui participent, comme les strigolactones, à l'échange moléculaire lors de la mise en place de la symbiose mycorhizienne à arbuscules (Besserer et al., 2008; Besserer et al., 2006; Maillet et al., 2011). Pour finir, étant donné que l'effet des strigolactones sur la formation des RL dépend de la concentration en phosphate (Perez-Torres et al., 2008), il serait important de mettre en œuvre ces études pharmacologiques en modulant la quantité de phosphate dans le milieu de culture.

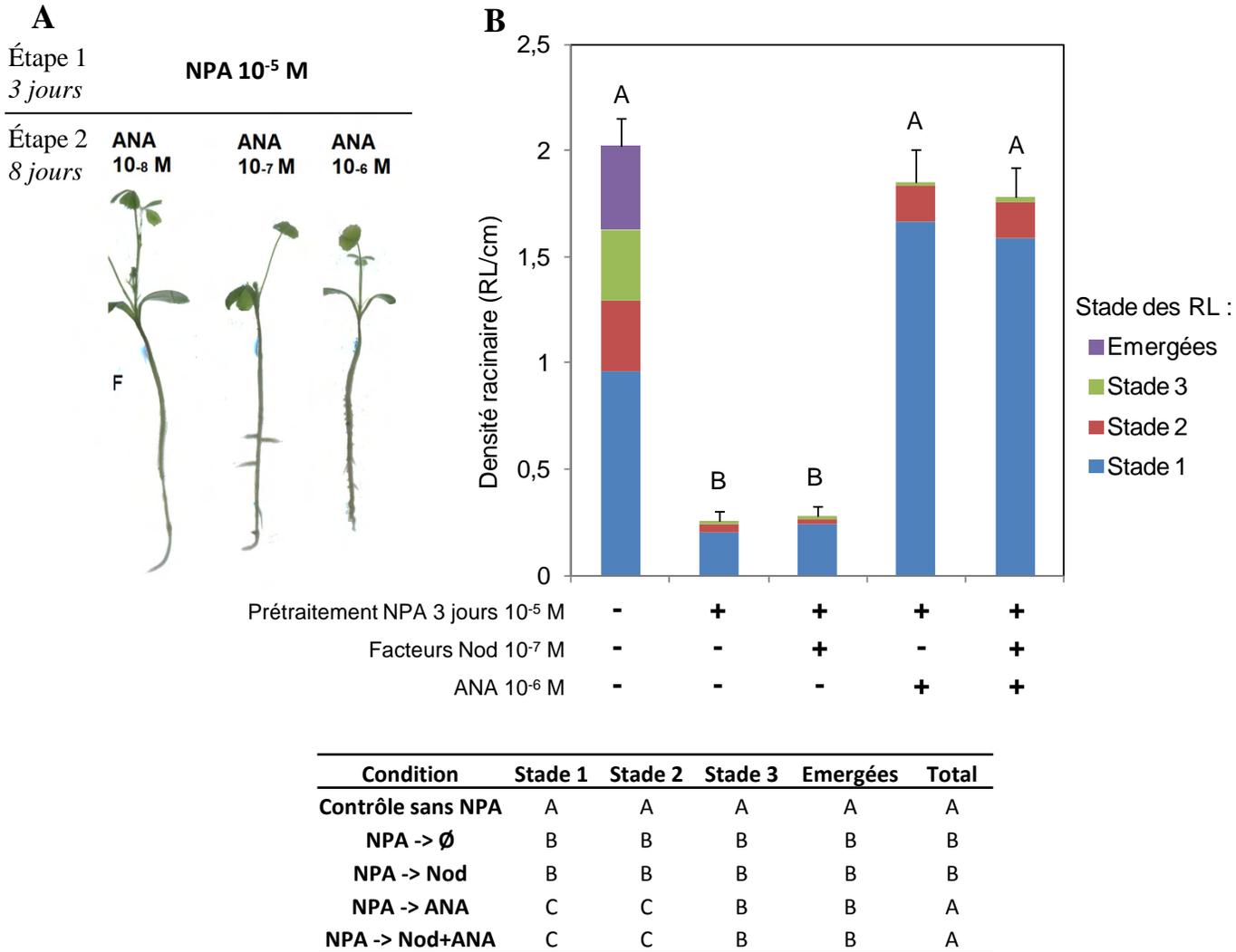


Figure 5.8 • Synchronisation de la formation des racines latérales par prétraitement au NPA

Tests de validation des expériences de synchronisation de la formation des RL par prétraitement NPA puis traitement ANA. (A) Des plantules de *M. truncatula* A17 après germination et 3 jours de croissance ont été prétraitées 3 jours sur un milieu M avec du NPA à 10^{-5} M. Puis, elles ont été transférées sur trois milieux contenant différentes doses d'ANA (10^{-8} à 10^{-6} M) pendant 8 jours, dans le but de restaurer une croissance racinaire synchronisée. (B) Des plantules *DR5:GUS* (2HA) ont été cultivées avec ou sans pré-traitement NPA, puis transférées sur un milieu de restauration, avec ou sans facteurs Nod à 10^{-7} M, et avec ou sans ANA à 10^{-6} M. Les racines ont été prélevées après 48h sur ces milieux et leur activité GUS révélée. Le nombre de RL émergées ou de LRP et leur stade a été déterminé grâce au profil *DR5:GUS*, dans chacune des conditions indiquées. Les statistiques ont été réalisées par des ANOVA. Les groupes indépendants homogènes (A, B, C) du total des RL est indiqué sur le graphique et dans le tableau ci-dessus, en détaillant les groupes obtenus pour les différents sous-ensembles (stades).

3. Approche transcriptomique

Afin d'avoir un point de vue sans *a priori* sur les mécanismes qui permettent aux LCOs de stimuler la formation des RL, nous nous sommes lancés dans un projet d'analyse transcriptomique globale, en collaboration avec la plateforme d'Evry. Nous avons choisi d'analyser le transcriptome à l'aide de puces de type NimbleGen (Roche) basée sur la version complète du génome de *M. truncatula* (Gouzy, Gamas, Debelle, LIPM, non-publié). L'objectif de l'expérience est d'étudier le transcriptome de plantes après des traitements combinés de facteurs Nod et d'auxine, afin de comprendre les mécanismes de leur interaction synergique, ce qui nous aidera à aborder la question d'une éventuelle modification de la sensibilité à l'auxine par les facteurs Nod. Les résultats permettront également de trouver de nouveaux acteurs dans les voies de réponses à l'auxine, qui sont peu documentées chez *M. truncatula*.

3.1. Synchronisation des racines latérales

3.1.a. Principe de l'expérience

Afin d'améliorer notre étude des étapes successives de la formation des RL, et pour produire plus de matériel à un stade donné de développement de la RL pour l'étude transcriptomique, nous avons cherché à développer une méthode de synchronisation du développement des RL.

J'ai testé un moyen de synchroniser la formation des racines latérales en bloquant le transport de l'auxine à l'aide d'un inhibiteur du transport de l'auxine, le NPA (Acide naphthylphthalamique), puis en ajoutant une dose forte d'ANA. Cette méthode a déjà été testée chez *A. thaliana* (Himanen et al. 2002). Le NPA bloque le transport actif d'auxine, provoquant une forte accumulation d'auxine au-dessus de l'apex, car celle-ci ne peut plus circuler. Nous avons placé des plantules *DR5:GUS* et *DR5:VENUS-N7* sur un milieu M contenant du NPA à 10^{-5} M pendant 3 jours. La racine primaire a cessé de croître, et aucune RL n'a émergé au cours de cette période de 3 jours. Le profil d'expression du marqueur DR5 a montré une restriction de la concentration d'auxine dans une zone au-dessus de l'extrémité de la racine, comme attendu pour un traitement NPA (Herrbach et al., 2014).

Ensuite, j'ai transféré ces plantes sur différents milieux sans NPA, afin de déclencher un développement synchronisé des RL. Au bout de 8 jours sur un milieu M classique, aucune émergence de RL n'est observée dans la zone de la racine qui était en contact avec NPA, mais la racine primaire a recommencé à croître au niveau de l'apex. Sur un milieu contenant de l'ANA à 10^{-6} M, j'ai observé la formation de RL synchronisées ; à une dose de 10^{-7} M d'ANA, des RL se sont formées mais semblaient moins bien synchronisées ; tandis qu'une dose de 10^{-8} M d'ANA n'était pas suffisante pour relancer le développement des RL (Figure 5.8 A).

Par ailleurs, j'ai aussi essayé de restaurer la formation des RL après un traitement NPA grâce à un milieu contenant des facteurs Nod à 10^{-8} M ; mais je n'ai observé aucune émergence de RL (sur 15 jours). Les facteurs Nod n'ont pas non plus été capables de restaurer la formation de RL en combinaison avec de l'ANA à 10^{-8} M ou 10^{-7} M (pas montré). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le NPA a un effet très drastique sur les racines, et seule l'auxine très concentrée permet d'obtenir à nouveau des RL. Par ailleurs, ce résultat est cohérent avec l'hypothèse selon laquelle les facteurs Nod potentialisent l'effet de l'auxine en agissant sur son transport, car le transport d'auxine est bloqué par le NPA.

3.1.b. Validation de la synchronisation

Afin de vérifier que la méthode de synchronisation par prétraitement au NPA est bien efficace au niveau des stades de développement du primordium, j'ai observé des plantes DR5:GUS traitées selon cette méthode, puis colorées après 2 jours passés sur différents milieux de restauration (avec ou sans ANA à 10^{-6} M, avec ou sans facteurs Nod à 10^{-7} M). J'ai détaillé la répartition des stades de développement à l'aide du profil d'expression DR5, et l'ai comparé à des plantes du même âge qui n'ont pas été traitées au NPA (Figure 5.8 B). Ces dernières présentent une répartition assez homogène des stades développementaux des RL, avec même quelques RL émergées. Après prétraitement NPA et retransfert sur milieu vierge ou avec facteurs Nod, les plantes ont une réduction drastique du nombre de RL. Par contre, si elles sont retransférées sur un milieu avec ANA (avec ou sans facteurs Nod), le nombre total de RL est quasiment restauré par rapport aux plantes non-traitées. En revanche, contrairement à ces dernières, la répartition des stades est complètement différente : les plantes ne présentent quasiment que des LRP au stade 1, ce qui suggère qu'elles ont été bloquées et que tous les LRP se sont développés en même temps. Cette expérience confirme que notre méthode de synchronisation est efficace et synchronise le développement des primordia dès les stades précoces.

Malgré le fait d'augmenter la concentration de facteurs Nod à 10^{-7} M, leur effet n'a pas pu être mis en évidence après traitement NPA, certainement parce que les facteurs Nod ont besoin d'un gradient d'auxine pour être actifs sur la formation des RL. Toutefois, malgré cet inconvénient, nous avons validé cette méthode pour l'étude transcriptomique, d'une part parce que la synchronisation est bonne, et d'autre part parce que nous supposons que l'absence de réaction tardive (LRP et RL) aux facteurs Nod n'empêche pas une réponse transcriptomique précoce.

3.1.c. Effet cellulaire de la synchronisation

Pour l'expérience d'étude transcriptomique, nous souhaitons nous placer dans des conditions très précoces, avant les premières divisions des primordia, afin de mettre en évidence les mécanismes génétiques qui se produisent avant la formation des RL.

Afin de déterminer quel repère de temps utiliser pour notre étude, j'ai réalisé des coupes longitudinales dans des racines obtenues après prétraitement NPA, puis transfert sur ANA pendant 20h et 48h, pour voir à quel niveau de divisions se trouvent les racines.

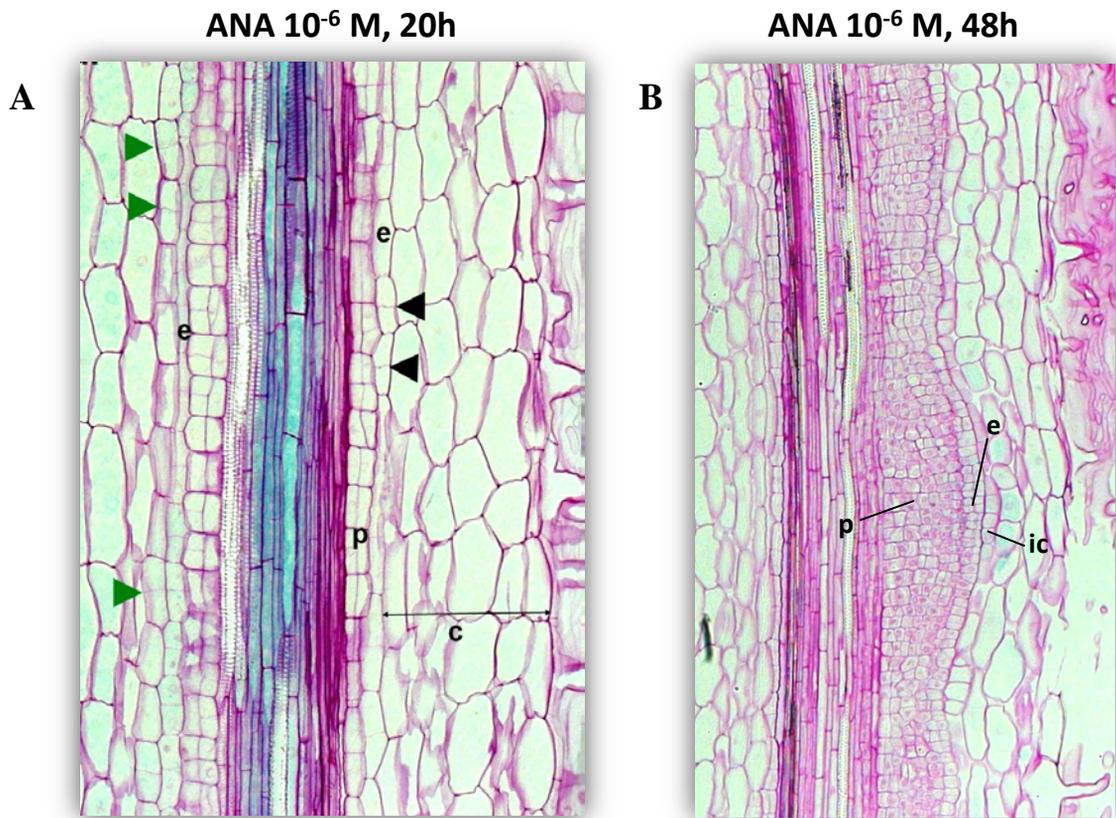


Figure 5.9 • Effets cellulaires de la synchronisation de la formation des RL par prétraitement au NPA

Coupes longitudinales obtenues au microtome dans des racines de *M. truncatula* 2HA lignée *DR5:GUS* B4, après un prétraitement au NPA à une concentration de 10⁻⁵ M pendant 3 jours, sur des plantules de 3 jours, puis transfert sur un milieu contenant 10⁻⁶ M d'ANA pendant 20h (A) ou 48h (B). Les plantules ont ensuite été révélées pour leur activité GUS, et les coupes ont été réalisées sur 3-4 racines par condition. (A) Après 20h sur ANA, de nombreuses divisions régulières périclines ou anticlines ont lieu dans le pericycle. Des divisions anticlines sont également visible dans l'endoderme (flèches noires) et dans le cortex interne (flèches vertes). (B) Après 48h sur ANA, les cellules du péricycle ont beaucoup proliféré, formant des masses cellulaires épaisses, longeant *a priori* les pôles de protoxylème. L'endoderme et le cortex interne ont continué de se diviser de façon anticline, et également péricline pour l'endoderme.

p: péricycle, e: endoderme, ic: cortex interne, c: cortex. L'activité GUS est colorée en bleu, les parois cellulaires sont colorées au rouge de ruthénium.

Après 20h, j'ai observé des divisions anticlines et périclines régulières le long des racines, situées au niveau du péricycle (Figure 5.9 A). L'endoderme présente aussi des divisions régulières mais uniquement anticlines (flèches noires). Quelques divisions anticlines dans la couche la plus interne de cortex peuvent être observées mais de façon plus ponctuelle (flèches vertes). Après 48h sur ANA à 10^{-6} M, les tissus internes se sont divisés de façon spectaculaire (Figure 5.9 B), formant une suite de primordia de RL le long de la racine primaire, impliquant les mêmes tissus que ceux contribuant à la formation du primorium de RL dans des conditions classiques (péricycle, endoderme, cortex interne). Cette prolifération cellulaire est due à la forte dose d'auxine utilisée (10^{-6} M).

Dans les deux cas, les divisions étaient déjà en place lorsque nous avons effectué les coupes. Nous avons donc décidé de nous placer, pour l'étude transcriptomique, à un temps plus précoce que 20h, et nous avons choisi 10h.

3.2. Design de l'expérience

Les puces NimbleGen sont basées sur des hybridations compétitives des échantillons. Pour chaque comparaison, 3 répétitions biologiques et 2 répétitions techniques sont nécessaires, ce qui représente 6 hybridations.

À partir de plantules A17 âgées de deux jours, nous avons effectué des prétraitements au NPA 10^{-5} M pendant deux jours. Nous avons ensuite séparé les plantes en quatre groupes et répartis sur quatre milieux différents (Tableau 5.10) pendant 10 heures.

Nous avons choisi un design expérimental constitué de quatre comparaisons de conditions :

- (1) Milieu Contrôle vs. Milieu Nod (pour évaluer les effets des facteurs Nod)
- (2) Milieu Contrôle vs. Milieu ANA (pour évaluer l'effet de l'ANA)
- (3) Milieu ANA vs. Milieu Nod+ANA (pour tester l'effet synergique ANA + Nod par rapport à ANA seul)
- (4) Milieu Nod vs. Milieu Nod+ANA (pour tester l'effet synergique ANA + Nod par rapport à Nod seul)

J'ai effectué les expériences pour produire le matériel végétal pour les quatre conditions et les trois répétitions, et j'ai réalisé les extractions d'ARN en mai/juin 2013. Les ARN ainsi produits ont été contrôlés pour vérifier leur qualité, puis envoyés à la plateforme transcriptomique d'Evry qui se charge des étapes d'amplification, de production des ADN complémentaires, du marquage, de l'hybridation des puces et de l'analyse statistique. Ces analyses sont actuellement en cours de réalisation. À l'heure où ce manuscrit est rédigé, les résultats ne sont pas encore disponibles.

	Nombre de plantes / répétitions biologiques	Concentration du solvant de l'ANA	Concentration de l'ANA	Concentration du solvant des facteurs Nod	Concentration des facteurs Nod
Milieu contrôle	50 / 3	10 ⁻⁶ M	0	10 ⁻⁷ M	0
Milieu Nod	50 / 3	10 ⁻⁶ M	0	0	10 ⁻⁷ M
Milieu ANA	50 / 3	0	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M	0
Milieu Nod+ANA	50 / 3	0	10 ⁻⁶ M	0	10 ⁻⁷ M

Tableau 5.10 • Concentrations des molécules et solvants contenus dans les milieux utilisés pour l'analyse transcriptomique

Les milieux de restauration de la formation des RL ont été constitués afin de contenir soit des facteurs Nod (Milieu Nod), soit de l'ANA (Milieu ANA), soit les deux (Milieu Nod+ANA), soit aucune des deux molécules (Milieu contrôle). Afin de pouvoir comparer ces conditions une fois l'analyse réalisée, la quantité équivalente de solvant dans lequel les molécules sont dissoutes a été ajoutée aux milieux. Le solvant de l'ANA est l'éthanol additionné d'un peu de KOH, et le solvant des facteurs Nod est l'acétonitrile.

4. Conclusions

Afin de conclure notre analyse des mécanismes permettant aux LCOs de stimuler la formation des RL, nous avons voulu tester les interactions existant entre ces facteurs et certaines phytohormones par différentes approches. Dans cette partie, nous avons démontré une interaction synergique entre l'auxine et les facteurs Nod, ainsi qu'avec les Myc-LCOs (non sulfatés) en conditions limitantes. Nos résultats indiquent également que l'éthylène ne semble pas indispensable à la réponse aux facteurs Nod. Enfin, nous suggérons que la perception des cytokinines et la biosynthèse des strigolactones interviennent dans la stimulation de la formation des RL chez *M. truncatula*, peut-être via l'auxine.

Ces résultats confirment le rôle prépondérant des hormones dans le phénomène développemental de stimulation de la formation des RL. Nous avons proposé des hypothèses qui devront par la suite être vérifiées et précisées par des analyses plus poussées, notamment par l'analyse transcriptomique que nous avons réalisée, et dont nous attendons les résultats.

Discussion

Tissus contribuant à la racine latérale

	Famille	Péricycle	Endoderme	Cortex	Référence
<i>Medicago truncatula</i> (Luzerne tronquée)	Legumineuse	Oui	Oui	Oui	Herrbach et al., 2014
<i>Lotus japonicus</i> (Lotier)	Legumineuse	Oui	Oui	Oui	Op den Camp et al., 2011
<i>Arachis hypogaea</i> (Cacahuète)	Legumineuse	Oui	Oui	Oui	Mallory et al., 1970
<i>Glycine max</i> (Soja)	Legumineuse	Oui	Oui	Oui	Byrne et al., 1977
<i>Pisum sativum</i> (Pois)	Legumineuse	Oui	Oui	-	Lloret et al., 1989
<i>Arabidopsis thaliana</i> (Arabette)	Brassicacée	Oui	-	-	Malamy and Benfey, 1997
<i>Raphanus sativus</i> (Radis)	Brassicacée	Oui	-	-	Laskowski et al., 1995
<i>Zea mais</i> (Maïs)	Poacée	Oui	Oui	-	Jansen et al., 2012
<i>Hordeum vulgare</i> (Orge)	Poacée	Oui	Oui	-	Orman-Ligeza et al., 2013
<i>Oryza sativa</i> (Riz)	Poacée	Oui	Oui	-	Hochholdinger et al., 2004
<i>Triticum aestivum</i> (Blé)	Poacée	Oui	Oui	-	Demchenko et al., 2001
<i>Allium cepa</i> (Oignon)	Amaryllidacée	Oui	Oui	Oui	Casero et al., 1996
<i>Ceratopteris thalictroides</i> (Fougère aquatique)	Pteridacée	-	Oui	-	Mallory et al., 1970
<i>Marsilea quadrifolia</i> (Fougère aquatique)	Marsileacée	-	Oui	-	Lin and Raghavan, 1991
<i>Cucurbita maxima</i> (Potiron)	Cucurbitacée	Oui	Oui	Oui	Mallory et al., 1970
<i>Quercus suber</i> (Chêne-liège)	Fagacée	Oui	Oui/Non*	-	Verdaguer et al., 2000

Tableau 6.1 • Comparaison des tissus racinaires contribuant à la racine latérale chez différentes plantes

Les divisions du péricycle sont une caractéristique très représentée dans le règne végétal, sauf chez certaines fougères aquatiques. De même, l'endoderme est fréquemment contributeur de la racine latérale, sauf chez les plantes *A. thaliana* et *Raphanus sativus* qui sont des Brassicacées. Les divisions corticales sont une caractéristique plus rares, présente surtout chez des légumineuses, mais également chez *Cucurbita maxima*, ou chez *Allium cepa*.

Le « - » signifie une contribution inconnue ou inexistante.

* Chez *Quercus suber* (Chêne-liège), l'endoderme contribue au primordium de racine latérale, mais finit par se séparer au cours de l'émergence.

Discussion

Depuis la découverte que des signaux symbiotiques (Facteurs Nod et Myc-LCOs) peuvent stimuler le développement des racines latérales chez la légumineuse modèle *Medicago truncatula*, il a été suggéré que ces facteurs sont capables de détourner le programme développemental racinaire. Dans ce contexte, il est important de comprendre les mécanismes physiologiques et moléculaires qui régissent cette stimulation. En effet, au début du projet de thèse, la manière dont ces molécules microbiennes agissent sur la formation des RL n'était pas documentée.

Le projet de thèse a donc pour objectif d'étudier la stimulation du développement des RL par les facteurs symbiotiques chez la légumineuse modèle *M. truncatula*, et en particulier de comprendre s'ils agissent sur un stade particulier du développement des RL, ou une zone de la racine donnée, et s'ils interagissent avec des voies hormonales.

En se basant sur nos résultats confrontés à la littérature récente, nous allons tenter de formuler des hypothèses expliquant la stimulation de la formation des RL par les facteurs symbiotiques. Nous proposerons également des perspectives ouvertes par ce travail de thèse, et nous replacerons nos résultats dans le contexte symbiotique.

1. Caractéristiques de la formation des racines latérales chez *M. truncatula*

Afin de pouvoir se baser sur des éléments descriptifs cellulaires de la RL chez *M. truncatula* pour étudier l'effet des facteurs Nod, nous avons caractérisé les stades cellulaires de développement de la RL, et avons documenté la façon dont les RL apparaissent le long de la racine principale. Les stades successifs de développement de la RL ont été classés en sept stades précédant l'émergence. Nous avons mis en évidence les contributions successives du péricycle, de l'endoderme et du cortex interne dans la formation du primordium de RL (Herrbach et al., 2014), montrant que les divisions corticales ne sont pas spécifiques à l'organogénèse de la nodosité, mais concernent aussi le développement de la RL chez *M. truncatula*, même si leur contribution au primordium de LR est plus restreinte que dans le cas de la nodosité.

Nous avons comparé nos observations avec la formation des RL chez d'autres plantes, et avons réuni certaines observations dans le tableau 6.1 afin de faciliter la compréhension.

Echelle approximative (mm)

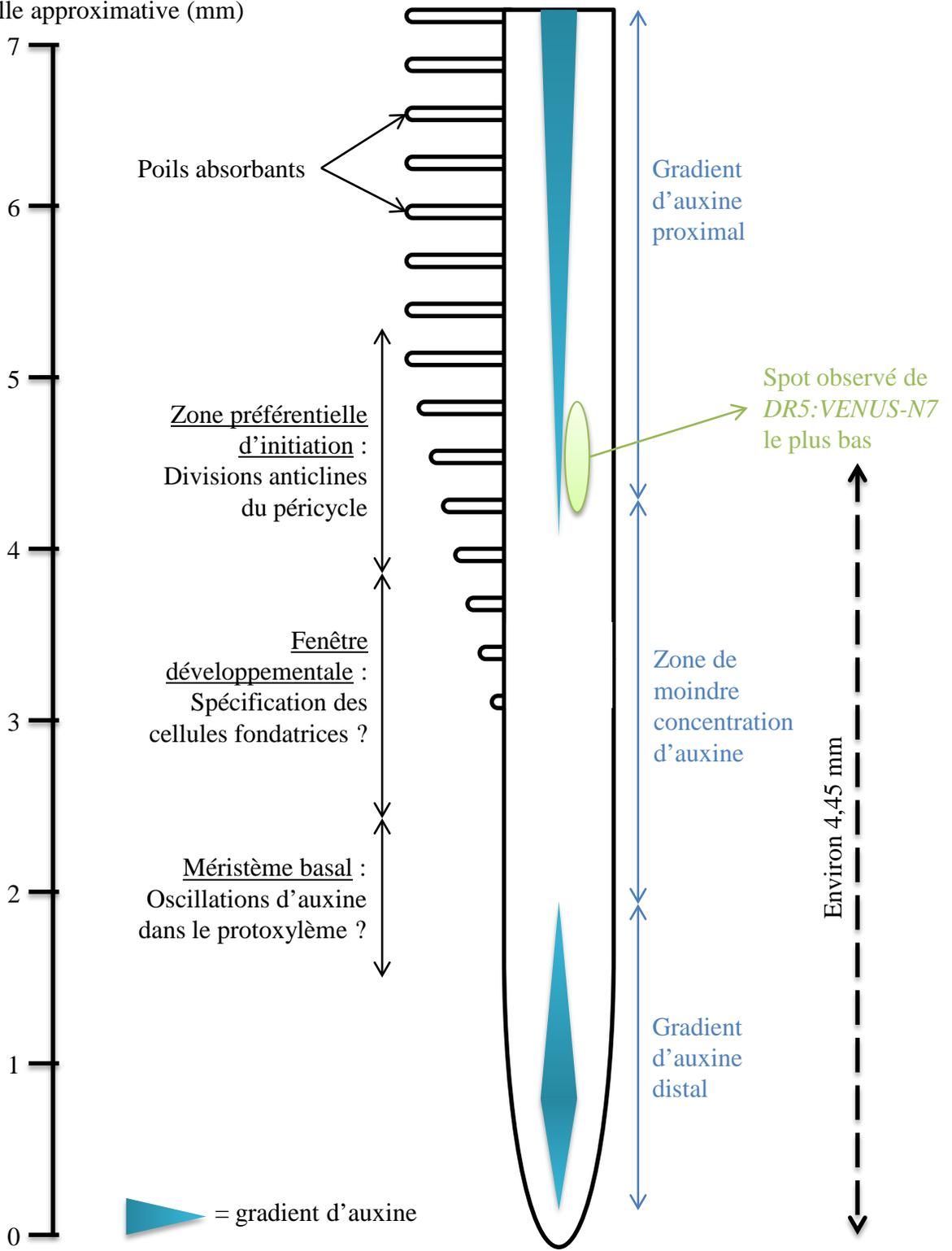


Figure 6.2 • Modèle proposé pour les étapes de spécification et d'initiation de la racine latérale chez *M. truncatula*

Des gradients d'auxine et une zone de moindre concentration d'auxine similaires à *A. thaliana* ont été observée dans la racine de *M. truncatula*. Les premières initiations (divisions anticlines du péricycle) se produisent dans une zone préférentielle d'initiation située à environ 4,45 mm de l'apex, correspondant au début du gradient proximal, comme chez *A. thaliana*.

Nous suggérons que la zone de moindre concentration d'auxine corresponde à la fenêtre développementale pour la spécification des cellules fondatrices, tandis que les oscillations d'auxine dans le protoxylème précédant la spécification des cellules fondatrices, pourraient se dérouler dans le méristème basal (si ces oscillations existent chez *M. truncatula*).

1.1. *L'initiation de la racine latérale débute dans le péricycle, dans une zone préférentielle de la racine primaire*

À l'aide de nos marqueurs *DR5:GUS*, nous avons observé chez *M. truncatula* qu'il existait, comme chez *A. thaliana*, une zone de moindre concentration d'auxine. De plus, nous avons observé que les primordia de RL sont notamment initiés (spot *DR5:VENUS-N7* le plus bas visible) dans une zone située à 4,45 mm de l'apex (Herrbach et al., 2014), ce qui coïncide avec le début du gradient d'auxine proximal au dessus d'une zone de moindre concentration d'auxine (Figure 6.2). Par ailleurs, la zone située de 3 à 5 mm de l'apex correspond également à la zone de croissance des poils absorbants, qui est décrite pour sa sensibilité aux facteurs Nod dans le contexte de la symbiose LR. Les premières divisions observées sont anticlines (perpendiculaires à l'axe de la racine) et se déroulent dans le tissu le plus interne de la racine principale, à savoir le péricycle, juste à côté d'un pôle de protoxylème.

Chez *A. thaliana*, le seul tissu contribuant au primordium de RL est le péricycle (Malamy and Benfey, 1997) et la zone préférentielle d'initiation des RL se trouve approximativement à 4,21 mm du centre quiescent racinaire (Dubrovsky et al., 2011). C'est dans cette zone que les premières divisions de la RL sont attendues chez *A. thaliana*. Il existe une fenêtre développementale où la concentration d'auxine est plus faible, à la jonction du gradient distal et du gradient proximal qui corrèle avec la zone où les cellules fondatrices du péricycle sont spécifiées (Dubrovsky et al., 2011).

On peut émettre l'hypothèse que chez *M. truncatula*, la zone de moindre concentration d'auxine que l'on observe correspond également à la zone préférentielle de spécification des cellules fondatrices, et que le début du gradient correspond à la zone d'initiation (Figure 6.2). Par ailleurs, le premier tissu à se diviser lors de l'initiation est le péricycle, tout comme chez *A. thaliana*.

1.2. *Le développement du primordium de racine latérale implique aussi l'endoderme*

Les divisions anticlines dans le péricycle sont suivies par des divisions anticlines dans l'endoderme. Nos observations ont confirmé que les divisions endodermiques, ainsi que celles du péricycle, aboutissent à une contribution effective de ces nouveaux tissus au futur primordium. Ceci marque une différence claire avec *A. thaliana* car l'endoderme ne se divise pas chez cette plante ; au contraire, il est ensuite traversé par le primordium de RL formé à partir du péricycle (Malamy and Benfey, 1997). La contribution de l'endoderme à la RL a déjà été décrite (Tableau 6.1) chez des légumineuses (Mallory et al., 1970; Op den Camp et al., 2011) certaines monocotylédones, telles le maïs, l'orge ou l'ail (Bell and McCully, 1970; Jansen et al., 2012; Orman-Ligeza et al., 2013). Par ailleurs, chez certaines fougères, seul l'endoderme joue un rôle dans la formation de la RL (Lin and Raghavan, 1991; Mallory et al., 1970). Il existe aussi un cas de plante ligneuse pour laquelle l'endoderme se divise lors de la formation de la RL, mais ne contribue que temporairement au primordium, se détachant lors de l'émergence (Verdaguer et al., 2000) (Tableau 6.1).

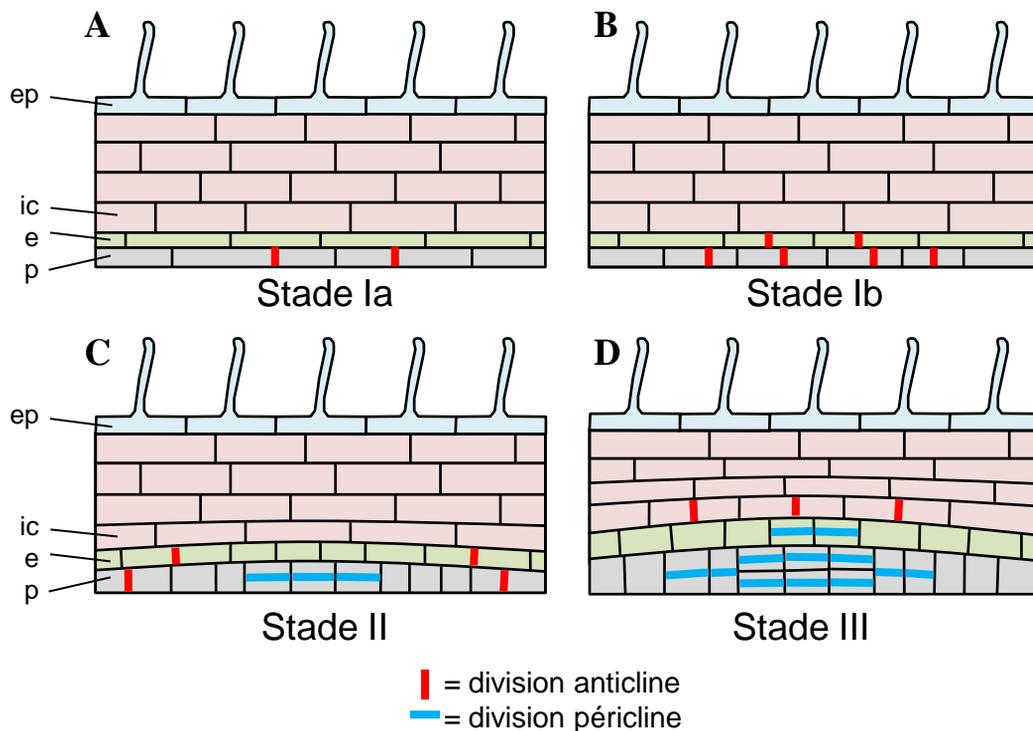


Figure 6.3 • Modèle proposé pour les étapes cellulaires précoces de développement de la racine latérale chez *M. truncatula*

(A) Stade Ia : le premier tissu à subir des divisions est le péricycle. Ces divisions sont anticlines.

(B) Stade Ib : les divisions anticlines s'étendent à l'endoderme et se poursuivent dans le péricycle.

(C) Stade II : des divisions périclines se produisent dans le péricycle, formant deux sous-couches.

(D) Stade III : les trois tissus internes (péricycle, endoderme et cortex interne) sont sollicités et se divisent. D'autres divisions anticlines et périclines ont lieu dans le péricycle, l'endoderme se sépare en deux sous-couches grâce à des divisions périclines, et le cortex subit des divisions anticlines.

ep = épiderme, ic: cortex interne, e: endoderme, p: péricycle.

D'après Herrbach et al., 2014.

Par analogie avec la description de la RL chez *A. thaliana*, nous avons annoté « Stade I » les étapes de premières divisions anticlines, avec le stade Ia correspondant aux divisions du péricycle, et le stade Ib aux divisions de l'endoderme (Figure 6.3).

Ensuite, la formation du primordium de RL passe par une augmentation du nombre de couches cellulaires, et donc par des divisions périclines. Les premières divisions périclines ont été observées dans le péricycle, et ont été annotées en tant que stade II du développement de la RL chez *M. truncatula*. Nous avons pris exemple sur *A. thaliana*, chez laquelle le stade II correspond également aux premières divisions périclines (Malamy and Benfey, 1997). Au cours de ce stade, d'autres divisions anticlines ont lieu dans le péricycle et l'endoderme (Figure 6.3).

1.3. Le développement du primordium de racine latérale implique aussi le cortex interne

Le stade III correspond à l'apparition de divisions périclines dans l'endoderme, formant donc deux couches. Les divisions périclines dans le péricycle s'élargissent à un plus grand nombre de cellules et une nouvelle série de divisions périclines dans les deux couches de péricycle ont lieu. D'autres divisions anticlines se produisent dans les deux tissus. À ce stade, apparaissent des divisions anticlines dans le cortex, plus précisément dans la couche la plus interne. Les cellules corticales ainsi formées contribuent par la suite au primordium de RL (Figure 6.3).

Cet élément constitue une autre grande différence avec le modèle de formation des RL d'*A. thaliana*, car celui-ci n'implique aucune division corticale. En revanche, chez plusieurs légumineuses, des divisions corticales ont été observées au cours de la formation de la RL (Tableau 6.1) (Byrne et al., 1977; Mallory et al., 1970; Op den Camp et al., 2011), ce qui paraît cohérent avec nos observations sur *M. truncatula*. Néanmoins, les divisions corticales ne sont pas spécifiques aux légumineuses et peuvent se retrouver chez d'autres espèces, par exemple *Allium cepa* ou *Cucurbita maxima* (Tableau 6.1) (Casero et al., 1996; Mallory et al., 1970).

1.4. Certaines divisions corticales semblent faciliter l'émergence

Au cours de nos observations, nous avons constaté que la seconde couche la plus interne de cortex pouvait aussi se diviser ; néanmoins, sa contribution effective au primordium de RL n'est pas du tout certaine. Il est très probable que ces divisions aient comme rôle de faciliter la séparation des tissus afin de laisser passer le primordium lors de l'émergence. En effet, lors du stade IV, nous avons également observé sur nos coupes transversales et longitudinales des espaces inter-cellulaires en périphérie du primordium de RL suggérant des cellules en train de se désagréger et de se séparer les unes des autres. Cette séparation des cellules corticales peut également être observée chez *A. thaliana*, même si cette couche ne se divise pas. Il est montré chez cette plante que la séparation des cellules est possible grâce à l'action de l'auxine conduite hors du primordium vers les cellules corticales par le transporteur d'influx

LAX3, lui-même régulé par l'auxine (Peret et al., 2009; Swarup et al., 2008). Celle-ci stimule la synthèse d'enzymes de remodelage de la paroi des cellules, permettant l'émergence du primordium. La facilitation de l'émergence du primordium par des mécanismes de ce type aurait d'autant plus de raison d'exister chez des plantes présentant une structure racinaire plus complexe qu'*A. thaliana*, ce qui est le cas notamment pour *M. truncatula*. Pour *Oryza sativa* par exemple, les divisions des cellules corticales autour du primordium sont décrites pour favoriser l'émergence de la RL (Sreevidya et al., 2010).

Nous avons constaté l'accumulation d'auxine à partir du stade IV dans les tissus entourant le primordia de RL, c'est-à-dire dans les couches moyennes de cortex (Herrbach et al., 2014), suggérant que l'auxine joue effectivement un rôle dans la préparation de ces tissus pour le passage du primordium. Nous avons étudié le domaine d'expression du gène *LAX3* d'*A. thaliana* chez *M. truncatula*, sans obtenir de résultat probant. Nous avons choisi d'utiliser la construction *pLAX3:GUS* issue d'*A. thaliana*, car elle était disponible, et nous ne souhaitons pas approfondir l'étude de l'émergence par manque de temps. Il serait intéressant de décrire l'expression du ou des orthologues de *LAX3* chez *M. truncatula*, afin de mieux comprendre la façon dont l'accumulation d'auxine influence l'émergence. Une autre possibilité serait d'utiliser un outil développé chez *A. thaliana*, composé d'un répresseur transcriptionnel de l'auxine *IAA/AXR3 (INDOLE ACETIC ACID 17/AUXINE RESPONSIVE 3)*, artificiellement exprimé uniquement dans les couches de la racine principale et non dans le primordium de RL (Lucas et al., 2013). Il serait intéressant de disposer de cet outil chez *M. truncatula*, afin de réprimer l'action de l'auxine dans les couches cellulaires entourant le primordium. Cette expérience permettrait de mieux comprendre le rôle de l'auxine dans les mécanismes qui accompagnent l'émergence de la RL.

1.5. L'auxine s'accumule dans les primordia de racines latérales

Nous avons observé que les étapes d'initiation de la RL chez *M. truncatula* étaient caractérisées par l'expression du marqueur *DR5:GUS* dans le péricycle, l'endoderme et le cortex, ce qui signifie que l'auxine semble présente dans ces trois tissus. Certaines observations, à confirmer, suggèrent que cette accumulation d'auxine a lieu dans les trois tissus avant les premières divisions du primordium, donc peut-être lors de la spécification des cellules fondatrices. Les divisions du péricycle, de l'endoderme et du cortex se produisent de façon séquentielle. On ne peut pas exclure que l'accumulation d'auxine ait d'abord lieu dans le péricycle, puis s'élargisse ensuite au tissu voisin, l'endoderme, puis au niveau du cortex.

Lors des étapes précoces de la formation de la RL chez *A. thaliana*, *DR5:GUS* ne s'exprime pas dans d'autres tissus que dans le péricycle (Benkova et al., 2003). On peut proposer l'hypothèse que chez *A. thaliana*, un mécanisme de régulation empêche l'auxine de pénétrer dans d'autres tissus que le péricycle. Chez *A. thaliana*, un mécanisme de reflux d'auxine de l'endoderme vers le péricycle est coordonné par le transporteur d'efflux PIN3 (Marhavy et al., 2013). La présence, chez *M. truncatula*, d'une accumulation

d'auxine dans l'endoderme et dans le cortex peut, par exemple, être due à des différences dans ce mécanisme ou son absence (par exemple l'absence d'expression de PIN3 dans l'endoderme).

D'après nos résultats d'observation de plantes exprimant *DR5:GUS*, les divisions dans le pericycle, l'endoderme et le cortex interne sont accompagnées d'une accumulation d'auxine dans ces trois tissus. La corrélation entre la présence d'auxine dans ces tissus, et leur division au cours de la formation du primordium de RL devra être mieux étudiée. En particulier, des gènes liés à l'activation du cycle cellulaire, élément préalable aux divisions cellulaires, requièrent l'auxine chez *A. thaliana* (Himanen et al., 2002). Le gène *CELL DIVISION CYCLE 16 (CDC16)* de *M. truncatula*, homologue du gène *CDC16* celui d'*A. thaliana*, a été montré comme impliqué dans la formation de la racine latérale ainsi que dans la nodosité (Kuppusamy et al., 2009). Il pourrait être intéressant de vérifier comment ce gène régule le cycle cellulaire en réponse à l'auxine chez *M. truncatula*. Par ailleurs, d'autres acteurs du cycle cellulaire chez *M. truncatula* pourront être recherchés.

1.6. La formation du méristème et la vascularisation sont encore à documenter

Au cours du stade V, les cellules du péricycle, de l'endoderme et du cortex interne prolifèrent pour former un primordium massif qui commence à pénétrer les couches cellulaires corticales qui lui sont adjacentes, tandis que ces dernières continuent à se déformer et s'écarter. À mesure que le primordium progresse à travers la racine principale, de nouvelles divisions périclines apparaissent dans la couche la plus externe du primordium, montrant que cette couche cellulaire est active et contribue toujours au primordium. Nous avons observé qu'à ce stade, le primordium commence à former son propre gradient d'auxine. Enfin, au stade VI, le primordium de RL atteint l'épiderme et le traverse.

Chez *A. thaliana*, il est décrit que l'étape d'émergence (dernière étape de la formation du primordium) fait surtout appel à des mécanismes d'élongation cellulaire, plutôt qu'à de la prolifération cellulaire (Malamy and Benfey, 1997). Nous n'avons pas trouvé suffisamment d'éléments montrant que les cellules s'allongent particulièrement à ce stade ; cependant, nous avons noté quelques cellules allongées au niveau de la stèle de la nouvelle racine. Il est possible également que ces cellules allongées soient les premières traces de la formation des tissus vasculaires. En outre, nous avons constaté que le primordium présentait son propre gradient d'auxine à ce stade, grâce au profil du marqueur *DR5:GUS*, suggérant que le transport d'auxine pourrait commencer à se mettre en place au stade pré-émergents (VI-VII). Chez *A. thaliana*, la différenciation des cellules vasculaires intervient à ce stade.

De même, il est décrit chez *A. thaliana* que le méristème racinaire devient actif au cours de l'émergence, lors des étapes de différenciation de la RL (Sussex et al., 1995). Nous n'avons pas d'éléments afin de décrire ces événements de différenciation ; mais il serait intéressant de savoir à quel stade de formation de la RL ils se déroulent. Ceci pourra être réalisé à l'aide de marqueurs permettant de suivre la formation du méristème racinaire ou de la vascularisation. Chez *M. truncatula*, de tels marqueurs peuvent être identifiés par recherche d'homologie avec des gènes d'*A. thaliana* spécifiques à

l'identité tissulaire dans le méristème, ou en cherchant de tels homologues dans des données transcriptomiques issues de méristèmes racinaires.

2. Adaptations de l'organisation des racines latérales chez *M. truncatula*

2.1. La dormance des primordia, une adaptation environnementale ?

Au cours de nos observations de racines de *M. truncatula*, nous avons observé l'émergence de RL dans des zones vieilles de la racine principale où d'autres RL étaient déjà formées, et qui ne correspondent pas à la zone préférentielle d'initiation des RL. En étudiant l'apparition des primordia de RL *in vivo*, à l'aide du marqueur *DR5:VENUS-N7*, nous avons constaté que le taux d'émergence sur nos lignées restait faible par rapport au nombre de primordia formés (15,6%), et que dans certaines zones de la racine principale, des LRP mettaient plus de temps que d'autres pour émerger. Ces éléments suggèrent la présence de primordia dormants, ou fortement ralentis dans leur développement. L'existence de primordia dormants a déjà été décrite chez plusieurs plantes, incluant des légumineuses, des monocotylédones et *A. thaliana* (Babe et al., 2012; Dubrovsky et al., 2006; Macleod and Thompson, 1979).

Il est possible que ces primordia de RL se soient développés jusqu'à un certain stade, et se soient arrêtés au cours des étapes de pénétration dans les couches supérieures (dans ce cas, les mécanismes du blocage proviendraient de ces couches cellulaires). Comme discuté auparavant, l'émergence est possible entre autres grâce à des enzymes de remodelage des parois des cellules, contrôlés par des flux d'auxine en provenance de l'apex caulinaire (Swarup et al., 2008). Une hypothèse serait donc que ces primordia stoppent leur développement en raison d'une modification du gradient d'auxine, qui pourrait inhiber soit l'initiation, soit l'émergence des primordia. En effet, lorsque des plantules de *M. truncatula* sont traitées avec un inhibiteur du transport d'auxine, tel le NPA, les primordia de RL se retrouvent bloqués dans leur développement.

Le blocage des primordia pourrait offrir à la plante une certaine plasticité du système racinaire, lui permettant de s'adapter plus rapidement à des conditions environnementales changeantes. Dans le sens de cette plasticité environnementale, un gène de type HD-ZIP contrôlant l'émergence des RL en réponse au stress salin et à l'acide abscissique a été identifié chez *M. truncatula* (Ariel et al., 2010).

Il serait important de caractériser le ou les stades de développement des primordia non émergés dans les zones vieilles que nous avons observés chez *M. truncatula*, afin de déterminer s'il s'agit effectivement de primordia dormants, impliquant un arrêt total de l'activité de division, ou un simple ralentissement de leur formation. L'observation de coupes histologiques de ces primordia, chez des plantes exprimant *DR5:VENUS-N7* au cours d'une cinétique temporelle pourrait aider à répondre à cette question.

Pour comprendre les mécanismes contrôlant le blocage de ces primordia, d'autres expériences seront nécessaires : en effet, il est possible que ce blocage soit dépendant des conditions de culture que nous

avons utilisées. Des expériences pourront être effectuées afin de comparer le taux d'émergence, ainsi que le stade d'arrêt des primordia dans différentes conditions de culture, par exemple en modulant les concentrations en nutriments (notamment en phosphate), la texture du milieu ou la lumière.

2.2. La capacité à former des racines latérales adjacentes

M. truncatula présente une structure racinaire triarche ou tetrarche (3 ou 4 pôles de protoxylème), contrairement à *A. thaliana* qui est diarche (2 pôles). Tout comme chez *A. thaliana*, la RL de *M. truncatula* se développe au niveau d'un pôle de protoxylème.

Une autre caractéristique de *M. truncatula* est sa propension à former des racines adjacentes, c'est-à-dire émergeant au même endroit de la racine primaire (14% des primordia sont concernés). À l'aide de coupes histologiques, nous avons observé les étapes précoces de formation de ces racines, et constaté qu'il est possible que deux initiations de racines latérales aient lieu en même temps sur deux pôles de protoxylème adjacents. Nous n'avons pas observé d'initiation de RL simultanées sur deux pôles opposés. En ce qui concerne l'émergence, nous avons vu que les deux primordia, initiés en même temps, n'émergent la plupart du temps pas simultanément (90% des cas). Cette observation suggère que si l'initiation peut se produire en parallèle, un mécanisme d'inhibition puisse empêcher une émergence simultanée. Une autre hypothèse serait que le pool d'auxine nécessaire pour l'émergence ne serait plus suffisant pour l'un des primordia.

Chez *A. thaliana*, deux pools de cellules de péricycle à deux pôles de protoxylème opposés peuvent être spécifiés en même temps, mais deux RL n'émergent jamais au même niveau de la racine principale en raison d'une inhibition latérale (De Smet et al., 2008; Hirota et al., 2007; Lucas et al., 2008).

2.3. Les racines latérales de *M. truncatula* ont des caractéristiques communes avec la nodosité

La description cellulaire des étapes de développement de la RL que nous avons réalisée chez *M. truncatula* nous a permis de mettre en évidence une différence importante avec *A. thaliana* : la formation d'un primordium de RL met également en jeu des divisions dans le cortex et l'endoderme. Cette caractéristique est totalement absente chez *A. thaliana*, qui est aussi incapable de former des nodosités. Par contre, chez *M. truncatula*, les nodosités se développent justement à partir de divisions corticales, bien que le péricycle soit activé et se divise en tout premier lieu, suivi de l'endoderme (Complainville et al., 2003; Timmers et al., 1999), ce qui va dans le sens d'un détournement du programme développemental racinaire par les nodosités. D'autres plantes, qui ne forment pas de nodosités, présentent aussi des divisions corticales au cours du développement des RL, en particulier *Cucurbita maxima* (Mallory et al., 1970), mais cela n'empêche pas la possibilité que les légumineuses puissent avoir recruté cette caractéristique racinaire, afin de produire des nodosités.

Les nodosités de *M. truncatula* partagent des ressemblances avec les racines latérales (Mathesius, 2008) : elles sont toutes deux formées *de novo* à partir de l'activation du péricycle et sont connectées à leur racine mère par des tissus vasculaires. En revanche, le système vasculaire de la nodosité est plus complexe, se séparant en trois branches en entourant la nodosité, tandis que chez la RL, les tissus vasculaires se trouvent au cœur de la racine, entourés par les différents tissus racinaires.

Couzigou et coll. ont décrit un gène homéotique appelé *NODULE ROOT (NOOT)* chez *M. truncatula* et son homologue *COCHLEATA (COCH)* chez *Pisum sativum* qui semblent avoir un rôle dans la maintenance du primordium des nodosités indéterminées (Couzigou et al., 2012). Les mutants *noot* et *coch* forment chez leurs plantes respectives des structures racinaires chimériques, entre la nodosité et la RL. Les premières étapes de formation de ces structures ressemblent fortement à la formation de la nodosité, mais les étapes tardives diffèrent ensuite, en formant une racine. Les gènes affectés dans ces mutants pourraient être impliqués dans la voie de signalisation permettant de contrôler le développement de la nodosité, en réprimant l'identité racinaire.

Medicago truncatula, en association avec son symbionte rhizobien forme des nodosités indéterminées, c'est-à-dire possédant un méristème actif, donc, dans un certain sens, plus similaires à une RL. Chez *Lotus japonicus*, qui forme au contraire des nodosités déterminées (le méristème n'est pas conservé), les RL sont également décrites pour impliquer des divisions corticales (Op den Camp et al., 2011), mais dans des couches de cortex plus externes que chez *M. truncatula*. Or, les nodosités déterminées présentent une ontogénie différente des nodosités indéterminées : elles se forment à partir de couches corticales externes, qui précèdent l'induction des divisions du péricycle et du cortex interne. Il est possible que les différences de couches corticales en division pour la formation des RL chez ces deux espèces de légumineuses aient un lien avec le type de nodosités qu'elles peuvent former. Il sera nécessaire de confirmer cette hypothèse en comparant les divisions corticales d'autres légumineuses, en les corrélant avec le type de nodosités, déterminées ou indéterminées, qu'elles forment.

Ces éléments suggèrent que les programmes développementaux de la RL et de la nodosité sont similaires chez *M. truncatula*. Puisque les facteurs Nod agissent lors d'une ou plusieurs étapes précoces de formation des RL, et sachant que les programmes développementaux sont proches, il serait intéressant de savoir si l'ontogénie des RL sous l'influence des facteurs Nod diffère des RL formées « naturellement », et ressemble plus à celle d'une nodosité. Nous n'avons pas vu de différences en comparant des primordia de RL traités ou non aux facteurs Nod, mais nous ne nous sommes focalisés qu'à un temps de traitement donné, et sur un nombre restreint de primordia. Cette expérience devra donc être conduite à nouveau en décomposant les stades de formation des RL, et en utilisant une bonne technique de synchronisation. Par exemple, il peut être envisagé d'effectuer des applications locales de NPA suivi d'une application d'ANA sur des cinétiques courtes et synchronisées, de manière à stimuler le développement de RL au même stade.

Globalement, si les étapes précoces d'initiation des primordia de nodosité et de RL chez *M. truncatula* sont ressemblantes, la principale différence réside dans le tissu dans lequel se produit la

majorité des divisions au cours du développement du primordium : celui de la RL est construit principalement à partir de cellules issues du péricycle et de l'endoderme, et dans une moindre mesure du cortex. La nodosité quant à elle n'implique presque que des divisions corticales, elle est donc globalement « moins profonde » que la RL. La similarité entre l'ontogénie de la nodosité et de la RL concerne donc les étapes précoces, puis une autre voie de signalisation prend le relai, qui cette fois est spécifique à chaque organe. Il est probable que cette voie de signalisation soit liée aux cytokinines : En effet, l'activation de la voie de signalisation des cytokinines joue un rôle clé dans l'organogénèse de la nodosité. En outre, les cytokinines ont un effet opposé sur le développement de la nodosité et de la RL.

3. Les facteurs Nod interagissent avec les voies hormonales lors de la formation de la racine latérale

Sachant que le développement des organes racinaires est fortement régulé par des voies phytohormonales, il est très probable que l'action des facteurs Nod fasse intervenir ces voies hormonales afin de stimuler la formation des racines latérales chez *M. truncatula*. Par le biais de trois stratégies expérimentales conjointes, d'applications locales et de nos marqueurs *DR5:GUS* et *DR5:VENUS-N7*, nous avons tenté de relier l'effet des facteurs Nod aux voies hormonales.

3.1. Localisation spatio-temporelle de l'action des facteurs Nod

Dans un premier temps, nous avons souhaité décrire avec précision quand et où se produit la stimulation par les facteurs Nod, au niveau de la racine principale. Nos résultats suggèrent que les facteurs Nod sont actifs sur un ou plusieurs stades précoces de formation de la RL, augmentant le nombre de zones d'initiation, ou accélérant les étapes des premières divisions. Chez *A. thaliana*, les racines latérales trouvent leur origine dans un très petit pool de cellules du péricycle, les cellules fondatrices, qui doivent être spécifiées (Dubrovsky et al., 2008). Cette étape est suivie d'une accumulation d'auxine dans ces cellules fondatrices. Si l'auxine joue un rôle tout aussi important chez *M. truncatula*, on peut affirmer que l'action des facteurs Nod se produit à un stade de développement des RL au cours duquel l'auxine est très impliquée.

Par ailleurs, dans le contexte de la formation de la nodosité chez *M. truncatula*, les rhizobia sont actifs sur une zone de réponse particulière située au niveau de la zone du développement des poils absorbants de la racine primaire (Bhuvanewari et al., 1981), qui correspond au début du gradient proximal d'auxine que nous avons observé chez des plantes *DR5:GUS*. D'autre part, nous avons observé l'action précoce des facteurs Nod sur le développement des RL, et leur efficacité par un traitement local à 3-5 mm de l'apex racinaire, on peut donc supposer que les facteurs Nod agissent sur cette zone pour la

formation des RL, tout comme les rhizobia agissent sur la zone de développement des poils racinaires (Figure 6.2).

L'effet avéré des facteurs Nod sur les étapes précoces n'exclut toutefois pas qu'ils agissent également sur des étapes plus tardives, ou dans d'autres zones de la racine principale. Nous avons observé que les facteurs Nod ne permettaient pas d'augmenter le taux d'émergence (nombre d'émergence/nombre de primordia) de plantes *DR5:VENUS-N7* sur une période de 7 jours. Il faudra cependant tester à nouveau l'émergence en se préoccupant de savoir si les primordia ralentis ou dormants finissent par émerger en réponse aux facteurs Nod sur un laps de temps plus long. Les autres zones de la racine principale n'ont pas été testées ; il sera indispensable de réaliser cette expérience pour savoir si les facteurs Nod agissent uniquement sur la zone jeune, à 3-5 mm de l'apex, ou également sur d'autres zones.

3.2. Les facteurs Nod interagissent avec l'auxine et pourraient influencer le gradient d'auxine

À l'aide de stratégies pharmacologiques et génétiques, nous avons tenté de mettre en évidence des possibles interactions entre les phytohormones et les LCOs. Nous avons identifié une interaction synergique sur la formation des RL entre l'auxine et les facteurs Nod, ainsi qu'avec certains Myc-LCOs. Ces interactions synergiques ont été mises en évidence par une approche pharmacologique, ce qui implique de mettre les deux molécules en présence, et d'observer si leur effet commun est différent de leurs effets additifs. Ces résultats suggèrent que les LCOs agissent directement sur la voie de l'auxine afin de stimuler la formation des RL. Il est possible que cette action se produise de façon directe, sur la biosynthèse de l'auxine, sur son transport, sur sa perception ou sa réponse à travers sa voie de transduction (Aux/IAA et ARFs), ou de façon indirecte, en stimulant un autre régulateur qui à son tour agit sur l'auxine.

Une hypothèse d'interaction possible est une action des facteurs Nod et des Myc-LCOs sur le transport de l'auxine, car il a déjà été décrit que des LCOs sont capables d'agir sur le gradient de l'auxine racinaire chez deux légumineuses, *Vicia sativa* (Vesce) et *Trifolium repens* (Trèfle) (Boot et al., 1999; Mathesius et al., 1998). Nous n'avons toutefois pas pu observer cela chez *M. truncatula*. L'interaction entre auxine et LCOs peut être due également à un effet de ces derniers sur une autre étape du métabolisme de l'auxine : les LCOs pourraient agir sur la synthèse d'auxine, ou sur des étapes de sa signalisation. Ces hypothèses seront testées en recherchant dans nos données transcriptomiques des gènes liés à ces étapes qui seraient différenciellement régulés en réponse aux facteurs Nod.

3.2.a. Les LCOs peuvent influencer le gradient d'auxine

Au cours de nos expériences, nous avons utilisé des applications locales de facteurs Nod, afin de préciser la fenêtre temporelle et la localisation globale et tissulaire de l'action des facteurs Nod sur la formation des RL. Nous avons supposé que les facteurs Nod pouvaient éventuellement activer un

mécanisme de stimulation des RL sur d'autres zones de la racine, car nous avons observé qu'une application locale de facteurs Nod permettait également la formation de RL dans la partie néoformée de la racine primaire n'étant probablement pas en contact avec les facteurs Nod. Étant donné que les facteurs Nod et l'auxine agissent en synergie pour la formation des RL, il est possible de proposer que ce mécanisme pourrait être lié à l'auxine, et particulièrement à son transport ou à sa perception. Toutefois, il faut nuancer cette hypothèse, car nous n'avons pas exclu que les facteurs Nod puissent avoir diffusé sur la surface de la racine, et avoir été perçus également dans la zone néoformée.

Il a déjà été montré que les LCOs sont capables d'agir sur le transport de l'auxine dans le contexte de la nodulation. En effet, chez *Trifolium repens*, une application locale de son symbiote bactérien par spot-inoculation induit une diminution locale du profil *GH3:GUS*, représentatif de la distribution de l'auxine. De même, l'application de LCOs purs par bombardement local provoquait également cette modification, ainsi que l'inhibiteur du transport de l'auxine NPA (Mathesius et al., 1998). Les auteurs de ces travaux concluent que les LCOs sont capables de bloquer le transport de l'auxine de façon très localisée, afin de provoquer une accumulation locale d'auxine indispensable à la formation de la nodosité. Une autre étude a par ailleurs démontré que des LCOs pouvaient modifier le gradient polaire de l'auxine dans des racines de *Vicia sativa* (Boot et al., 1999). Plus récemment, il a été observé que les rhizobia pouvaient modifier le gradient d'auxine en agissant sur les flavonoïdes, qui se comportent comme des inhibiteurs des transporteurs d'auxine (Wasson et al., 2006). Par conséquent, une hypothèse de régulation du transport de l'auxine par les LCOs est l'action des flavonoïdes : ces molécules jouent un rôle important dans la mise en place de la symbiose LR, et sont également montrés pour influencer les gradients d'auxine chez *M. truncatula*. Une action des facteurs Nod sur les flavonoïdes pourrait être logique, car cela pourrait faire partie d'une boucle de régulation positive, étant donné que certains flavonoïdes agissent sur la synthèse des facteurs Nod. Toutefois, le rôle des flavonoïdes sur la formation des RL a été analysé plus récemment chez *M. truncatula*, et il apparaît que leur implication reste limitée (Wasson et al., 2009). Toutefois, ce travail a été réalisé sur des racines en culture et non des plantes entières, et en absence de LCOs ; l'hypothèse des flavonoïdes reste donc à être creusée.

L'éventuelle modification du gradient d'auxine au niveau global par les facteurs Nod devait être mise en évidence par les marqueurs *DR5:GUS* et *DR5:VENUS-N7*. Il a déjà été observé que le profil *DR5:GUS* chez *M. truncatula* était modifié par un traitement aux facteurs Nod (J.-M. Ané, communication personnelle). Malheureusement, nous ne sommes pas parvenus à reproduire ce résultat à l'aide du marqueur *DR5:GUS*, que ce soit par un traitement global ou local. En revanche, nous avons constaté que les facteurs Nod perdaient leur activité sur la ramification racinaire après un pré-traitement de 3 jours au NPA (inhibiteur du transport polaire d'auxine). Ceci corrobore l'importance du gradient d'auxine dans la stimulation de la formation des RL par les facteurs Nod. D'autres expériences, notamment *in vivo* grâce à *DR5:VENUS-N7* ou d'autres marqueurs sensibles à l'auxine tels que *GH3* ou *DII*, seront requises pour démontrer un éventuel effet des facteurs Nod sur le gradient d'auxine. La construction *DII:VENUS* (Brunoud et al., 2012), plus sensible à la modification dynamique du gradient

d'auxine, pourra s'avérer particulièrement utile afin de mettre en évidence l'effet des facteurs Nod sur le gradient.

3.2.b. Les LCOs agissent-ils sur les transporteurs d'auxine ?

La modification du gradient d'auxine est régulée par le transport actif de l'auxine, c'est à dire dépendant de protéine de transport. Le gradient d'auxine régulé par ces transporteurs est indispensable à la formation des RL. Ces protéines sont situées sur la membrane des cellules ou des organelles (comme le réticulum endoplasmique) et permettent d'orienter l'entrée ou la sortie de l'auxine dans la cellule grâce à leur localisation polarisée dans celle-ci (Friml et al., 2003). Chez *A. thaliana*, les principaux transporteurs décrits pour jouer un rôle dans la formation de la RL sont AUX1, PIN1, PIN3/7 (Lavenus et al., 2013) et LAX3 (Swarup et al., 2008). L'expression des gènes codant pour ces transporteurs est notamment régulée par l'éthylène, les cytokinines et les flavonoïdes, ainsi que par l'auxine pour LAX3 (Laplaze et al., 2007; Lewis et al., 2011; Peer et al., 2004; Swarup et al., 2008). AUX1 et LAX3 sont des transporteurs d'influx, promouvant l'entrée de l'auxine dans la cellule, tandis que PIN1 et PIN3/7 sont des transporteurs d'efflux, permettant la sortie de l'auxine de la cellule. Les protéines AUX1 et PINs sont requises plutôt pour les étapes précoces de la formation des RL, tandis que LAX3 a un rôle dans l'émergence du primordium de RL.

L'hypothèse selon laquelle les flavonoïdes pourraient être impliqués dans l'action des facteurs Nod sur la formation des RL est corroborée par le fait que les flavonoïdes sont des régulateurs des transporteurs d'auxine chez *A. thaliana*. En effet, les flavonoïdes peuvent influencer la localisation de certains transporteurs PIN (Peer et al., 2004), c'est-à-dire sur le transport d'efflux permettant la mise en place du gradient d'auxine dans la racine. Afin de démontrer l'implication des flavonoïdes dans la stimulation de la ramification par les LCOs chez *M. truncatula*, plusieurs expériences pourront être réalisées. Il serait intéressant de moduler la quantité de flavonoïdes, et de vérifier si la plante est toujours sensible à l'action des LCOs sur la formation des RL. Une autre possibilité serait de se baser sur une approche pharmacologique, afin de voir si les facteurs Nod agissent en synergie avec les flavonoïdes, comme ils le font avec l'auxine. D'autres acteurs liés aux flavonoïdes pourront par ailleurs être identifiés parmi les gènes induits ou réprimés en réponse aux facteurs Nod, qui seront disponibles avec l'analyse transcriptomique.

De façon générale, afin de déterminer si les facteurs Nod et les Myc-LCOs agissent sur le gradient de l'auxine chez *M. truncatula*, il sera nécessaire d'évaluer l'effet de ces molécules sur des mutants affectés dans les gènes codant pour les transporteurs d'auxine de *M. truncatula*, particulièrement les orthologues des gènes jouant un rôle dans la régulation de la RL chez d'autres plantes. Chez *M. truncatula*, plusieurs protéines de type PIN et AUX ont été identifiées (Schnabel and Frugoli, 2004), dont certaines présentent des homologies avec les régulateurs clé du transport d'auxine au cours de la formation des RL. Un mutant, *Mtslm1*, affecté dans le gène *SMOOTH LEAF MARGIN1 (SLM1)*, orthologue d'*AtPIN1*, a été décrit chez *M. truncatula* mais il ne présente a priori pas de phénotype

racinaire (Zhou et al., 2011). La famille des gènes *PIN* a été étudiée plus en détail chez *M. truncatula*, et il a été décrit que *MtPIN1* et *MtPIN10* sont proches, ainsi que *MtPIN4* et *MtPIN5*, ce qui confirme que les transporteurs *PIN* font partie de familles multigéniques, probablement fonctionnellement redondants (Peng and Chen, 2011). Il a été constaté que l'expression de *MtPIN4* semble plus forte dans les racines, et les transporteurs *MtPIN4* et *MtPIN10* semblent induits par les facteurs Nod, et dépendent du récepteur aux cytokinines *MtCRE1* chez *M. truncatula* (Plet et al., 2011). Les gènes *MtPIN4* et *MtPIN10* sont donc de bons candidats pour être impliqués dans la réponse racinaire aux facteurs Nod.

En ce qui concerne les protéines de transport de type AUX/LAX, peu de nouvelles études se sont penchées sur cette famille. Il y a cependant 5 gènes identifiés appartenant à cette famille (*LAX1-5*) (Schnabel and Frugoli, 2004). Cependant, on ne sait pas s'il existe un ou des orthologue(s) de *AtLAX3* chez *M. truncatula*. La recherche du domaine d'expression et de la localisation subcellulaire de ces protéines, et du phénotype de mutants affectés dans les gènes codant pour ces derniers nous permettra de déterminer si elles jouent aussi un rôle dans la formation de la RL chez *M. truncatula*. Par ailleurs, l'homologue d'*AtAUX1* chez *M. truncatula*, le gène *MtAUX1*, qui s'exprime dans la nodosité et la RL (de Billy et al., 2001), est aussi un candidat intéressant pour comprendre l'effet des LCOs sur le transport de l'auxine. Une construction *pAUX1:AUX1-YFP* (issue du gène *AUX1* d'*A. thaliana*) est en cours de développement dans l'équipe, et pourra être étudiée pour sa réponse aux facteurs Nod dans des racines de *M. truncatula*.

Depuis ces travaux sur des mutants, le génome de *M. truncatula* a été séquencé et annoté, donc ce travail de recherche des transporteurs d'auxine chez *M. truncatula* est à poursuivre. Il est probable que les transporteurs d'auxine chez *M. truncatula* soient regroupés dans des familles multigéniques, ce qui expliquerait l'absence de phénotype racinaire chez le mutant *Mtslm1/pin1*. L'analyse du transcriptome de *M. truncatula* en réponse aux facteurs Nod et à l'auxine permettra certainement de mettre en évidence ces familles de transporteurs.

3.3. Les facteurs Nod interagissent avec d'autres hormones

En parallèle de l'auxine, nous avons étudié l'effet des cytokinines (CK) et de l'éthylène dans la stimulation de la formation des RL par les facteurs Nod. Nous avons évalué l'effet des facteurs Nod sur la formation de la RL chez le mutant *Mtcre1-1*, affecté dans le gène *MtCRE1*, codant pour un récepteur des CK chez *M. truncatula* (Gonzalez-Rizzo et al., 2006). Nous avons constaté que le mutant *Mtcre1* répondait légèrement moins que le génotype sauvage aux facteurs Nod pour la formation des RL, ce qui suggère que les CK peuvent être en partie impliquée dans la réponse aux facteurs Nod menant à la stimulation des RL.

Les CK sont des hormones dont le rôle sur le développement racinaire est globalement inhibiteur, tandis qu'elles sont requises pour le développement de la nodosité (Frugier et al., 2008; Fukaki and Tasaka, 2009). Elles sont connues pour agir en interaction avec l'auxine dans de nombreux processus.

Pour la formation de la RL, les CK ont globalement un rôle négatif : elles inhibent la production de la protéine PIN1, permettant le transport actif de l'auxine. En revanche, elles sont décrites pour stimuler les divisions corticales lors du développement de la nodosité (Lohar et al., 2004; Plet et al., 2011).

Il reste à comprendre comment cette hormone est requise dans ce mécanisme, et si son action est liée à la synergie entre facteurs Nod et auxine. Pour cela, des traitements pharmacologiques à l'aide de CK de synthèse (BAP) et d'inhibiteurs des CK (par exemple PI-55) (Spichal et al., 2009), ainsi que de nouvelles analyses génétiques sur des mutants affectés dans d'autres récepteurs aux cytokinines, comme AHK2 et 3, d'*A. thaliana*, qui semblent agir de façon redondante avec CRE1 (Chang et al., 2013; Riefler et al., 2006), ou dans sa voie de biosynthèse ou de signalisation (par exemple les protéines de biosynthèse IPT3 et 5) (Miyawaki et al., 2006). L'utilisation de marqueurs de la présence des cytokinines pourra également être envisagée, afin de comprendre à quel stade les cytokinines pourraient être requises par les facteurs Nod lors de la stimulation de la formation des RL.

L'éthylène est également important dans la formation des RL et agit très souvent en interaction avec l'auxine que ce soit pour le développement des RL ou de la nodosité (Muday et al., 2012; Plet et al., 2011). Nous avons mis en évidence que le mutant *sickle* de *M. truncatula*, affecté dans la sensibilité à l'éthylène, répondait toujours aux facteurs Nod pour la stimulation des RL. De même, les facteurs Nod ne semblent pas agir en synergie avec le précurseur de l'éthylène ACC. De ces résultats, nous pouvons supposer que l'éthylène n'est *a priori* pas requis pour la stimulation de la formation des RL en réponse aux facteurs Nod. Par conséquent, l'action des facteurs Nod est probablement située en aval de la réponse à l'éthylène, ou passe par une voie de signalisation parallèle à celle de l'éthylène.

Pour finir, nous avons souhaité savoir si les facteurs Nod interagissent avec les strigolactones. Ces hormones impliquées dans la ramification caulinaire et racinaire sont également des molécules signal permettant d'améliorer les conditions de la symbiose MA (Kohlen et al., 2011). Les strigolactones pourraient avoir globalement un effet négatif sur la formation des RL chez *M. truncatula*, car la formation des RL chez le mutant *ccd7*, affecté dans la biosynthèse des strigolactones, est meilleure. Il faudrait toutefois confirmer cette expérience sur d'autres mutants affectés dans le métabolisme des strigolactones pour en être sûr. Le mutant *ccd7* s'est avéré moins sensible aux facteurs Nod, ce qui montre que les strigolactones peuvent jouer un rôle dans la stimulation de la formation des RL par les facteurs Nod. Cependant, un petit effet stimulateur des facteurs Nod sur la formation des RL, non significatif, laisse penser que l'action des strigolactones n'est que partielle. Il a été suggéré que les strigolactones peuvent agir sur le taux d'auxine dans les racines en réduisant le transport d'auxine par une action régulatrice sur les transporteurs PIN (Ruyter-Spira et al., 2011), ce qui expliquerait la baisse de sensibilité aux facteurs Nod chez les plantes affectées dans la production des strigolactones.

Le fait que l'action des facteurs Nod dépende des cytokinines et des strigolactones provient certainement des nombreuses interactions que ces hormones ont avec l'auxine, ce qui confirme la complexité de la régulation hormonale. Ces éléments permettent de supposer que les ratios cytokinine/auxine et strigolactone/auxine sont importants pour la formation des RL chez *M. truncatula*.

4. La détection des primordia de racine latérale

Afin de mener à bien notre projet de thèse, nous avons utilisé deux types de rapporteurs de l'accumulation de l'auxine basés sur le promoteur DR5 associé à des gènes rapporteurs (*GUS* et *VENUS*), pour lesquels nous avons développé des plantes transgéniques stables. DR5 est un promoteur synthétique contenant des éléments de réponse à l'auxine AuxRE (*Auxin Response Element*) répétés en tandem (Ulmasov et al., 1997). Ces AuxRE sont issus d'un promoteur naturel du gène *GH3* présent chez *Glycine max*, appartenant à une famille qui semble impliquée dans l'homéostasie de l'auxine.

Ces lignées transgéniques apportent de nouveaux outils à la communauté scientifique travaillant sur *M. truncatula*, tant dans le domaine du développement de la RL que dans d'autres thématiques scientifiques, particulièrement les symbioses. En effet, le rôle de l'auxine dans la régulation des symbioses n'est pas complètement compris, et beaucoup de recherches seront à effectuer à l'avenir dans ce sens.

Les marqueurs basés sur le promoteur DR5 sont très utiles pour visualiser une accumulation d'auxine, mais ils ont comme inconvénient d'être indirects, car ils mettent en évidence la fin de la voie de signalisation (la transcription d'un gène de réponse). Récemment, un nouvel outil a été développé chez *A. thaliana*, *DII:VENUS*, un senseur basé sur le domaine de liaison à l'auxine II d'une protéine de type Aux/IAA, permettant un marquage directement lié à l'abondance de l'auxine (Brunoud et al., 2012). Le marquage par *DII:VENUS* est plus sensible en terme de cinétique, car il s'exprime jusqu'à ce que l'auxine permette l'interaction entre la protéine Aux/IAA et le complexe SCF^{TIR1/AFB} menant à la dégradation de l'Aux/IAA. Par conséquent, le marqueur disparaît quand l'auxine s'accumule. Ce marqueur pourra être utile lors des études ultérieures de dynamique des gradients d'auxine liés à la formation de la racine latérale.

En parallèle, nous avons utilisé les marqueurs *pSCR1:GUS* et *pSCR2:GUS* afin de procéder à la description cellulaire des étapes de développement de la RL. Ces marqueurs, composés du promoteur du gène *SCARECROW* (*SCR*) de *Lupinus albus* (Lupin blanc), et du gène rapporteur *GUS* (Sbabou et al., 2010), ont été intégrés dans des racines de *M. truncatula* grâce à des transformations par *Agrobacterium rhizogenes*. Nous avons constaté que le profil d'expression de ces gènes n'était pas tout à fait semblable à celui décrit chez le *L. albus* et chez *A. thaliana* (Di Laurenzio et al., 1996; Sbabou et al., 2010). Par ailleurs, nous avons montré que *SCR1* et 2 s'exprimaient pendant la formation de la RL chez *M. truncatula*. Chez *A. thaliana*, *SCARECROW* est impliqué dans la détermination de l'identité de l'endoderme et du cortex dans la racine au niveau du méristème (Di Laurenzio et al., 1996). Afin de comprendre le rôle de ce gène dans la racine latérale, il faudrait rechercher l'orthologue de *SCR* chez *M. truncatula*, ce qui permettrait de formuler des hypothèses quant à une éventuelle implication pour déterminer l'identité des tissus lors de la différenciation de la RL.

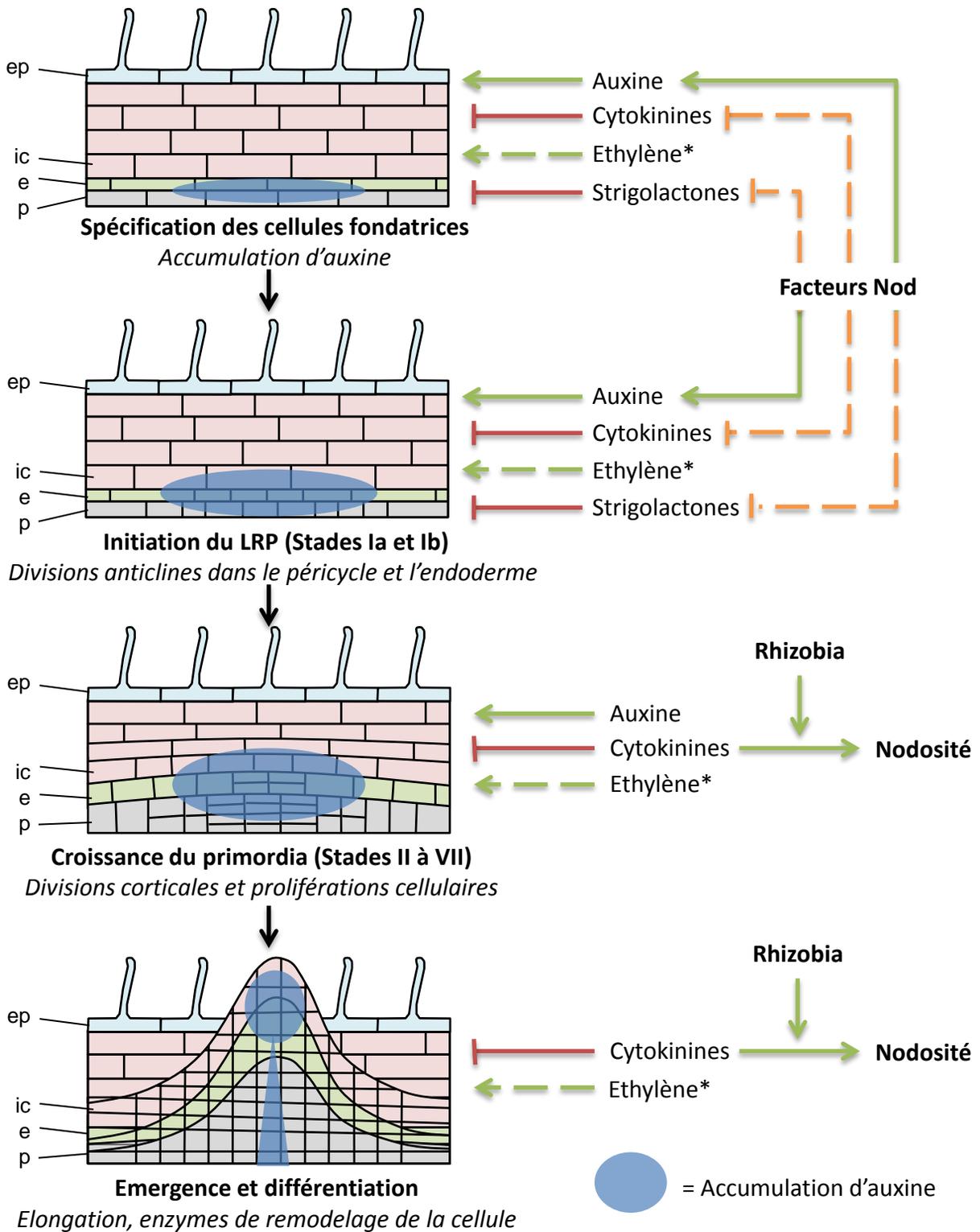


Figure 6.4 • Modèle proposé du développement de la racine latérale et de l'intervention des facteurs Nod

Nous proposons que les facteurs Nod agissent via l'auxine pour stimuler les étapes de spécification des cellules fondatrices et /ou d'initiation (premières divisions). L'action des facteurs Nod pourrait requérir également les cytokinines et les strigolactones. Le fait que les facteurs Nod induisent des RL au lieu de nodosités pourrait être lié à l'activation de la voie des cytokinines par les rhizobia. Cette voie est indispensable pour la formation de la nodosité.

Les effets stimulateurs sont indiqués par une flèche verte, les effets inhibiteurs par une ligne rouge, les effets dont on ignore la nature par des flèches orange, les effets qui ne sont pas sûrs sont en pointillés.

*Chez *M. truncatula*, l'éthylène est stimulateur sur la formation des racines latérales à concentration faible ou moyenne (10^{-7} M d'ACC).

5. Conclusions générales et perspectives

Nos travaux ont apporté des connaissances sur le déroulement et les caractéristiques du développement des RL chez *M. truncatula*. Celui-ci présente des similarités et des différences avec les caractéristiques de formation des RL chez *A. thaliana*, mais aussi des ressemblances avec la formation des RL chez d'autres espèces, ainsi qu'avec la nodosité. Le péricycle est la première lignée cellulaire à se diviser lors du développement de la RL chez *M. truncatula*, mais ce développement implique aussi une contribution de l'endoderme et du cortex interne, ce qui est une caractéristique assez fréquente chez les légumineuses. Dans l'objectif de comprendre comment les facteurs Nod agissent sur la formation de la RL chez *M. truncatula*, nous avons observé que ces molécules ont une action précoce, ciblée sur un ou plusieurs stades proches de l'initiation. Nous proposons l'hypothèse que les facteurs Nod agissent lors de la spécification des cellules fondatrices du péricycle, et/ou lors des premières divisions anticlines du péricycle ou de l'endoderme (Figure 6.4). Enfin, le rôle prépondérant de l'auxine dans cette stimulation a été partiellement confirmée, notamment de part son interaction avec les facteurs Nod. D'autres hormones, les cytokinines et les strigolactones, pourraient aussi être impliquées dans le mécanisme de stimulation de la formation des RL chez *M. truncatula* (Figure 6.4).

Les perspectives qu'ouvrent ces travaux sont nombreuses. Il reste à présent à comprendre comment le transport et/ou la signalisation de l'auxine peuvent être affectés par les facteurs Nod. Ce travail pourra être effectué en recherchant précisément la localisation cellulaire et subcellulaire des transporteurs d'auxine connus par des expériences d'hybridation *in situ* ou d'immunolocalisation. Les expériences de transcriptomique en réponse à l'auxine et/ou aux facteurs Nod permettront certainement de mettre à jour d'autres transporteurs impliqués dans la formation de la RL. Il s'agira aussi de préciser l'interaction des facteurs Nod avec les cytokinines et les strigolactones, ou avec d'autres hormones ou molécules, à l'aide de nouvelles approches génétiques, et éventuellement par des marqueurs de réponse aux cytokinines (par exemple *pMtARR9::GUS* ou *pMtARR11::GUS*) (Op den Camp et al., 2011).

Par ailleurs, nous avons lancé une analyse transcriptomique visant à tester la réponse aux facteurs Nod et à l'auxine, ainsi que l'effet synergique entre ceux-ci, afin de déterminer quels sont les acteurs moléculaires requis lors de la formation des RL en réponse à ces molécules. Cette approche nous permettra d'identifier des gènes candidats impliqués dans la régulation des étapes précoces de la formation de la racine latérale en réponse aux facteurs Nod, et de comprendre comment ces derniers modifient la signalisation et/ou le transport de l'auxine pour agir sur les RL. Cette approche nous permettra également de trouver des acteurs précoces induits par l'auxine dans les cellules à l'origine des nouvelles RL, et ainsi de mieux comprendre les étapes précoces de la formation de la RL chez *M. truncatula*. En effet, celles-ci sont peu documentées, et les approches avec *a priori* (qPCR, etc.) sur d'éventuels gènes orthologues à ceux décrits chez d'autres plantes sont difficiles à mettre en œuvre au vu de la complexité du génome de *M. truncatula*.

Dans un contexte symbiotique, cette thèse apporte des éléments de réflexions quant aux similarités entre RL et nodosité. En effet, chez *M. truncatula*, les facteurs Nod influent sur la formation des RL via l'auxine, comme nous l'avons montré, mais également via la voie commune de signalisation symbiotique (CSSP). Étant donné que l'auxine joue également un rôle dans la régulation de la nodosité, il serait intéressant de comprendre pourquoi les facteurs Nod n'induisent pas le développement d'une nodosité chez *M. truncatula*, comme c'est le cas chez *Medicago sativa*. Cela pourrait par exemple s'expliquer par l'action d'autres signaux bactériens. En se basant sur nos résultats montrant une action précoce des facteurs Nod, on peut proposer l'hypothèse que les facteurs Nod jouent un rôle dans les premières étapes de développement des organes, incluant l'action précoce de l'auxine, la spécification des cellules fondatrices du péricycle, et les divisions du péricycle et de l'endoderme, qui seraient donc des étapes communes aux deux organes. Ensuite, ces mécanismes pourraient bifurquer, ou requérir un ou plusieurs autres acteurs, afin de former plutôt une nodosité ou plutôt une RL. Les cytokinines pourraient faire partie de ces autres acteurs, car celles-ci sont requises pour la mise en place des divisions corticales de la nodosité, mais sont au contraire inhibitrices de la formation de la RL.

La continuité de ces travaux sera également de comprendre si les Myc-LCOs font intervenir le même type de mécanismes que les facteurs Nod, et dans ce cas, si les voies de signalisations menant à la stimulation des racines latérales déclenchées par les facteurs Nod d'une part et les Myc-LCOs d'autre part (*cf.* Figure 1.28), se rejoignent pour cibler des acteurs communs, après avoir bifurqué de façon spécifique (via *NSP1* ou *RAM1*). Pour ce faire, il sera intéressant de rechercher des gènes régulés par les facteurs Nod ou les Myc-LCOs, liés à la formation des RL, et dépendant soit de *NSP1*, soit de *RAM1*. Ceci sera possible à l'aide d'analyses transcriptomiques, puis en analysant les gènes identifiés dans des fonds mutants *nsp1* ou *ram1*.

À plus long terme, les travaux réalisés au cours de cette thèse ont également un intérêt agronomique : Ils amènent une meilleure compréhension de l'effet des LCOs symbiotiques sur le rendement des cultures, et permettront d'améliorer les conditions d'applications des bio-fertilisants basés sur ces molécules, développés par l'entreprise Novozymes. En particulier, un brevet a été déposé au nom de l'INRA, dont Novozymes pourra bénéficier, concernant nos résultats montrant une synergie entre les LCOs et l'auxine.

ANNEXES

ANNEXE A

COMPOSITION DU MILIEU M

Modifié d'après Bécard et Fortin et al. (1988) pour favoriser le développement de racines latérales

Solutions mères

Les solutions mères concentrées (100X pour les macro-éléments, le calcium et le fer, 1000X pour les micro-éléments et le KI) sont à conserver à 4°C. La stérilisation se fait par filtration pour le Fer, par autoclave pour les macro-éléments, le CaCl₂, les micro-éléments et le KI.

Macro-éléments

KNO ₃	80 mg/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	731 mg/L
KCl	65 mg/L
KH ₂ PO ₄	4,8 mg/L

CaCl₂

CaCl ₂ .2H ₂ O	176,4 mg/L
OU Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	288 mg/L

Fer

NaFe-EDTA	8 mg/L
-----------	--------

Micro-éléments

MnCl ₂ .4H ₂ O	6 mg/L
H ₃ BO ₃	1,5 mg/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,65 mg/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0024 mg/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,13 mg/L

KI

KI	0,75 mg/L
----	-----------

Ajuster le pH à 5,8 à l'aide de KOH dilué (pH très sensible)

Ajouter 4 g/l de Phytigel (Sigma)

Stériliser à 120°C pendant 16 min

Conserver à 65 °C après autoclave (une fois solidifié, le phytigel ne peut plus fondre)

ANNEXE B

COMPOSITION DU MILIEU FÄHRAEUS

<i>Composé</i>	<i>Concentration finale (mg/l)</i>
CaCl ₂	132
MgSO ₄ .7H ₂ O	120
KH ₂ PO ₄	100
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	75
Fe-citrate	5
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.07
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.07
ZnCl ₂ , H ₃ BO ₃	0.07
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.07

Ajuster le pH à 7.5

Ajouter 100 mg/l d'agar

Autoclave à 120°C pendant 16 min

REFERENCES

- Akiyama, K., K. Matsuzaki, and H. Hayashi, 2005, Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi: *Nature*, v. 435, p. 824-7.
- Amor, B. B., S. L. Shaw, G. E. Oldroyd, F. Maillet, R. V. Penmetsa, D. Cook, S. R. Long, J. Denarie, and C. Gough, 2003, The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation: *Plant J*, v. 34, p. 495-506.
- Andrews, M., S. Hodge, and J. A. Raven, 2010, Positive plant microbial interactions: *Ann Appl Biol*, v. 157, p. 317-320.
- Ané, J.-M., J. Lévy, P. Thoquet, O. Kulikova, F. o. de Billy, V. Penmetsa, D.-J. Kim, F. d. r. Debellé, C. Rosenberg, D. R. Cook, T. Bisseling, T. Huguet, and J. Dénarié, 2002, Genetic and Cytogenetic Mapping of DMI1, DMI2, and DMI3 Genes of *Medicago truncatula* Involved in Nod Factor Transduction, Nodulation, and Mycorrhization doi:10.1094/MPMI.2002.15.11.1108: *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 15, p. 1108-1118.
- Ané, J. M., G. B. Kiss, B. K. Riely, R. V. Penmetsa, G. E. Oldroyd, C. Ajax, J. Levy, F. Debelle, J. M. Baek, P. Kalo, C. Rosenberg, B. A. Roe, S. R. Long, J. Denarie, and D. R. Cook, 2004, *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes: *Science*, v. 303, p. 1364-7.
- Ariel, F., A. Diet, M. Verdenaud, V. Gruber, F. Frugier, R. Chan, and M. Crespi, 2010, Environmental regulation of lateral root emergence in *Medicago truncatula* requires the HD-Zip I transcription factor HB1: *Plant Cell*, v. 22, p. 2171-83.
- Arrighi, J. F., A. Barre, B. Ben Amor, A. Bersoult, L. C. Soriano, R. Mirabella, F. de Carvalho-Niebel, E. P. Journet, M. Gherardi, T. Huguet, R. Geurts, J. Denarie, P. Rouge, and C. Gough, 2006, The *Medicago truncatula* lysin motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes: *Plant Physiol*, v. 142, p. 265-79.
- Arrighi, J. F., O. Godfroy, F. de Billy, O. Saurat, A. Jauneau, and C. Gough, 2008, The RPG gene of *Medicago truncatula* controls *Rhizobium*-directed polar growth during infection: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 105, p. 9817-22.
- Babe, A., T. Lavigne, J. P. Severin, K. A. Nagel, A. Walter, F. Chaumont, H. Batoko, T. Beeckman, and X. Draye, 2012, Repression of early lateral root initiation events by transient water deficit in barley and maize: *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, v. 367, p. 1534-1541.
- Bago, B., P. E. Pfeffer, and Y. Shachar-Hill, 2000, Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas: *Plant Physiology*, v. 124, p. 949-957.
- Barker, S. J., and D. Tagu, 2000, The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses: *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 19, p. 144-154.
- Bassa, C., I. Mila, M. Bouzayen, and C. Audran-Delalande, 2012, Phenotypes Associated with Down-Regulation of SI-IAA27 Support Functional Diversity Among Aux/IAA Family Members in Tomato: *Plant and Cell Physiology*, v. 53, p. 1583-1595.
- Beeckman, T., S. Burssens, and D. Inze, 2001, The peri-cell-cycle in *Arabidopsis*: *Journal of Experimental Botany*, v. 52, p. 403-411.
- Bell, J. K., and M. E. McCully, 1970, A histological study of lateral root initiation and development in *Zea-mays*: *Protoplasma*, v. 70, p. 179-205.
- Benkova, E., M. Michniewicz, M. Sauer, T. Teichmann, D. Seifertova, G. Jurgens, and J. Friml, 2003, Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation: *Cell*, v. 115, p. 591-602.
- Bennett, M. J., A. Marchant, H. G. Green, S. T. May, S. P. Ward, P. A. Millner, A. R. Walker, B. Schulz, and K. A. Feldmann, 1996, *Arabidopsis* AUX1 gene: A permease-like regulator of root gravitropism: *Science*, v. 273, p. 948-950.

- Bensmihen, S., F. de Billy, and C. Gough, 2011, Contribution of NFP LysM Domains to the Recognition of Nod Factors during the *Medicago truncatula*/*Sinorhizobium meliloti* Symbiosis: *Plos One*, v. 6.
- Benson, D. R., and W. B. Silvester, 1993, Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants: *Microbiological Reviews*, v. 57, p. 293-319.
- Bent, A. F., R. W. Innes, J. R. Ecker, and B. J. Staskawicz, 1992, Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis-thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens: *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 5, p. 372-378.
- Berckmans, B., V. Vassileva, S. P. C. Schmid, S. Maes, B. Parizot, S. Naramoto, Z. Magyar, C. L. A. Kamei, C. Koncz, L. Bogre, G. Persiau, G. De Jaeger, J. Friml, R. Simon, T. Beeckman, and L. De Veylder, 2011, Auxin-Dependent Cell Cycle Reactivation through Transcriptional Regulation of *Arabidopsis* E2Fa by Lateral Organ Boundary Proteins: *Plant Cell*, v. 23, p. 3671-3683.
- Besserer, A., G. Becard, A. Jauneau, C. Roux, and N. Sejalon-Delmas, 2008, GR24, a synthetic analog of strigolactones, stimulates the mitosis and growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* by boosting its energy metabolism: *Plant Physiology*, v. 148, p. 402-413.
- Besserer, A., V. Puech-Pages, P. Kiefer, V. Gomez-Roldan, A. Jauneau, S. Roy, J. C. Portais, C. Roux, G. Becard, and N. Sejalon-Delmas, 2006, Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria: *PLoS Biol*, v. 4, p. e226.
- Bhalerao, R. P., J. Eklöf, K. Ljung, A. Marchant, M. Bennett, and G. Sandberg, 2002, Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings: *Plant Journal*, v. 29, p. 325-332.
- Bhuvaneswari, T. V., A. A. Bhagwat, and W. D. Bauer, 1981, Transient susceptibility of root-cells in 4 common legumes to nodulation by rhizobia: *Plant Physiology*, v. 68, p. 1144-1149.
- Bielach, A., K. Podlesakova, P. Marhavy, J. Duclercq, C. Cuesta, B. Muller, W. Grunewald, P. Tarkowski, and E. Benkova, 2012, Spatiotemporal Regulation of Lateral Root Organogenesis in *Arabidopsis* by Cytokinin: *Plant Cell*, v. 24, p. 3967-3981.
- Blilou, I., J. Xu, M. Wildwater, V. Willemsen, I. Paponov, J. Friml, R. Heidstra, M. Aida, K. Palme, and B. Scheres, 2005, The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots: *Nature*, v. 433, p. 39-44.
- Boisson-Dernier, A., M. Chabaud, F. Garcia, G. Becard, C. Rosenberg, and D. G. Barker, 2001, *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations: *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 14, p. 695-700.
- Boot, K. J. M., A. A. N. van Brussel, T. Tak, H. P. Spaink, and J. W. Kijne, 1999, Lipochitin oligosaccharides from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* reduce auxin transport capacity in *Vicia sativa* subsp *nigra* roots: *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 12, p. 839-844.
- Boualem, A., P. Laporte, M. Jovanovic, C. Laffont, J. Plet, J. P. Combier, A. Niebel, M. Crespi, and F. Frugier, 2008, MicroRNA166 controls root and nodule development in *Medicago truncatula*: *Plant Journal*, v. 54, p. 876-887.
- Brady, S. M., S. F. Sarkar, D. Bonetta, and P. McCourt, 2003, The ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3) gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signaling and lateral root development in *Arabidopsis*: *Plant Journal*, v. 34, p. 67-75.
- Brundrett, M. C., 2009, Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis: *Plant and Soil*, v. 320, p. 37-77.
- Brunoud, G., D. M. Wells, M. Oliva, A. Larrieu, V. Mirabet, A. H. Burrow, T. Beeckman, S. Kepinski, J. Traas, M. J. Bennett, and T. Vernoux, 2012, A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution: *Nature*, v. 482, p. 103-U132.
- Byrne, J. M., T. C. Pesacreta, and J. A. Fox, 1977, Development and structure of vascular connection between primary and secondary root of *Glycine-max*-(L) Merr: *American Journal of Botany*, v. 64, p. 946-959.
- Casero, P. J., I. Casimiro, and P. G. Lloret, 1996, Pericycle proliferation pattern during the lateral root initiation in adventitious roots of *Allium cepa*: *Protoplasma*, v. 191, p. 136-147.

- Casimiro, I., A. Marchant, R. P. Bhalerao, T. Beeckman, S. Dhooge, R. Swarup, N. Graham, D. Inze, G. Sandberg, P. J. Casero, and M. Bennett, 2001, Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation: *Plant Cell*, v. 13, p. 843-852.
- Catoira, R., C. Galera, F. de Billy, R. V. Penmetsa, E. P. Journet, F. Maillet, C. Rosenberg, D. Cook, C. Gough, and J. Denarie, 2000, Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway: *Plant Cell*, v. 12, p. 1647-66.
- Chabaud, M., F. de Carvalho-Niebel, and D. G. Barker, 2003, Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1: *Plant Cell Reports*, v. 22, p. 46-51.
- Chang, L., E. Ramireddy, and T. Schmulling, 2013, Lateral root formation and growth of *Arabidopsis* is redundantly regulated by cytokinin metabolism and signalling genes: *Journal of Experimental Botany*, v. 64, p. 5021-5032.
- Chen, Y. R., Y. S. Yordanov, C. Ma, S. Strauss, and V. B. Busov, 2013, DR5 as a reporter system to study auxin response in *Populus*: *Plant Cell Reports*, v. 32, p. 453-463.
- Complainville, A., L. Brocard, I. Roberts, E. Dax, N. Sever, N. Sauer, A. Kondorosi, S. Wolf, K. Oparka, and M. Crespi, 2003, Nodule initiation involves the creation of a new symplasmic field in specific root cells of *Medicago* species: *Plant Cell*, v. 15, p. 2778-2791.
- Cook, C. E., L. P. Whichard, B. Turner, and M. E. Wall, 1966, Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour) - Isolation and properties of a potent stimulant: *Science*, v. 154, p. 1189-&.
- Cook, D. R., 1999, *Medicago truncatula* - a model in the making! Commentary: *Current Opinion in Plant Biology*, v. 2, p. 301-304.
- Cosgrove, D. J., 2000, Loosening of plant cell walls by expansins: *Nature*, v. 407, p. 321-326.
- Couzigou, J. M., V. Zhukov, S. Mondy, G. Abu el Heba, V. Cosson, T. H. N. Ellis, M. Ambrose, J. Q. Wen, M. Tadege, I. Tikhonovich, K. S. Mysore, J. Putterill, J. Hofer, A. Y. Borisov, and P. Ratet, 2012, NODULE ROOT and COCHLEATA Maintain Nodule Development and Are Legume Orthologs of Arabidopsis BLADE-ON-PETIOLE Genes: *Plant Cell*, v. 24, p. 4498-4510.
- de Billy, F., C. Grosjean, S. May, M. Bennett, and J. V. Cullimore, 2001, Expression studies on AUX1-like genes in *Medicago truncatula* suggest that auxin is required at two steps in early nodule development: *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 14, p. 267-277.
- De Rybel, B., V. Vassileva, B. Parizot, M. Demeulenaere, W. Grunewald, D. Audenaert, J. Van Campenhout, P. Overvoorde, L. Jansen, S. Vanneste, B. Moller, M. Wilson, T. Holman, G. Van Isterdael, G. Brunoud, M. Vuylsteke, T. Vernoux, L. De Veylder, D. Inze, D. Weijers, M. J. Bennett, and T. Beeckman, 2010, A Novel Aux/IAA28 Signaling Cascade Activates GATA23-Dependent Specification of Lateral Root Founder Cell Identity: *Current Biology*, v. 20, p. 1697-1706.
- De Smet, I., S. Lau, U. Voss, S. Vanneste, R. Benjamins, E. H. Rademacher, A. Schlereth, B. De Rybel, V. Vassileva, W. Grunewald, M. Naudts, M. P. Levesque, J. S. Ehrismann, D. Inze, C. Luschnig, P. N. Benfey, D. Weijers, M. C. E. Van Montagu, M. J. Bennett, G. Jurgens, and T. Beeckman, 2010, Bimodular auxin response controls organogenesis in *Arabidopsis*: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, p. 2705-2710.
- De Smet, I., L. Signora, T. Beeckman, D. Inze, C. H. Foyer, and H. M. Zhang, 2003, An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*: *Plant Journal*, v. 33, p. 543-555.
- De Smet, I., T. Tetsumura, B. De Rybel, N. F. D. Frey, L. Laplaze, I. Casimiro, R. Swarup, M. Naudts, S. Vanneste, D. Audenaert, D. Inze, M. J. Bennett, and T. Beeckman, 2007, Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*: *Development*, v. 134, p. 681-690.
- De Smet, I., V. Vassileva, B. De Rybel, M. P. Levesque, W. Grunewald, D. Van Damme, G. Van Noorden, M. Naudts, G. Van Isterdael, R. De Clercq, J. Y. Wang, N. Meuli, S. Vanneste, J. Friml, P. Hilson, G. Jurgens, G. C. Ingram, D. Inze, P. N. Benfey, and T. Beeckman, 2008, Receptor-like kinase ACR4 restricts formative cell divisions in the *Arabidopsis* root: *Science*, v. 322, p. 594-597.
- De Smet, I., H. M. Zhang, D. Inze, and T. Beeckman, 2006, A novel role for abscisic acid emerges from underground: *Trends in Plant Science*, v. 11, p. 434-439.

- de Zelicourt, A., A. Diet, J. Marion, C. Laffont, F. Ariel, M. Moison, O. Zahaf, M. Crespi, V. Gruber, and F. Frugier, 2012, Dual involvement of a *Medicago truncatula* NAC transcription factor in root abiotic stress response and symbiotic nodule senescence: *Plant J*, v. 70, p. 220-30.
- Debilly, F., D. G. Barker, P. Gallusci, and G. Truchet, 1991, Leghemoglobin gene-transcription is triggered in a single cell layer in the indeterminate nitrogen-fixing root nodule of alfalfa: *Plant Journal*, v. 1, p. 27-35.
- Delaux, P. M., G. Becard, and J. P. Combier, 2013, NSP1 is a component of the Myc signaling pathway: *New Phytologist*, v. 199, p. 59-65.
- DeMason, D. A., and P. L. Polowick, 2009, Patterns of DR5::GUS expression in organs of pea (*Pisum sativum*): *International Journal of Plant Sciences*, v. 170, p. 1-11.
- Demchenko, N. P., and K. N. Demchenko, 2001, Resumption of DNA synthesis and cell division in wheat roots as related to lateral root initiation: *Russian Journal of Plant Physiology*, v. 48, p. 755-763.
- Den Herder, G., G. Van Isterdael, T. Beeckman, and I. De Smet, 2010, The roots of a new green revolution: *Trends in Plant Science*, v. 15, p. 600-607.
- Denarie, J., F. Debelle, and J. C. Prome, 1996, *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis: *Annual Review of Biochemistry*, v. 65, p. 503-535.
- Desbrosses, G. J., and J. Stougaard, 2011, Root nodulation: a paradigm for how plant-microbe symbiosis influences host developmental pathways: *Cell Host Microbe*, v. 10, p. 348-58.
- Di Laurenzio, L., J. Wysocka-Diller, J. E. Malamy, L. Pysh, Y. Helariutta, G. Freshour, M. G. Hahn, K. A. Feldmann, and P. N. Benfey, 1996, The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root: *Cell*, v. 86, p. 423-33.
- Dickie, I. A., L. B. Martinez-Garcia, N. Koele, G. A. Grelet, J. M. Tylianakis, D. A. Peltzer, and S. J. Richardson, 2013, Mycorrhizas and mycorrhizal fungal communities throughout ecosystem development: *Plant and Soil*, v. 367, p. 11-39.
- DiDonato, R. J., E. Arbuckle, S. Buker, J. Sheets, J. Tobar, R. Totong, P. Grisafi, G. R. Fink, and J. L. Celenza, 2004, *Arabidopsis* ALF4 encodes a nuclear-localized protein required for lateral root formation: *Plant Journal*, v. 37, p. 340-353.
- Ding, Y., P. Kalo, C. Yendrek, J. Sun, Y. Liang, J. F. Marsh, J. M. Harris, and G. E. Oldroyd, 2008, Abscisic acid coordinates nod factor and cytokinin signaling during the regulation of nodulation in *Medicago truncatula*: *Plant Cell*, v. 20, p. 2681-95.
- Ditengou, F. A., W. D. Tealea, P. Kochersperger, K. A. Flittner, I. Kneuper, E. van der Graaff, H. Nziengui, F. Pinosa, X. G. Li, R. Nitschke, T. Laux, and K. Palme, 2008, Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, p. 18818-18823.
- Dubrovsky, J. G., G. A. Gambetta, A. Hernandez-Barrera, S. Shishkova, and I. Gonzalez, 2006, Lateral root initiation in *Arabidopsis*: Developmental window, spatial patterning, density and predictability: *Annals of Botany*, v. 97, p. 903-915.
- Dubrovsky, J. G., S. Napsucially-Mendivil, J. Duclercq, Y. Cheng, S. Shishkova, M. G. Ivanchenko, J. Friml, A. S. Murphy, and E. Benkova, 2011, Auxin minimum defines a developmental window for lateral root initiation: *New Phytol*, v. 191, p. 970-83.
- Dubrovsky, J. G., M. Sauer, S. Napsucially-Mendivil, M. G. Ivanchenko, J. Friml, S. Shishkova, J. Celenza, and E. Benkova, 2008, Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 105, p. 8790-4.
- Duc, G., and A. Messenger, 1989, Mutagenesis of pea (*Pisum-sativum*-L) and the isolation of mutants for nodulation and nitrogen-fixation: *Plant Science*, v. 60, p. 207-213.
- Felten, J., A. Kohler, E. Morin, R. P. Bhalerao, K. Palme, F. Martin, F. A. Ditengou, and V. Legue, 2009, The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates lateral root formation in poplar and *Arabidopsis* through auxin transport and signaling: *Plant Physiol*, v. 151, p. 1991-2005.
- Ferguson, B. J., and C. A. Beveridge, 2009, Roles for Auxin, Cytokinin, and Strigolactone in Regulating Shoot Branching: *Plant Physiology*, v. 149, p. 1929-1944.
- Ferguson, B. J., E. Foo, J. J. Ross, and J. B. Reid, 2011, Relationship between gibberellin, ethylene and nodulation in *Pisum sativum*: *New Phytologist*, v. 189, p. 829-842.

- Ferguson, B. J., and U. Mathesius, 2003, Signaling interactions during nodule development: *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 22, p. 47-72.
- Fliegmann, J., S. Canova, C. Lachaud, S. Uhlenbroich, V. Gascioli, C. Pichereaux, M. Rossignol, C. Rosenberg, M. Cumener, D. Pitorre, B. Lefebvre, C. Gough, E. Samain, S. Fort, H. Driguez, B. Vauzeilles, J.-M. Beau, A. Nurisso, A. Imberty, J. Cullimore, and J.-J. Bono, 2013, Lipochitooligosaccharidic Symbiotic Signals Are Recognized by LysM Receptor-Like Kinase LYR3 in the Legume *Medicago truncatula*: *ACS Chemical Biology*, v. 8, p. 1900-1906.
- Foo, E., 2013, Auxin influences strigolactones in pea mycorrhizal symbiosis: *Journal of Plant Physiology*, v. 170, p. 523-528.
- Foo, E., J. J. Ross, W. T. Jones, and J. B. Reid, 2013, Plant hormones in arbuscular mycorrhizal symbioses: an emerging role for gibberellins: *Annals of Botany*, v. 111, p. 769-779.
- Formey, D., M. Moles, A. Haouy, B. Savelli, O. Bouchez, G. Becard, and C. Roux, 2012, Comparative analysis of mitochondrial genomes of *Rhizophagus irregularis* - syn. *Glomus irregulare* - reveals a polymorphism induced by variability generating elements: *New Phytologist*, v. 196, p. 1217-1227.
- Fournier, J., A. C. J. Timmers, B. J. Sieberer, A. Jauneau, M. Chabaud, and D. G. Barker, 2008, Mechanism of Infection Thread Elongation in Root Hairs of *Medicago truncatula* and Dynamic Interplay with Associated Rhizobial Colonization: *Plant Physiology*, v. 148, p. 1985-1995.
- Friml, J., A. Vieten, M. Sauer, D. Weijers, H. Schwarz, T. Hamann, R. Offringa, and G. Jurgens, 2003, Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*: *Nature*, v. 426, p. 147-153.
- Frugier, F., S. Kosuta, J. D. Murray, M. Crespi, and K. Szczyglowski, 2008, Cytokinin: secret agent of symbiosis: *Trends Plant Sci*, v. 13, p. 115-20.
- Fukaki, H., S. Tameda, H. Masuda, and M. Tasaka, 2002, Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of *Arabidopsis*: *Plant Journal*, v. 29, p. 153-168.
- Fukaki, H., and M. Tasaka, 2009, Hormone interactions during lateral root formation: *Plant Mol Biol*, v. 69, p. 437-49.
- Geil, R. D., R. L. Peterson, and F. C. Guinel, 2001, Morphological alterations of pea (*Pisum sativum* cv. Sparkle) arbuscular mycorrhizas as a result of exogenous ethylene treatment: *Mycorrhiza*, v. 11, p. 137-143.
- Genre, A., M. Chabaud, C. Balzergue, V. Puech-Pages, M. Novero, T. Rey, J. Fournier, S. Rochange, G. Becard, P. Bonfante, and D. G. Barker, 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 Phytologist*, v. 198, p. 179-189.
- Genre, A., M. Chabaud, T. Timmers, P. Bonfante, and D. G. Barker, 2005, Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection: *Plant Cell*, v. 17, p. 3489-3499.
- Geurts, R., A. Lillo, and T. Bisseling, 2012, Exploiting an ancient signalling machinery to enjoy a nitrogen fixing symbiosis: *Current Opinion in Plant Biology*, v. 15, p. 438-443.
- Gifford, M. L., A. Dean, R. A. Gutierrez, G. M. Coruzzi, and K. D. Birnbaum, 2008, Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, p. 803-808.
- Giraud, E., L. Moulin, D. Vallenet, V. Barbe, E. Cytryn, J. C. Avarre, M. Jaubert, D. Simon, F. Cartieaux, Y. Prin, G. Bena, L. Hannibal, J. Fardoux, M. Kojadinovic, L. Vuillet, A. Lajus, S. Cruveiller, Z. Rouy, S. Mangenot, B. Segurens, C. Dossat, W. L. Franck, W. S. Chang, E. Saunders, D. Bruce, P. Richardson, P. Normand, B. Dreyfus, D. Pignol, G. Stacey, D. Emerich, A. Vermeglio, C. Medigue, and M. Sadowsky, 2007, Legumes symbioses: Absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia: *Science*, v. 316, p. 1307-1312.
- Gobbato, E., J. F. Marsh, T. Vernie, E. Wang, F. Maillet, J. Kim, J. B. Miller, J. Sun, S. A. Bano, P. Ratet, K. S. Mysore, J. Denarie, M. Schultze, and G. E. D. Oldroyd, 2012, A GRAS-Type Transcription Factor with a Specific Function in Mycorrhizal Signaling: *Current Biology*, v. 22, p. 2236-2241.

- Godiard, L., A. Lepage, S. Moreau, D. Laporte, M. Verdenaud, T. Timmers, and P. Gamas, 2011, MtBHLH1, a bHLH transcription factor involved in *Medicago truncatula* nodule vascular patterning and nodule to plant metabolic exchanges: *New Phytol.*, v. 191, p. 391-404.
- Gomez-Roldan, V., S. Fermas, P. B. Brewer, V. Puech-Pages, E. A. Dun, J. P. Pillot, F. Letisse, R. Matusova, S. Danoun, J. C. Portais, H. Bouwmeester, G. Becard, C. A. Beveridge, C. Rameau, and S. F. Rochange, 2008, Strigolactone inhibition of shoot branching: *Nature*, v. 455, p. 189-94.
- Gonzalez-Rizzo, S., M. Crespi, and F. Frugier, 2006, The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*: *Plant Cell*, v. 18, p. 2680-93.
- Goormachtig, S., W. Capoen, and M. Holsters, 2004, Rhizobium infection: lessons from the versatile nodulation behaviour of water-tolerant legumes: *Trends in Plant Science*, v. 9, p. 518-522.
- Gough, C., and J. Cullimore, 2011, Lipo-chitoooligosaccharide Signaling in Endosymbiotic Plant-Microbe Interactions: *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 24, p. 867-878.
- Guan, D., N. Stacey, C. W. Liu, J. Q. Wen, K. S. Mysore, I. Torres-Jerez, T. Vernie, M. Tadege, C. N. Zhou, Z. Y. Wang, M. K. Udvardi, G. E. D. Oldroyd, and J. D. Murray, 2013, Rhizobial Infection Is Associated with the Development of Peripheral Vasculature in Nodules of *Medicago truncatula*: *Plant Physiology*, v. 162, p. 107-115.
- Guether, M., B. Neuhauser, R. Balestrini, M. Dynowski, U. Ludewig, and P. Bonfante, 2009, A Mycorrhizal-Specific Ammonium Transporter from *Lotus japonicus* Acquires Nitrogen Released by Arbuscular Mycorrhizal Fungi: *Plant Physiology*, v. 150, p. 73-83.
- Haag, A. F., M. F. F. Arnold, K. K. Myka, B. Kerscher, S. Dall'Angelo, M. Zanda, P. Mergaert, and G. P. Ferguson, 2013, Molecular insights into bacteroid development during Rhizobium-legume symbiosis: *Fems Microbiology Reviews*, v. 37, p. 364-383.
- Hanlon, M. T., and C. Coenen, 2011, Genetic evidence for auxin involvement in arbuscular mycorrhiza initiation: *New Phytologist*, v. 189, p. 701-709.
- Harrison, M. J., 2005, Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: *Annual Review of Microbiology*, v. 59, p. 19-42.
- Harrison, M. J., G. R. Dewbre, and J. Y. Liu, 2002, A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi: *Plant Cell*, v. 14, p. 2413-2429.
- Hause, B., C. Mrosk, S. Isayenkov, and D. Strack, 2007, Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions: *Phytochemistry*, v. 68, p. 101-110.
- Heidstra, R., W. C. Yang, Y. Yalcin, S. Peck, A. M. Emons, A. vanKammen, and T. Bisseling, 1997, Ethylene provides positional information on cortical cell division but is not involved in Nod factor-induced root hair tip growth in Rhizobium-legume interaction: *Development*, v. 124, p. 1781-1787.
- Heisler, M. G., C. Ohno, P. Das, P. Sieber, G. V. Reddy, J. A. Long, and E. M. Meyerowitz, 2005, Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem: *Curr Biol*, v. 15, p. 1899-911.
- Herrbach, V., C. Rembliere, C. Gough, and S. Bensmihen, 2014, Lateral root formation and patterning in *Medicago truncatula*: *Journal of Plant Physiology*, v. 171, p. 301-310.
- Herrera-Medina, M. J., S. Steinkellner, H. Vierheilig, J. A. O. Bote, and J. M. G. Garrido, 2007, Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza: *New Phytologist*, v. 175, p. 554-564.
- Himanen, K., E. Boucheron, S. Vanneste, J. de Almeida Engler, D. Inze, and T. Beeckman, 2002, Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation: *Plant Cell*, v. 14, p. 2339-51.
- Hirota, A., T. Kato, H. Fukaki, M. Aida, and M. Tasaka, 2007, The auxin-regulated AP2/EREBP gene PUCHI is required for morphogenesis in the early lateral root primordium of *Arabidopsis*: *Plant Cell*, v. 19, p. 2156-2168.
- Hirsch, A. M., 1992, Developmental biology of legume nodulation: *New Phytologist*, v. 122, p. 211-237.
- Hirsch, A. M., T. V. Bhuvaneshwari, J. G. Torrey, and T. Bisseling, 1989, Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 86, p. 1244-1248.
- Hirsch, S., and G. E. Oldroyd, 2009, GRAS-domain transcription factors that regulate plant development: *Plant Signal Behav.*, v. 4, p. 698-700.

- Hochholdinger, F., W. J. Park, M. Sauer, and K. Woll, 2004, From weeds to crops: genetic analysis of root development in cereals: *Trends in Plant Science*, v. 9, p. 42-48.
- Humphreys, C. P., P. J. Franks, M. Rees, M. I. Bidartondo, J. R. Leake, and D. J. Beerling, 2010, Mutualistic mycorrhiza-like symbiosis in the most ancient group of land plants: *Nature Communications*, v. 1.
- Huo, X., E. Schnabel, K. Hughes, and J. Frugoli, 2006, RNAi Phenotypes and the Localization of a Protein::GUS Fusion Imply a Role for *Medicago truncatula* PIN Genes in Nodulation: *J Plant Growth Regul*, v. 25, p. 156-165.
- Ivanchenko, M. G., G. K. Muday, and J. G. Dubrovsky, 2008, Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*: *Plant Journal*, v. 55, p. 335-347.
- Jansen, L., I. Roberts, R. De Rycke, and T. Beeckman, 2012, Phloem-associated auxin response maxima determine radial positioning of lateral roots in maize: *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, v. 367, p. 1525-1533.
- Jones, A. M., K. H. Im, M. A. Savka, M. J. Wu, N. G. DeWitt, R. Shillito, and A. N. Binns, 1998, Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein 1: *Science*, v. 282, p. 1114-1117.
- Journet, E. P., N. El-Gachtouli, V. Vernoud, F. de Billy, M. Pichon, A. Dedieu, C. Arnould, D. Morandi, D. G. Barker, and V. Gianinazzi-Pearson, 2001, *Medicago truncatula* ENOD11: A novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells: *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 14, p. 737-748.
- Jung, J. K. H., and S. R. McCouch, 2013, Getting to the roots of it: Genetic and hormonal control of root architecture: *Frontiers in Plant Science*, v. 4.
- Kapulnik, Y., P. M. Delaux, N. Resnick, E. Mayzlish-Gati, S. Wininger, C. Bhattacharya, N. Sejalon-Delmas, J. P. Combier, G. Becard, E. Belausov, T. Beeckman, E. Dor, J. Hershenhorn, and H. Koltai, 2011, Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in *Arabidopsis*: *Planta*, v. 233, p. 209-16.
- Kereszt, A., P. Mergaert, and E. Kondorosi, 2011, Bacteroid Development in Legume Nodules: Evolution of Mutual Benefit or of Sacrificial Victims?: *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 24, p. 1300-1309.
- Kieffer, M., J. Neve, and S. Kepinski, 2010, Defining auxin response contexts in plant development: *Current Opinion in Plant Biology*, v. 13, p. 12-20.
- Kisiala, A., C. Laffont, R. J. N. Emery, and F. Frugier, 2013, Bioactive Cytokinins Are Selectively Secreted by *Sinorhizobium meliloti* Nodulating and Nonnodulating Strains: *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 26, p. 1225-1231.
- Kloppholz, S., H. Kuhn, and N. Requena, 2011, A Secreted Fungal Effector of *Glomus intraradices* Promotes Symbiotic Biotrophy: *Current Biology*, v. 21, p. 1204-1209.
- Kohlen, W., C. Ruyter-Spira, and H. J. Bouwmeester, 2011, Strigolactones: a new musician in the orchestra of plant hormones: *Botany-Botanique*, v. 89, p. 827-840.
- Kondorosi, E., P. Mergaert, and A. Kereszt, 2013, A Paradigm for Endosymbiotic Life: Cell Differentiation of *Rhizobium* Bacteria Provoked by Host Plant Factors: *Annual Review of Microbiology*, v. 67, p. 611-628.
- Krecek, P., P. Skupa, J. Libus, S. Naramoto, R. Tejos, J. Friml, and E. Zazimalova, 2009, The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters: *Genome Biol*, v. 10, p. 249.
- Krouk, G., B. Lacombe, A. Bielach, F. Perrine-Walker, K. Malinska, E. Mounier, K. Hoyerova, P. Tillard, S. Leon, K. Ljung, E. Zazimalova, E. Benkova, P. Nacry, and A. Gojon, 2010, Nitrate-Regulated Auxin Transport by NRT1.1 Defines a Mechanism for Nutrient Sensing in Plants: *Developmental Cell*, v. 18, p. 927-937.
- Kuppusamy, K. T., S. Ivashuta, B. Bucciarelli, C. P. Vance, J. S. Gantt, and K. A. Vandenbosch, 2009, Knockdown of CELL DIVISION CYCLE16 reveals an inverse relationship between lateral root and nodule numbers and a link to auxin in *Medicago truncatula*: *Plant Physiol*, v. 151, p. 1155-66.
- Lal, R., 2010, Managing soils for a warming earth in a food-insecure and energy-starved world: *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, v. 173, p. 4-15.
- Laplaze, L., E. Benkova, I. Casimiro, L. Maes, S. Vanneste, R. Swarup, D. Weijers, V. Calvo, B. Parizot, M. B. Herrera-Rodriguez, R. Offringa, N. Graham, P. Dumas, J. Friml, D. Bogusz, T.

- Beeckman, and M. Bennett, 2007, Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation: *Plant Cell*, v. 19, p. 3889-3900.
- Larkin, P. J., J. M. Gibson, U. Mathesius, J. J. Weinman, E. Gartner, E. Hall, G. J. Tanner, B. G. Rolfe, and M. A. Djordjevic, 1996, Transgenic white clover. Studies with the auxin-responsive promoter, GH3, in root gravitropism and lateral root development: *Transgenic Res*, v. 5, p. 325-35.
- Laskowski, M., 2013, Lateral root initiation is a probabilistic event whose frequency is set by fluctuating levels of auxin response: *Journal of Experimental Botany*, v. 64, p. 2609-2617.
- Laskowski, M., S. Biller, K. Stanley, T. Kajstura, and R. Prusty, 2006, Expression profiling of auxin-treated *Arabidopsis* roots: Toward a molecular analysis of lateral root emergence: *Plant and Cell Physiology*, v. 47, p. 788-792.
- Laskowski, M., V. A. Grieneisen, H. Hofhuis, C. A. ten Hove, P. Hogeweg, A. F. M. Maree, and B. Scheres, 2008, Root System Architecture from Coupling Cell Shape to Auxin Transport: *Plos Biology*, v. 6, p. 2721-2735.
- Laskowski, M. J., M. E. Williams, H. C. Nusbaum, and I. M. Sussex, 1995, Formation of lateral root-meristems is a 2-stage process: *Development*, v. 121, p. 3303-3310.
- Lavenus, J., T. Goh, I. Roberts, S. Guyomarc'h, M. Lucas, I. De Smet, H. Fukaki, T. Beeckman, M. Bennett, and L. Laplaze, 2013, Lateral root development in *Arabidopsis*: fifty shades of auxin: *Trends in Plant Science*, v. 18, p. 455-463.
- Lerouge, P., P. Roche, C. Faucher, F. Maillet, G. Truchet, J. C. Prome, and J. Denarie, 1990, Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal: *Nature*, v. 344, p. 781-4.
- Levy, J., C. Bres, R. Geurts, B. Chalhoub, O. Kulikova, G. Duc, E. P. Journet, J. M. Ane, E. Lauber, T. Bisseling, J. Denarie, C. Rosenberg, and F. Debelle, 2004, A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses: *Science*, v. 303, p. 1361-4.
- Lewis, D. R., S. Negi, P. Sukumar, and G. K. Muday, 2011, Ethylene inhibits lateral root development, increases IAA transport and expression of PIN3 and PIN7 auxin efflux carriers: *Development*, v. 138, p. 3485-3495.
- Li, X., X. R. Mo, H. X. Shou, and P. Wu, 2006, Cytokinin-mediated cell cycling arrest of pericycle founder cells in lateral root initiation of *Arabidopsis*: *Plant and Cell Physiology*, v. 47, p. 1112-1123.
- Liang, Y., and J. M. Harris, 2005, Response of root branching to abscisic acid is correlated with nodule formation both in legumes and nonlegumes: *American Journal of Botany*, v. 92, p. 1675-1683.
- Limpens, E., R. Mirabella, E. Fedorova, C. Franken, H. Franssen, T. Bisseling, and R. Geurts, 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*, v. 102, p. 10375-10380.
- Lin, B. L., and V. Raghavan, 1991, Lateral root initiation in *Marsilea-quadrifolia* .1. Origin and histogenesis of lateral roots: *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, v. 69, p. 123-135.
- Liu, W., W. Kohlen, A. Lillo, R. Op den Camp, S. Ivanov, M. Hartog, E. Limpens, M. Jamil, C. Smaczniak, K. Kaufmann, W. C. Yang, G. Hooiveld, T. Charnikhova, H. J. Bouwmeester, T. Bisseling, and R. Geurts, 2011, Strigolactone Biosynthesis in *Medicago truncatula* and Rice Requires the Symbiotic GRAS-Type Transcription Factors NSP1 and NSP2: *Plant Cell*, v. 23, p. 3853-3865.
- Ljung, K., A. K. Hull, J. Celenza, M. Yamada, M. Estelle, J. Nonmanly, and G. Sandberg, 2005, Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots: *Plant Cell*, v. 17, p. 1090-1104.
- Lohar, D., J. Stiller, J. Kam, G. Stacey, and P. M. Gresshoff, 2009, Ethylene insensitivity conferred by a mutated *Arabidopsis* ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic *Lotus japonicus*: *Ann Bot*, v. 104, p. 277-85.
- Lohar, D. P., J. E. Schaff, J. G. Laskey, J. J. Kieber, K. D. Bilyeu, and D. M. Bird, 2004, Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and Rhizobial symbioses: *Plant J*, v. 38, p. 203-14.
- Lucas, M., C. Godin, C. Jay-Allemand, and L. Laplaze, 2008, Auxin fluxes in the root apex co-regulate gravitropism and lateral root initiation: *J Exp Bot*, v. 59, p. 55-66.

- Lucas, M., K. Kenobi, D. von Wangenheim, U. Voss, K. Swarup, I. De Smet, D. Van Damme, T. Lawrence, B. Peret, E. Moscardi, D. Barbeau, C. Godin, D. Salt, S. Guyomarc'h, E. H. K. Stelzer, A. Maizel, L. Laplace, and M. J. Bennett, 2013, Lateral root morphogenesis is dependent on the mechanical properties of the overlaying tissues: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, p. 5229-5234.
- Macleod, R. D., and A. Thompson, 1979, Development of lateral root primordia in *Vicia-faba*, *Pisum-sativum*, *Zea-mays* and *Phaseolus-vulgaris* - Rates of primordium formation and cell doubling times: *Annals of Botany*, v. 44, p. 435-449.
- Maekawa, T., M. Maekawa-Yoshikawa, N. Takeda, H. Imaizumi-Anraku, Y. Murooka, and M. Hayashi, 2009, Gibberellin controls the nodulation signaling pathway in *Lotus japonicus*: *Plant Journal*, v. 58, p. 183-194.
- Maillet, F., V. Poinso, O. Andre, V. Puech-Pages, A. Haouy, M. Gueunier, L. Cromer, D. Giraudet, D. Formey, A. Niebel, E. A. Martinez, H. Driguez, G. Becard, and J. Denarie, 2011, Fungal lipochitoooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza: *Nature*, v. 469, p. 58-63.
- Malamy, J. E., and P. N. Benfey, 1997, Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*: *Development*, v. 124, p. 33-44.
- Mallory, T. E., S. H. Chiang, E. G. Cutter, and E. M. Gifford, 1970, Sequence and pattern of lateral root formation in 5 selected species: *American Journal of Botany*, v. 57, p. 800-809.
- Maraschin, F. D., J. Memelink, and R. Offringa, 2009, Auxin-induced, SCFTIR1-mediated poly-ubiquitination marks AUX/IAA proteins for degradation: *Plant Journal*, v. 59, p. 100-109.
- Marchant, A., R. Bhalerao, I. Casimiro, J. Eklof, P. J. Casero, M. Bennett, and G. Sandberg, 2002, AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling: *Plant Cell*, v. 14, p. 589-597.
- Marhavy, P., M. Vanstraelen, B. De Rybel, Z. J. Ding, M. J. Bennett, T. Beeckman, and E. Benkova, 2013, Auxin reflux between the endodermis and pericycle promotes lateral root initiation: *Embo Journal*, v. 32, p. 149-158.
- Marin-Rodriguez, M. C., J. Orchard, and G. B. Seymour, 2002, Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening: *Journal of Experimental Botany*, v. 53, p. 2115-2119.
- Martin-Rodriguez, J., R. Leon-Morcillo, H. Vierheilig, J. A. Ocampo, J. Ludwig-Muller, and J. M. Garcia-Garrido, 2011, Ethylene-dependent/ethylene-independent ABA regulation of tomato plants colonized by arbuscular mycorrhiza fungi: *New Phytol.*
- Mason, M. G., D. E. Mathews, D. A. Argyros, B. B. Maxwell, J. J. Kieber, J. M. Alonso, J. R. Ecker, and G. E. Schaller, 2005, Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in *Arabidopsis*: *Plant Cell*, v. 17, p. 3007-3018.
- Masson-Boivin, C., E. Giraud, X. Perret, and J. Batut, 2009, Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes?: *Trends in Microbiology*, v. 17, p. 458-466.
- Mathesius, U., 2008, Auxin: at the root of nodule development?: *Functional Plant Biology*, v. 35, p. 651-668.
- Mathesius, U., H. R. Schlaman, H. P. Spaink, C. Of Sautter, B. G. Rolfe, and M. A. Djordjevic, 1998, Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides: *Plant J*, v. 14, p. 23-34.
- Mathesius, U., J. J. Weinman, B. G. Rolfe, and M. A. Djordjevic, 2000, Rhizobia can induce nodules in white clover by "hijacking" mature cortical cells activated during lateral root development: *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 13, p. 170-182.
- Mergaert, P., K. Nikovics, Z. Kelemen, N. Maunoury, D. Vaubert, A. Kondorosi, and E. Kondorosi, 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*, v. 132, p. 161-173.
- Miyawaki, K., P. Tarkowski, M. Matsumoto-Kitano, T. Kato, S. Sato, D. Tarkowska, S. Tabata, G. Sandberg, and T. Kakimoto, 2006, Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, p. 16598-16603.
- Moreira, S., A. Bishopp, H. Carvalho, and A. Campilho, 2013, AHP6 Inhibits Cytokinin Signaling to Regulate the Orientation of Pericycle Cell Division during Lateral Root Initiation: *Plos One*, v. 8.

- Moreno-Risueno, M. A., J. M. Van Norman, A. Moreno, J. Y. Zhang, S. E. Ahnert, and P. N. Benfey, 2010, Oscillating Gene Expression Determines Competence for Periodic Arabidopsis Root Branching: *Science*, v. 329, p. 1306-1311.
- Moriwaki, T., Y. Miyazawa, A. Kobayashi, M. Uchida, C. Watanabe, N. Fujii, and H. Takahashi, 2011, Hormonal Regulation of Lateral Root Development in Arabidopsis Modulated by MIZ1 and Requirement of GNOM Activity for MIZ1 Function: *Plant Physiology*, v. 157, p. 1209-1220.
- Moss, B., 2008, Water pollution by agriculture: *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, v. 363, p. 659-666.
- Muday, G. K., A. Rahman, and B. M. Binder, 2012, Auxin and ethylene: collaborators or competitors?: *Trends Plant Sci.*
- Mukherjee, A., and J. M. Ane, 2011, Germinating Spore Exudates from Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Molecular and Developmental Responses in Plants and Their Regulation by Ethylene: *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 24, p. 260-270.
- Murray, J. D., 2011, Invasion by Invitation: Rhizobial Infection in Legumes: *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 24, p. 631-639.
- Negi, S., M. G. Ivanchenko, and G. K. Muday, 2008, Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in Arabidopsis thaliana: *Plant J*, v. 55, p. 175-87.
- Nieuwland, J., S. Maughan, W. Dewitte, S. Scofield, L. Sanz, and J. A. H. Murray, 2009, The D-type cyclin CYCD4;1 modulates lateral root density in Arabidopsis by affecting the basal meristem region: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, p. 22528-22533.
- Nordstrom, A., P. Tarkowski, D. Tarkowska, R. Norbaek, C. Astot, K. Dolezal, and G. Sandberg, 2004, Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in Arabidopsis thaliana: A factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, p. 8039-8044.
- Nutman, P. S., 1948, Physiological studies on nodule formation .1. The relation between nodulation and lateral root formation in red clover: *Annals of Botany*, v. 12, p. 81-96.
- Oldroyd, G. E., and J. A. Downie, 2008, Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes: *Annu Rev Plant Biol*, v. 59, p. 519-46.
- Oldroyd, G. E., J. D. Murray, P. S. Poole, and J. A. Downie, 2011, The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis: *Annu Rev Genet*, v. 45, p. 119-44.
- Oldroyd, G. E. D., E. M. Engstrom, and S. R. Long, 2001, Ethylene inhibits the nod factor signal transduction pathway of Medicago truncatula: *Plant Cell*, v. 13, p. 1835-1849.
- Olivares, J., E. J. Bedmar, and J. Sanjuan, 2013, Biological Nitrogen Fixation in the Context of Global Change: *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 26, p. 486-494.
- Olàh, B., C. Briere, G. Becard, J. Denarie, and C. Gough, 2005, Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in Medicago truncatula via the DMI1/DMI2 signalling pathway: *Plant J*, v. 44, p. 195-207.
- Op den Camp, R. H., S. De Mita, A. Lillo, Q. Cao, E. Limpens, T. Bisseling, and R. Geurts, 2011, A phylogenetic strategy based on a legume-specific whole genome duplication yields symbiotic cytokinin type-A response regulators: *Plant Physiol*, v. 157, p. 2013-22.
- Orman-Ligeza, B., B. Parizot, P. P. Gantet, T. Beeckman, M. J. Bennett, and X. Draye, 2013, Post-embryonic root organogenesis in cereals: branching out from model plants: *Trends in Plant Science*, v. 18, p. 464-59.
- Ortu, G., R. Balestrini, P. A. Pereira, J. D. Becker, H. Kuster, and P. Bonfante, 2012, Plant Genes Related to Gibberellin Biosynthesis and Signaling Are Differentially Regulated during the Early Stages of AM Fungal Interactions: *Molecular Plant*, v. 5, p. 951-954.
- Overvoorde, P., H. Fukaki, and T. Beeckman, 2010, Auxin control of root development: *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v. 2, p. a001537.
- Pacios-Bras, C., H. R. M. Schlaman, K. Boot, P. Admiraal, J. M. Langerak, J. Stougaard, and H. P. Spaink, 2003, Auxin distribution in Lotus japonicus during root nodule development: *Plant Molecular Biology*, v. 52, p. 1169-1180.
- Parizot, B., L. Laplaze, L. Ricaud, E. Boucheron-Dubuisson, V. Bayle, M. Bonke, I. De Smet, S. R. Poethig, Y. Helariutta, J. Haseloff, D. Chriqui, T. Beeckman, and L. Nussaume, 2008, Diarch

- symmetry of the vascular bundle in *Arabidopsis* root encompasses the pericycle and is reflected in distich lateral root initiation: *Plant Physiology*, v. 146, p. 140-148.
- Parniske, M., 2008, Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses: *Nat Rev Microbiol*, v. 6, p. 763-75.
- Peck, M. C., R. F. Fisher, and S. R. Long, 2006, Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*: *J Bacteriol*, v. 188, p. 5417-27.
- Peer, W. A., A. Bandyopadhyay, J. J. Blakeslee, S. I. Makam, R. J. Chen, P. H. Masson, and A. S. Murphy, 2004, Variation in expression and protein localization of the PIN family of auxin efflux facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transport in *Arabidopsis thaliana*: *Plant Cell*, v. 16, p. 1898-1911.
- Peng, J., and R. Chen, 2011, Auxin efflux transporter MtPIN10 regulates compound leaf and flower development in *Medicago truncatula*: *Plant Signal Behav*, v. 6, p. 1537-44.
- Penmetsa, R. V., and D. R. Cook, 1997, A Legume Ethylene-Insensitive Mutant Hyperinfected by Its Rhizobial Symbiont: *Science*, v. 275, p. 527-30.
- Penmetsa, R. V., P. Uribe, J. Anderson, J. Lichtenzveig, J. C. Gish, Y. W. Nam, E. Engstrom, K. Xu, G. Sckisel, M. Pereira, J. M. Baek, M. Lopez-Meyer, S. R. Long, M. J. Harrison, K. B. Singh, G. B. Kiss, and D. R. Cook, 2008, The *Medicago truncatula* ortholog of *Arabidopsis* EIN2, *sickle*, is a negative regulator of symbiotic and pathogenic microbial associations: *Plant Journal*, v. 55, p. 580-595.
- Peret, B., B. De Rybel, I. Casimiro, E. Benkova, R. Swarup, L. Laplaze, T. Beeckman, and M. J. Bennett, 2009, *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story: *Trends Plant Sci*, v. 14, p. 399-408.
- Peret, B., G. W. Li, J. Zhao, L. R. Band, U. Voss, O. Postaire, D. T. Luu, O. Da Ines, I. Casimiro, M. Lucas, D. M. Wells, L. Lazzerini, P. Nacry, J. R. King, O. E. Jensen, A. R. Schaffner, C. Maurel, and M. J. Bennett, 2012, Auxin regulates aquaporin function to facilitate lateral root emergence: *Nature Cell Biology*, v. 14, p. 991-8.
- Peret, B., R. Swarup, L. Jansen, G. Devos, F. Auguy, M. Collin, C. Santi, V. Hocher, C. Franche, D. Bogusz, M. Bennett, and L. Laplaze, 2007, Auxin influx activity is associated with *Frankia* infection during actinorhizal nodule formation in *Casuarina glauca*: *Plant Physiology*, v. 144, p. 1852-1862.
- Perez-Torres, C. A., J. Lopez-Bucio, A. Cruz-Ramirez, E. Ibarra-Laclette, S. Dharmasiri, M. Estelle, and L. Herrera-Estrella, 2008, Phosphate Availability Alters Lateral Root Development in *Arabidopsis* by Modulating Auxin Sensitivity via a Mechanism Involving the TIR1 Auxin Receptor: *Plant Cell*, v. 20, p. 3258-3272.
- Perret, X., C. Staehelin, and W. J. Broughton, 2000, Molecular basis of symbiotic promiscuity: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 64, p. 180-201.
- Perrine-Walker, F., P. Dumas, M. Lucas, V. Vaissayre, N. J. Beauchemin, L. R. Band, J. Chopard, A. Crabos, G. Conejero, B. Peret, J. R. King, J. L. Verdeil, V. Hocher, C. Franche, M. J. Bennett, L. S. Tisa, and L. Laplaze, 2010, Auxin Carriers Localization Drives Auxin Accumulation in Plant Cells Infected by *Frankia* in *Casuarina glauca* Actinorhizal Nodules: *Plant Physiology*, v. 154, p. 1372-1380.
- Peters, N. K., J. W. Frost, and S. R. Long, 1986, A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium-meliloti* nodulation genes: *Science*, v. 233, p. 977-980.
- Pietraszewska-Bogiel, A., B. Lefebvre, M. A. Koini, D. Klaus-Heisen, F. L. W. Takken, R. Geurts, J. V. Cullimore, and T. W. J. Gadella, 2013, Interaction of *Medicago truncatula* Lysin Motif Receptor-Like Kinases, NFP and LYK3, Produced in *Nicotiana benthamiana* Induces Defence-Like Responses: *Plos One*, v. 8.
- Pitts, R. J., A. Cernac, and M. Estelle, 1998, Auxin and ethylene promote root hair elongation in *Arabidopsis*: *Plant Journal*, v. 16, p. 553-560.
- Plet, J., A. Wasson, F. Ariel, C. Le Signor, D. Baker, U. Mathesius, M. Crespi, and F. Frugier, 2011, MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*: *Plant J*, v. 65, p. 622-633.
- Plett, J. M., M. Kempainen, S. D. Kale, A. Kohler, V. Legue, A. Brun, B. M. Tyler, A. G. Pardo, and F. Martin, 2011, A Secreted Effector Protein of *Laccaria bicolor* Is Required for Symbiosis Development: *Current Biology*, v. 21, p. 1197-1203.

- Prayitno, J., N. Imin, B. G. Rolfe, and U. Mathesius, 2006a, Identification of ethylene-mediated protein changes during nodulation in *Medicago truncatula* using proteome analysis: *J Proteome Res*, v. 5, p. 3084-95.
- Prayitno, J., B. G. Rolfe, and U. Mathesius, 2006b, The Ethylene-insensitive sickle mutant of *Medicago truncatula* shows altered auxin transport regulation during nodulation: *Plant Physiol*, v. 142, p. 168-80.
- Pueppke, S. G., and W. J. Broughton, 1999, *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges: *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 12, p. 293-318.
- Pumplin, N., X. C. Zhang, R. D. Noar, and M. J. Harrison, 2012, Polar localization of a symbiosis-specific phosphate transporter is mediated by a transient reorientation of secretion: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109, p. E665-E672.
- Quint, M., L. S. Barkawi, K. T. Fan, J. D. Cohen, and W. M. Gray, 2009, *Arabidopsis* IAR4 Modulates Auxin Response by Regulating Auxin Homeostasis: *Plant Physiology*, v. 150, p. 748-758.
- Quittenden, L. J., N. W. Davies, J. A. Smith, P. P. Molesworth, N. D. Tivendale, and J. J. Ross, 2009, Auxin Biosynthesis in Pea: Characterization of the Tryptamine Pathway: *Plant Physiology*, v. 151, p. 1130-1138.
- Redecker, D., J. B. Morton, and T. D. Bruns, 2000, Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales): *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 14, p. 276-284.
- Richter, G. L., G. B. Monshausen, A. Krol, and S. Gilroy, 2009, Mechanical Stimuli Modulate Lateral Root Organogenesis: *Plant Physiology*, v. 151, p. 1855-1866.
- Riefler, M., O. Novak, M. Strnad, and T. Schmulling, 2006, *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism: *Plant Cell*, v. 18, p. 40-54.
- Rightmyer, A. P., and S. R. Long, 2011, Pseudonodule formation by wild-type and symbiotic mutant *Medicago truncatula* in response to auxin transport inhibitors: *Mol Plant Microbe Interact*, v. 24, p. 1372-84.
- Rival, P., F. de Billy, J. J. Bono, C. Gough, C. Rosenberg, and S. Bensmihen, 2012, Epidermal and cortical roles of NFP and DMI3 in coordinating early steps of nodulation in *Medicago truncatula*: *Development*, v. 139, p. 3383-3391.
- Roche, P., P. Lerouge, C. Ponthus, and J. C. Prome, 1991, Structural determination of bacterial nodulation factors involved in the *Rhizobium-meliloti-alfalfa* symbiosis: *Journal of Biological Chemistry*, v. 266, p. 10933-10940.
- Rose, R. J., K. E. Nolan, and L. Bicego, 1999, The development of the highly regenerable seed line Jemalong 2 HA for transformation of *Medicago truncatula* - Implications for regenerability via somatic embryogenesis: *Journal of Plant Physiology*, v. 155, p. 788-791.
- Ruyter-Spira, C., W. Kohlen, T. Charnikhova, A. van Zeijl, L. van Bezouwen, N. de Ruijter, C. Cardoso, J. A. Lopez-Raez, R. Matusova, R. Bours, F. Verstappen, and H. Bouwmeester, 2011, Physiological Effects of the Synthetic Strigolactone Analog GR24 on Root System Architecture in *Arabidopsis*: Another Belowground Role for Strigolactones?: *Plant Physiol*, v. 155, p. 721-34.
- Sagan, M., D. Morandi, E. Tarengi, and G. Duc, 1995, Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model-plant *Medicago-truncatula* (Gaertn) after gamma-ray mutagenesis: *Plant Science*, v. 111, p. 63-71.
- Sanz, L., W. Dewitte, C. Forzani, F. Patell, J. Nieuwland, B. Wen, P. Quelhas, S. De Jager, C. Titmus, A. Campilho, H. Ren, M. Estelle, H. Wang, and J. A. H. Murray, 2011, The *Arabidopsis* D-Type Cyclin CYCD2;1 and the Inhibitor ICK2/KRP2 Modulate Auxin-Induced Lateral Root Formation: *Plant Cell*, v. 23, p. 641-660.
- Sbabou, L., 2009, Diversité génétique du lupin au Maroc et étude du développement racinaire du lupin blanc sous stress abiotique par des approches de génomique fonctionnelle (Thèse de doctorat), Université Mohamed V, Agdal, Faculté des sciences, Rabat, http://toubkal.imist.ma/bitstream/handle/123456789/6970/THESE_SBABOU.pdf?sequence=1, 232 p.
- Sbabou, L., B. Bucciarelli, S. Miller, J. Liu, F. Berhada, A. Filali-Maltouf, D. Allan, and C. Vance, 2010, Molecular analysis of SCARECROW genes expressed in white lupin cluster roots: *J Exp Bot*, v. 61, p. 1351-63.

- Schnabel, E. L., and J. Frugoli, 2004, The PIN and LAX families of auxin transport genes in *Medicago truncatula*: *Mol Genet Genomics*, v. 272, p. 420-32.
- Sieberer, B. J., M. Chabaud, J. Fournier, A. C. Timmers, and D. G. Barker, 2012, A switch in Ca²⁺-spiking signature is concomitant with endosymbiotic microbe entry into cortical root cells of *Medicago truncatula*: *Plant Journal*, v. 69, p. 822-830.
- Sieberer, B. J., M. Chabaud, A. C. Timmers, A. Monin, J. Fournier, and D. G. Barker, 2009, A Nuclear-Targeted Cameleon Demonstrates Intranuclear Ca²⁺ Spiking in *Medicago truncatula* Root Hairs in Response to Rhizobial Nodulation Factors: *Plant Physiology*, v. 151, p. 1197-1206.
- Signora, L., I. De Smet, C. H. Foyer, and H. M. Zhang, 2001, ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*: *Plant Journal*, v. 28, p. 655-662.
- Simon, S., and J. Petrasek, 2011, Why plants need more than one type of auxin: *Plant Science*, v. 180, p. 454-460.
- Smit, P., E. Limpens, R. Geurts, E. Fedorova, E. Dolgikh, C. Gough, and T. Bisseling, 2007, *Medicago* LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling: *Plant Physiol*, v. 145, p. 183-91.
- Smith, S., and I. De Smet, 2012, Root system architecture: insights from *Arabidopsis* and cereal crops Introduction: *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, v. 367, p. 1441-1452.
- Spaepen, S., J. Vanderleyden, and R. Remans, 2007, Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling: *Fems Microbiology Reviews*, v. 31, p. 425-448.
- Spichal, L., T. Werner, I. Popa, M. Riefler, T. Schmulling, and M. Strnad, 2009, The purine derivative PI-55 blocks cytokinin action via receptor inhibition: *Febs Journal*, v. 276, p. 244-253.
- Sprent, J. I., and E. K. James, 2007, Legume evolution: Where do nodules and mycorrhizas fit in?: *Plant Physiology*, v. 144, p. 575-581.
- Sreevidya, V. S., R. J. Hernandez-Oane, P. Gyaneshwar, M. Lara-Flores, J. K. Ladha, and P. M. Reddy, 2010, Changes in auxin distribution patterns during lateral root development in rice: *Plant Science*, v. 178, p. 531-538.
- Stepanova, A. N., J. Yun, A. V. Likhacheva, and J. M. Alonso, 2007, Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots: *Plant Cell*, v. 19, p. 2169-2185.
- Sussex, I. M., J. A. Godoy, N. M. Kerk, M. J. Laskowski, H. C. Nusbaum, J. A. Welsch, and M. E. Williams, 1995, Cellular and molecular events in a newly organizing lateral root-meristem: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, v. 350, p. 39-43.
- Suzaki, T., K. Yano, M. Ito, Y. Umehara, N. Sukanuma, and M. Kawaguchi, 2012, Positive and negative regulation of cortical cell division during root nodule development in *Lotus japonicus* is accompanied by auxin response: *Development*, v. 139, p. 3997-4006.
- Swarup, K., E. Benkova, R. Swarup, I. Casimiro, B. Peret, Y. Yang, G. Parry, E. Nielsen, I. De Smet, S. Vanneste, M. P. Levesque, D. Carrier, N. James, V. Calvo, K. Ljung, E. Kramer, R. Roberts, N. Graham, S. Marillonnet, K. Patel, J. D. G. Jones, C. G. Taylor, D. P. Schachtman, S. May, G. Sandberg, P. Benfey, J. Friml, I. Kerr, T. Beeckman, L. Laplaze, and M. J. Bennett, 2008, The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence: *Nature Cell Biology*, v. 10, p. 946-954.
- Taylor, L. P., and E. Grotewold, 2005, Flavonoids as developmental regulators: *Current Opinion in Plant Biology*, v. 8, p. 317-323.
- Theunis, M., H. Kobayashi, W. J. Broughton, and E. Prinsen, 2004, Flavonoids, NodD1, NodD2, and nod-box NB15 modulate expression of the y4wEFG locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp strain NGR234: *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 17, p. 1153-1161.
- Timmers, A. C., M. C. Auriac, and G. Truchet, 1999, Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements: *Development*, v. 126, p. 3617-28.
- Tisserant, E., A. Kohler, P. Dozolme-Seddas, R. Balestrini, K. Benabdellah, A. Colard, D. Croll, C. Da Silva, S. K. Gomez, R. Koul, N. Ferrol, V. Fiorilli, D. Formey, P. Franken, N. Helber, M. Hijri, L. Lanfranco, E. Lindquist, Y. Liu, M. Malbreil, E. Morin, J. Poulain, H. Shapiro, D. van Tuinen, A. Waschke, C. Azcon-Aguilar, G. Becard, P. Bonfante, M. J. Harrison, H. Kuster, P. Lammers, U. Paszkowski, N. Requena, S. A. Rensing, C. Roux, I. R. Sanders, Y. Shachar-Hill, G. Tuskan,

- J. P. W. Young, V. Gianinazzi-Pearson, and F. Martin, 2012, The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont: *New Phytologist*, v. 193, p. 755-769.
- Tromas, A., I. Paponov, and C. Perrot-Rechenmann, 2010, AUXIN BINDING PROTEIN 1: functional and evolutionary aspects: *Trends in Plant Science*, v. 15, p. 436-446.
- Truchet, G., P. Roche, P. Lerouge, J. Vasse, S. Camut, F. Debilly, J. C. Prome, and J. Denarie, 1991, Sulfated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium-meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa: *Nature*, v. 351, p. 670-673.
- Ulmasov, T., J. Murfett, G. Hagen, and T. J. Guilfoyle, 1997, Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements: *Plant Cell*, v. 9, p. 1963-71.
- Umehara, M., A. Hanada, S. Yoshida, K. Akiyama, T. Arite, N. Takeda-Kamiya, H. Magome, Y. Kamiya, K. Shirasu, K. Yoneyama, J. Kyojuka, and S. Yamaguchi, 2008, Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones: *Nature*, v. 455, p. 195-200.
- Vanneste, S., B. De Rybel, G. T. S. Beemster, K. Ljung, I. De Smet, G. Van Isterdael, M. Naudts, R. Iida, W. Gruissem, M. Tasaka, D. Inze, H. Fukaki, and T. Beeckman, 2005, Cell cycle progression in the pericycle is not sufficient for SOLITARY ROOT/IAA14-mediated lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*: *Plant Cell*, v. 17, p. 3035-3050.
- Vanstraelen, M., and E. Benkova, 2012, Hormonal Interactions in the Regulation of Plant Development, *in* R. Schekman, L. Goldstein, and R. Lehmann, eds., *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol 28: *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 28: Palo Alto, Annual Reviews, p. 463-487.
- Venkateshwaran, M., B. K. Riely, E. Peiter, M. Otegui, J. Sun, A. B. Heckmann, G. Lougnon, A. Edwards, G. Freshour, M. G. Hahn, D. Sanders, G. D. Oldroyd, A. J. Downie, D. R. Cook, and J. Ane, 2008, The putative ion channel DMI1 localizes to the nuclear envelope and regulates nuclear calcium spiking during early symbiotic signaling: *Phytopathology*, v. 98, p. S163-S163.
- Verdaguer, D., P. J. Casero, and M. Molinas, 2000, Lateral root development in a woody plant, *Quercus suber* L. (cork oak): *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, v. 78, p. 1125-1135.
- Vernoux, T., G. Brunoud, E. Farcot, V. Morin, H. Van den Daele, J. Legrand, M. Oliva, P. Das, A. Larrieu, D. Wells, Y. Guedon, L. Armitage, F. Picard, S. Guyomarc'h, C. Cellier, G. Parry, R. Koumproglou, J. H. Doonan, M. Estelle, C. Godin, S. Kepinski, M. Bennett, L. De Veylder, and J. Traas, 2011, The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex: *Molecular Systems Biology*, v. 7.
- Vessey, J. K., K. Pawlowski, and B. Bergman, 2005, Root-based N-2-fixing symbioses: Legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp and cycads: *Plant and Soil*, v. 274, p. 51-78.
- Vidal, E. A., V. Araus, C. Lu, G. Parry, P. J. Green, G. M. Coruzzi, and R. A. Gutierrez, 2010, Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in *Arabidopsis thaliana*: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, p. 4477-4482.
- Villalobos, L., S. Lee, C. De Oliveira, A. Ivetac, W. Brandt, L. Armitage, L. B. Sheard, X. Tan, G. Parry, H. B. Mao, N. Zheng, R. Napier, S. Kepinski, and M. Estelle, 2012, A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin: *Nature Chemical Biology*, v. 8, p. 477-485.
- Wais, R. J., C. Galera, G. Oldroyd, R. Catoira, R. V. Penmetsa, D. Cook, C. Gough, J. Denarie, and S. R. Long, 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*, v. 97, p. 13407-13412.
- Wasson, A. P., F. I. Pellerone, and U. Mathesius, 2006, Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia: *Plant Cell*, v. 18, p. 1617-1629.
- Wasson, A. P., K. Ramsay, M. G. K. Jones, and U. Mathesius, 2009, Differing requirements for flavonoids during the formation of lateral roots, nodules and root knot nematode galls in *Medicago truncatula*: *New Phytologist*, v. 183, p. 167-179.

- Weijers, D., E. Benkova, K. E. Jager, A. Schlereth, T. Hamann, M. Kientz, J. C. Wilmoth, J. W. Reed, and G. Jurgens, 2005, Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators: *Embo Journal*, v. 24, p. 1874-1885.
- Wisniewska, J., J. Xu, D. Seifertova, P. B. Brewer, K. Ruzicka, I. Blilou, D. Rouquie, E. Benkova, B. Scheres, and J. Friml, 2006, Polar PIN localization directs auxin flow in plants: *Science*, v. 312, p. 883.
- Woodward, A. W., and B. Bartel, 2005, Auxin: Regulation, action, and interaction: *Annals of Botany*, v. 95, p. 707-735.
- Wu, G., D. R. Lewis, and E. P. Spalding, 2007, Mutations in Arabidopsis multidrug resistance-like ABC transporters separate the roles of acropetal and basipetal auxin transport in lateral root development: *Plant Cell*, v. 19, p. 1826-1837.
- Yoshida, S., H. Kameoka, M. Tempo, K. Akiyama, M. Umehara, S. Yamaguchi, H. Hayashi, J. Kyojuka, and K. Shirasu, 2012, The D3 F-box protein is a key component in host strigolactone responses essential for arbuscular mycorrhizal symbiosis: *New Phytologist*, v. 196, p. 1208-1216.
- Young, N. D., F. Debelle, G. E. D. Oldroyd, R. Geurts, S. B. Cannon, M. K. Udvardi, V. A. Benedito, K. F. X. Mayer, J. Gouzy, H. Schoof, Y. Van de Peer, S. Proost, D. R. Cook, B. C. Meyers, M. Spannagl, F. Cheung, S. De Mita, V. Krishnakumar, H. Gundlach, S. G. Zhou, J. Mudge, A. K. Bharti, J. D. Murray, M. A. Naoumkina, B. Rosen, K. A. T. Silverstein, H. B. Tang, S. Rombauts, P. X. Zhao, P. Zhou, V. Barbe, P. Bardou, M. Bechner, A. Bellec, A. Berger, H. Berges, S. Bidwell, T. Bisseling, N. Choisne, A. Couloux, R. Denny, S. Deshpande, X. B. Dai, J. J. Doyle, A. M. Dudez, A. D. Farmer, S. Fouteau, C. Franken, C. Gibelin, J. Gish, S. Goldstein, A. J. Gonzalez, P. J. Green, A. Hallab, M. Hartog, A. Hua, S. J. Humphray, D. H. Jeong, Y. Jing, A. Jocker, S. M. Kenton, D. J. Kim, K. Klee, H. S. Lai, C. T. Lang, S. P. Lin, S. L. Macmil, G. Magdelenat, L. Matthews, J. McCarrison, E. L. Monaghan, J. H. Mun, F. Z. Najar, C. Nicholson, C. Noirot, M. O'Bleness, C. R. Paule, J. Poulain, F. Prion, B. F. Qin, C. M. Qu, E. F. Retzel, C. Riddle, E. Sallet, S. Samain, N. Samson, I. Sanders, O. Saurat, C. Scarpelli, T. Schiex, B. Segurens, A. J. Severin, D. J. Sherrier, R. H. Shi, S. Sims, S. R. Singer, S. Sinharoy, L. Sterck, A. Viollet, B. B. Wang, et al., 2011, The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses: *Nature*, v. 480, p. 520-524.
- Zhang, H. M., A. Jennings, P. W. Barlow, and B. G. Forde, 1999, Dual pathways for regulation of root branching by nitrate: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 96, p. 6529-6534.
- Zhou, C. N., L. Han, C. Y. Hou, A. Metelli, L. Y. Qi, M. Tadege, K. S. Mysore, and Z. Y. Wang, 2011, Developmental Analysis of a Medicago truncatula smooth leaf margin1 Mutant Reveals Context-Dependent Effects on Compound Leaf Development: *Plant Cell*, v. 23, p. 2106-2124.
- Zolman, B. R., N. Martinez, A. Millius, A. R. Adham, and B. Bartel, 2008, Identification and characterization of Arabidopsis indole-3-butyric acid response mutants defective in novel peroxisomal enzymes: *Genetics*, v. 180, p. 237-251.
- Zsogon, A., M. R. Lambais, V. A. Benedito, A. V. D. Figueira, and L. E. P. Peres, 2008, Reduced arbuscular mycorrhizal colonization in tomato ethylene mutants: *Scientia Agricola*, v. 65, p. 259-267.

Titre : Stimulation du développement des racines latérales par des lipo-chitooligosaccharides (LCOs) symbiotiques chez *Medicago truncatula*

Auteur : Violaine Herrbach

Directrices de thèse : Sandra Bensmihen et Clare Gough

RESUME DE LA THESE

La légumineuse modèle *Medicago truncatula* peut s'associer avec deux types de microorganismes du sol pour former des endosymbioses racinaires : la symbiose Légumineuse-Rhizobium avec des bactéries fixatrices d'azote, et la symbiose Mycorhizienne à Arbuscules avec des champignons de la famille des Gloméromycètes.

Depuis la découverte que les symbiotes rhizobien et mycorhiziens de *M. truncatula* produisent des lipo-chitooligosaccharides (LCOs), respectivement appelés facteurs Nod et Myc-LCOs, qui stimulent la formation des racines latérales (RL) chez cette plante, il a été suggéré que ces facteurs symbiotiques interfèrent avec le programme développemental de la plante pour former les RL. Afin de déterminer la manière dont ces molécules interviennent dans ce programme, il est nécessaire de comprendre les mécanismes physiologiques et moléculaires régissant l'action des facteurs Nod et les Myc-LCOs sur la stimulation de la formation des RL. Le projet de thèse a donc pour objectif de caractériser la stimulation du développement des RL par ces facteurs symbiotiques chez la légumineuse modèle *M. truncatula*, et en particulier de comprendre s'ils agissent sur un stade particulier ou une zone de la racine donnée, et s'ils interagissent avec des voies hormonales.

Les RL sont des organes adaptatifs, dont le développement est finement régulé aussi bien par des programmes développementaux internes que par des signaux environnementaux. Le développement de la RL chez *M. truncatula* est plus complexe que celui d'autres plantes modèles, parce que sa racine est capable de former un autre organe en présence de son symbiote rhizobien : la nodosité. La régulation des organes racinaires chez cette plante présente donc des spécificités, en particulier au niveau hormonal. Nos travaux ont permis de mettre à jour les connaissances sur le déroulement et les caractéristiques du développement des RL chez *M. truncatula*. Celui-ci présente des similarités et des différences avec les caractéristiques de formation des RL chez *A. thaliana*, mais aussi des ressemblances avec la RL chez d'autres espèces, et avec la nodosité.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence que les facteurs Nod agissent de façon précoce sur la formation de la RL, probablement lors des étapes de spécification ou d'initiation des cellules du péricycle, la première lignée cellulaire à se diviser lors du développement de la RL chez *M. truncatula*. Le rôle prépondérant de l'auxine dans cette stimulation a été mis à jour, de par son interaction synergique avec les facteurs Nod.

Dans un contexte d'amélioration des rendements agricoles et de préservation de l'environnement, cette thèse ouvre des perspectives sur la compréhension de l'effet des molécules d'origine microbienne sur le développement des organes racinaires. Afin de poursuivre les travaux entamés au cours de ce projet, il sera nécessaire de caractériser plus précisément l'effet des facteurs Nod sur les étapes précoces de la RL, et comprendre dans quelle mesure ils interfèrent avec l'auxine. Ces travaux seront également à effectuer avec les Myc-LCOs.

Mots-clés :

MEDICAGO TRUNCATULA, RACINE LATÉRALE, SYMBIOSE, LIPO-CHITOOLOGOSACCHARIDE, NODOSITE, FACTEUR NOD, MYC-LCO