



HAL
open science

Rôle des signalisations MAP Kinases dans les interactions rhizobia/légumineuses

Anthony Lhopital

► **To cite this version:**

Anthony Lhopital. Rôle des signalisations MAP Kinases dans les interactions rhizobia/légumineuses. Life Sciences [q-bio]. 2018. hal-04187345

HAL Id: hal-04187345

<https://hal.inrae.fr/hal-04187345v1>

Submitted on 24 Aug 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS-SACLAY
MASTER BIOLOGIE ET SANTE
Finalité SCIENCES DU VEGETAL
M2 Recherche

RAPPORT DE STAGE

« Rôle des signalisations MAP Kinases dans les interactions rhizobia/légumineuses »

Présenté par
Anthony Lhôpital

le 11/06/2018

Laboratoire d'accueil : Institut des Sciences des Plantes de Paris-Saclay (IPS2)

Responsable du laboratoire : Martin CRESPI

Responsable du stage : Julien Lang

Remerciements

Je remercie très sincèrement Julien LANG de m'avoir accueilli dans l'équipe et de m'avoir encadré, pour ça patience et ces conseils durant ces six mois. Ce fut une expérience très enrichissante d'un point de vue scientifique et humain.

Merci également à l'ensemble de l'équipe « Stress signaling » pour leur accueil chaleureux, leur conseil, leur encouragement durant ce stage.

Enfin, je remercie les personnes de l'institut qui m'ont conseillé et aidé tout au long de ce stage.

Abréviations

ACS2 et 6 : ACC synthase 2 et 6

EPS : exopolysaccharide

FLS2 : flagellin-sensitive 2

MAPK : mitogen-activated protein kinase ou MPK

NPR2 : nonexpresser pathogenesis related genes 2

PAL : phenylalanine ammonia-lyase

PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns

PR1, 5 et 10 : pathogenesis-related 1, 5 et 10

PTI : PAMP Triggered Immunity

Rbohs : respiratory burst oxidase homologues C et D

ROS : Reactive Oxygen Species

VIP1 : VirE1-interacting protein 1

WRKY33 : WRKY transcription factor 33

Résumé

Au cours de la symbiose, les mécanismes immunitaires par lesquels les légumineuses tolèrent une colonisation massive par les bactéries rhizobiums restent mal comprises. Dans cette étude, nous avons comparé, au niveau des tissus racinaires, les réponses de défense précoces de *Medicago truncatula* R108 à deux pathogènes, *Pseudomonas syringae* et *Agrobacterium tumefaciens*, et à deux bactéries symbiotiques différentes, *Sinorhizobium meliloti* FSM-MA et *Sinorhizobium medicae* WSM419. Nos résultats ont révélé un profil remarquable d'activations de MPK6 et 3 qui sont inhibées en réponse aux deux bactéries symbiotiques entre 15 et 30 minutes d'exposition. Cependant, nous n'avons pas pu corrélérer ces différences d'activation avec l'expression de différents gènes de défense entre des contextes symbiotiques et pathogéniques, suggérant soit un problème de conception / mise en œuvre de l'expérience, soit des activités MAPK trop faibles pour provoquer des réponses transcriptionnelles. Dans l'ensemble, nos données soulèvent l'hypothèse que la signalisation MAPK pourrait être une cible de signaux inhibiteurs symbiotiques conduisant à l'atténuation des réponses de défense précoce. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour explorer cette possibilité.

Abstract

During symbiosis, the immune mechanisms by which legume plants tolerate a massive colonization by rhizobia bacteria remain elusive. In this study, combining measurement of MAPK activation and analysis of marker gene expression, we comparatively investigated the early defense responses of *Medicago truncatula* R108 roots against two pathogens, *Pseudomonas syringae* and *Agrobacterium tumefaciens*, and against two differently efficient symbiotic bacteria, *Sinorhizobium meliloti* FSM-MA and *Sinorhizobium medicae* WSM419. Our results revealed a remarkable pattern of MPK6 and 3 activations which are inhibited in response to both symbiotic bacteria between 15 and 30 minutes of exposure. However, we could not correlate this with difference in the expressions of different defense genes between symbiotic and pathogenic contexts, suggesting either a problem with the conception/implementation of the experiment, or that the MAPK activities we detected were too weak to provoke transcriptional responses. Overall our data raises the hypothesis that MAPK signaling could be a target of symbiotic inhibitory signals leading to the dampening of early defense responses. Further work is required to explore this possibility.

Table des matières

Table des matières.....	1
Introduction.....	2
Symbiose et réponses immunitaires précoces	2
Symbiose et signalisation MAPKs.....	3
Matériel et méthodes.....	6
Matériel bactérien et condition de croissance	6
Matériel végétal et condition de croissance	6
Tests d'interaction plante-bactérie	6
Extraction ADN et géotypage	7
Extraction protéines et dosage Bradford	7
Western Blot et anticorps	7
Immunoprécipitation et Kinase assay	7
Extraction ARN et analyse d'expression	8
Résultats.....	9
Géotypage du mutant d'insertion MPK3 (NF19267)	9
Mise au point des tests d'interaction plante-bactéries	9
Des activités MAPKs différent entre bactéries pathogènes et symbiotiques.....	12
Les gènes MAPKs n'ont pas été affectés dans les premières heures de l'interaction	13
Les gènes de défense n'ont pas été affectés dans les premières heures de l'interaction.....	14
Les gènes marqueurs de la symbiose n'ont pas été exprimés dans les premières heures de l'interaction.....	18
Discussion.....	18
Perspectives du travail.....	21
Bibliographies.....	22
Annexes	24
Annexe I : Liste des primers utilisés pour le géotypage	24
Annexe II : Liste des primers utilisés pour les RT-qPCR.....	24
Annexe III : Comparaison de l'activité MAPK en réponse à différentes bactéries pathogènes et symbiotiques chez la racine de <i>M. truncatula</i> par immunokinase assay.....	25

Introduction

Les plantes légumineuses ont la capacité d'interagir en symbiose avec une classe de bactéries du sol fixatrices d'azote appelées Rhizobia. Ce processus fait suite à une carence azotée et permet la formation de nouveaux organes racinaires, les nodosités. L'établissement de cette symbiose, débute par des échanges moléculaires au niveau de la rhizosphère entre la plante, qui produit des flavonoïdes afin d'attirer les rhizobiums qui, en retour, vont produire des facteurs Nod (lipochitooligosaccharides (LCO)). La reconnaissance de ces facteurs par la plante provoque d'une part, une déformation des poils absorbants ainsi que la formation d'un cordon d'infection et d'autre part, stimule la formation d'un nouvel organe racinaire. Par la suite, le cordon d'infection va croître jusqu'au cortex racinaire, infectant ainsi le primordium des nodosités et permettre aux bactéries de se différencier en bactéroïdes, soit la forme fixatrice d'azote (Jones et al., 2007; Haag et al., 2013).

Bien que les mécanismes impliqués dans la formation des nodosités lors de la symbiose entre légumineuse et rhizobium soient relativement bien compris, il reste toutefois des questions non élucidées concernant la modulation des réponses immunitaires durant les différentes étapes, notamment précoces, de ce processus.

Symbiose et réponses immunitaires précoces

Plusieurs études indiquent que les défenses immunitaires sont activées de manière rapide et transitoire chez les légumineuses en réponse à des bactéries symbiotiques. Des études transcriptomiques chez le soja, ont montré une forte induction de gènes de défense après 12h d'inoculation avec la rhizobia : *Bradyrhizobium japonicum* tandis qu'à 24h on retrouve un niveau basal (Libault et al., 2010). Cette induction de quelques heures des gènes de défense a aussi été observée chez *Medicago truncatula* en réponse à *Sinorhizobium meliloti*, mais à des temps différents, à 1h les gènes étaient induits et à 6h on retrouvait un niveau basal (Lohar et al., 2006) ou encore chez *Lotus japonicus* en réponse à *Mesorhizobium loti* (Lohar et al., 2006). D'autre part il a été montré que la production de ROS (Reactive Oxygen Species) était nécessaire pour une infection et un fonctionnement optimal des nodosités. Chez *Medicago sativa*, une souche de *S. meliloti*, surexprimant un gène de la catalase entraînant ainsi une dégradation du H₂O₂, présentait une plus faible infection et formation de nodosités en comparaison à une souche sauvage, ceci suggérant un rôle important des ROS dans l'efficacité de la symbiose (Jamet et al., 2007).

D'autres études ont montré que les exopolysaccharide (EPS) produit par les bactéries symbiotiques permettraient de réduire l'expression de gène de défenses. L'utilisation d'un mutant déficient en exopolysaccharide a montré une plus forte induction des gènes liés à la défense qu'une souche sauvage chez *M. truncatula* (Jones et al., 2008). En plus des EPS, les Facteurs Nod (NF) sont

capable de supprimer partiellement la PTI (PAMP Triggered Immunity) chez des non légumineuses, suggérant ainsi que ces molécules symbiotiques sont également importantes pour la modulation des réponses de défense au cours de la symbiose (Liang et al., 2013).

Symbiose et signalisation MAPKs

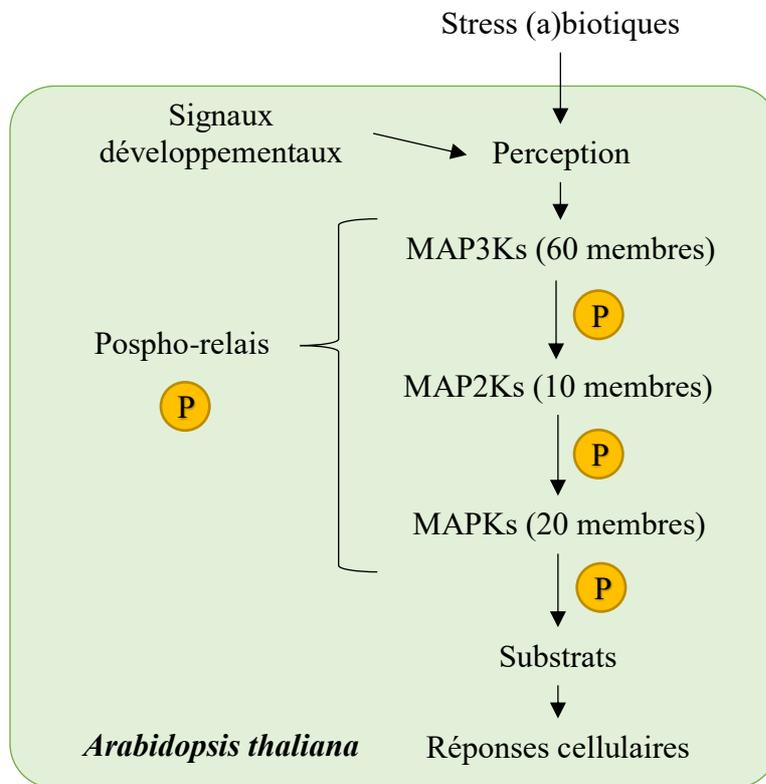


Figure 1 : Représentation des voies de signalisations MAPKs chez *Arabidopsis thaliana*. Les modules MAPKs sont des modules de phospho-relais entre une MAP3K, une MAP2K et une MAPK permettant l’intégration de différents signaux en réponses cellulaires appropriées.

Les signalisations MAPK (mitogen-activated protein kinase) sont des modules de phosphorylation successive entre une MAP3K (MAPK Kinase Kinase ou MEKK), une MAP2K (MAPK Kinase ou MKK) et une MAPKinase (MPK), permettant l’intégration de différents signaux en réponses cellulaires appropriées (**Figure 1**). Ces modules sont encodés par de larges familles multigéniques relativement bien conservées entre les espèces. Chez *Arabidopsis thaliana*, on dénombre 80 MAP3K, 10 MAP2K et 20 MAPK dont les cascades de signalisation sont impliquées à la fois dans le développement et dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques (Ichimura et al., 2002).

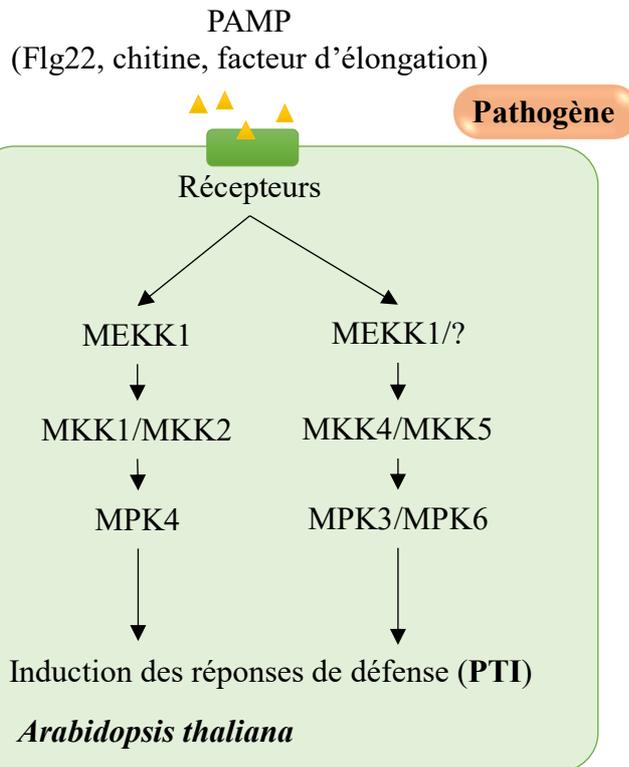


Figure 2 : Modèle de la signalisation MAPK induite par les PAMPs. Lors de la stimulation du récepteur par un PAMP, les modules MEKK1-MKK1/2-MPK4 et MEKK1/?-MKK4/5-MPK3/6 sont activés pour phosphoryler leurs substrats et induire la PTI.

Notamment dans le cas des stress biotiques, il a été montré que les modules MEKK1-MKK1/2-MPK4 et MEKK1/?-MKK4/5-MPK3/6 jouaient un rôle important pour la mise en place de la PTI, le premier niveau du système immunitaire correspondant à la perception de PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns), des motifs moléculaires relativement bien conservés parmi les pathogènes tels que la flagelline, la chitine ou encore des facteurs d'élongations (**Figure 2**, Zipfel et al., 2006).

Ce premier niveau de l'immunité induit un ensemble de réponse visant à résister à l'attaque pathogène comprenant la production de ROS et la production de composés antimicrobiens (Mur et al., 2008; O'Brien et al., 2012). Chez *A. thaliana*, les PAMP sont reconnus par des récepteurs membranaires, les PRR (Pattern recognition receptor). Par exemple, FLS2 (flagellin-sensitive 2) reconnaît l'épitope flg22 de l'extrémité N-ter de la flagelline. Après la perception des PAMPs, diverses réponses sont déclenchées impliquant notamment les voies MAPKs avec l'intervention des MPK 3, 4 et 6 dont l'activation est rapide et transitoire (quelques minutes). Les modules MEKK1-MKK1/2-MPK4 et MEKK1/?-MKK4/5-MPK3/6 sont fortement impliqués dans la PTI. Le module MEKK1/?-MKK4/5-MPK3/6 a de nombreuses cibles notamment des facteurs de transcriptions tel que WRKY33 (WRKY transcription factor 33), un gène essentiel pour la biosynthèse de la

camalexine (Mao et al., 2011) ou VIP1 (VirE1-interacting protein 1) qui suite à son activation par MPK3, va être relocalisé dans le noyau et ainsi permettre l'expression du gène PR1 (pathogenesis-related 1) (Djamei et al., 2007). Il a également été montré que la MPK6 et 3 phosphorylaient ACS2 et 6 (ACC synthase 2 et 6), permettant ainsi leur stabilisation et l'augmentation de la synthèse d'éthylène (Joo et al., 2008).

Les activités MPK3/4/6 constituent ainsi des marqueurs clefs d'une activité PTI et peuvent être utilisées pour caractériser des réponses immunitaires précoces lors d'interactions entre la plante et un microorganisme.

Chez les légumineuses, les familles multigéniques des MAPKs sont relativement bien conservées par exemple chez *M. truncatula* on dénombre 72 MAP3K, 8 MAP2K et 16 MAPK dont des orthologues clairs de MPK6 et MPK3. Plusieurs études ont cherché à déterminer si les MAPKs jouaient un rôle positif ou négatif dans l'établissement de la symbiose et ont apporté des résultats contradictoires. L'utilisation d'inhibiteur de MAPK chez *Lupinus albus* a entraîné une diminution du nombre de nodules formés suggérant qu'il existe des MAPKs nécessaire pour une symbiose optimale et jouant donc un rôle positif sur la symbiose (Fernandez-Pascual et al., 2006).

A l'inverse, plusieurs études montrent des effets négatifs sur la symbiose, notamment chez le *L. japonicus* où il a été montré que l'activation, au début du processus symbiotique, d'une réponse PTI via la signalisation MPK6/3, entraînait une diminution du nombre de nodule formé (Lopez-Gomez et al., 2012). De plus, une autre étude a montré cet aspect négatif des voies de signalisation MKK4/5-MAPK6/3 par une approche génétique, où la formation de nodules fixatrice d'azote était augmentée dans le mutant MKK5 par rapport au WT (Ryu et al., 2017).

De manière intéressante, une étude récente a comparé les niveaux d'activité de MPK6 et 3 chez *M. truncatula* en réponse précoce à une souche symbiotique (*S. meliloti*) et un pathogène (*Pseudomonas syringae*), et a montré que les niveaux d'activité étaient plus faibles dans le premier cas que dans le second. Dans la même étude, il a été montré que les activités de MPK6/3 en réponse à *P. syringae* étaient diminuées en présence de la bactérie symbiotique. Ce résultat supporte l'hypothèse qu'un signal symbiotique spécifique est capable d'inhiber les réponses immunitaires précoces médiées par MPK6/3 (Chen et al., 2017).

Au final, si plusieurs études indiquent l'activation rapide et transitoire d'une réponse de défense chez la plante hôte en contact de rhizobia, les caractéristiques de ces réponses par rapport à celles provoquées par des pathogènes sont encore mal cernées. Pareillement, l'impact de ces réponses précoces sur l'efficacité finale de la symbiose ainsi que la manière dont elles sont modulées au

cours du processus demeurent mal comprises. Afin de contribuer à répondre à ces questions, nous proposons ici une analyse comparative des réponses immunitaires précoces d'une légumineuse à différents pathogènes et bactéries symbiotiques, basée sur une mesure des activités MAPKs et des niveaux d'expression de plusieurs gènes marqueurs. Enfin, nous avons entamé un travail d'analyse fonctionnelle avec le génotypage d'une lignée mutante pour le gène MPK3.

Matériel et méthodes

Matériel bactérien et condition de croissance

Deux bactéries pathogènes ont été utilisées : *Pseudomonas syringae* (DC3000) et *Agrobacterium tumefaciens* (C58), ainsi que trois bactéries symbiotiques : *Sinorhizobium meliloti* (FSM-MA), *Sinorhizobium medicae* (WSM419) et *Rhizobium leguminosorum* (P221).

Les Bactéries ont été cultivées à 30°C, sur milieu LB (0.1% peptone, 0.05% yeast extract, 0.1% NaCl) pour DC3000 et C58, YEB (0.5% beef extract, 0.1% yeast extract, 0.5% peptone, 0.5% saccharose, 2mM de solution sulfate de magnésium, pH 7.2 (NaOH)) pour FSM-MA et WSM419, et YEM (0.2% yeast extract, 1% mannitol, 0.046% Na₂HPO₄, 0.01% MgSO₄, 0.004% CaCl₂, 0.11% Sodium Hydrogeno glutamate, 0.04% FeCl₃, pH 6.8 (NaOH)) pour P221. 1.5% Agar est ajouté aux milieux pour les cultures solides.

Matériel végétal et condition de croissance

La plante *Médicago truncatula* d'écotype R108 a été utilisée pour cette étude.

Après scarification et stérilisation (30min, chlore 0.34%) les graines de *M. truncatula* sont semées *in vitro* sur un milieu 0.7% agar, laissées 4 jours à 4°C dans l'obscurité pour stratification, puis acclimatées en chambre de culture à 25°C dans l'obscurité pendant 2 jours. Les plantules sont ensuite transférées sur milieu BNM (Buffered Nodulation Medium, Ehrhardt et al., 1992) pour 6-7 jours (25°C, 16h de lumière pour 8h d'obscurité).

Tests d'interaction plante-bactérie

Les cultures bactériennes en milieu/fin de phase exponentielle (DO entre 0.6 et 0.8) sont lavées puis concentrées dans de l'eau à une DO=0,4.

Les plantules sont immergées dans 35ml d'eau stérile la veille des tests, et à t=0, 5ml de cultures bactériennes sont ajoutées. Les feuilles et les racines sont prélevées séparément à différents temps d'inoculation (15min, 30min, 1h, 6h, 24h et 48h).

Extraction ADN et géotypage

L'ADN est extrait à partir de jeunes feuilles broyées au Tissue Lyser, dans le tampon EMD (200mM Tris HCl pH 7.5, 250mM NaCl, 25mM EDTA et 0.5% SDS). L'ADN est précipité par l'ajout équivalent d'isopropanol, resuspendu dans de l'eau et stocké à -20°C.

Les extraits d'ADN sont ensuite utilisés pour géotyper des lignées mutantes d'insertion *tnt1*. La liste des primers utilisés se trouve en **Annexe I**.

Extraction protéines et dosage Bradford

Les protéines ont été extraites à partir de racines broyées au Tissue Lyser, en condition non dénaturante dans du Tampon Laccus (15mM EGTA, 15mM MgCl₂, 75mM NaCl, 1% Tween20, 25mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM DTT, 2mM NaF, 2mM Na₃VO₄, une pastille de protéase inhibitor complet (Roche) pour 50mL)

Les échantillons sont ensuite dosés par méthode Bradford, utilisant la BSA comme gamme d'étalonnage (0.25µg à 2µg/10µl). Les échantillons sont ensuite normalisés à une même concentration protéique, puis utilisés pour Western-blots ou immunoprécipitation.

Western Blot et anticorps

Les protéines sont dénaturées dans du tampon Laemmli à 95°C pendant 10min, séparées sur un gel acrylamide de 10% puis transférées sur une membrane PVDF. La membrane est bloquée avec du TBS-T (Tris Buffered Saline-Tween 20) contenant 5% de poudre lait pour les anticorps anti-MPK6 (Sigma A7106, dilution 1/10000), anti-MPK3 et anti-MPK4 (respectivement SAMK et MMK2 Cardinale et al., 2000, dilution 1/10000) ou 5% de BSA pour les anticorps anti-pTpY (Cell Signaling Technology, dilution 1/10000). Les anticorps secondaires utilisés sont des anticorps anti-rabbit (Sigma A6154, dilution 1/10000 pour MPK4, 6 et 3, dilution 1/15000 pour pTpY). Les membranes sont ensuite révélées par chemiluminescence (ClarityTM Western ELC Substrate, Bio Rad) avec ChemiDoc (Bio Rad).

Immunoprécipitation et Kinase assay

Les immunoprécipitations sont réalisées à partir de 100ng extraits protéiques en présence de billes sépharoses (Protéine A; GE Healthcare) et d'anticorps anti-pTpY (dilution 1/1000), anti-MPK6 (dilution 1/1000) ou anti-MPK4 (dilution 1/700) pendant 2-3h à 4°C sous agitation faible. Les billes sont ensuite lavées 3 fois avec du tampon SUC1 (50mM Tris HCl pH 7.4, 250mM NaCl, 5mM EGTA, 5mM EDTA et 0.1% Tween 20) et 2 fois avec du Tampon Kinase (20mM HEPES pH 7.5, 15mM MgCl₂, 5mM EGTA, 1mM DTT), puis séchées. La réaction kinase est faite dans 15µl de

Kinase buffer contenant 0.15µl 10mM ATP, 0.1µl mM DTT et 1.5µl 10mg.ml⁻¹ MBP. ATP^[γ-33P] (2µCi par tube) pendant 30 minutes à température ambiante puis 10µl 6X Laemmli buffer sont ajoutées pour stopper la réaction. Les échantillons sont chauffés 10min à 95° puis séparés sur gel SDS PAGE 15%. Après séchage du gel, la MBP (Myelin Basic Protein) radioactive est révélée au Amersham Typhoon.

Extraction ARN et analyse d'expression

L'ARN est extrait à partir de racines broyées au Tissue Lyser, selon les instructions du Kit « NucleoSpin© RNA ». Les ARN sont ensuite dosés au NanoDrop et leur intégrité vérifiée par visualisation des ARNs ribosomiques sur gel BET. Les quantités d'ARN sont normalisées puis les ADNc sont synthétisés au moyen de la reverse transcriptase SuperscriptII (Invitrogen™) et de primer Oligo(dT) selon le protocole standard du fabricant. Les réactions qPCR ont été réalisées avec le mix SYBR Green SuperMix (BioRad) et mesurées selon le protocole standard du thermocycleur Light Cycler 480 (Roche), en utilisant 10ng de cDNA. L'actine est utilisée comme contrôle. La RT-qPCR a été utilisée pour mesurer l'expression des gènes : MtMAPK3 (Medtr4g061130), MtMAPK6 (Medtr4g087620), MtFLS2 (Medtr4g094610.1), MtWRKY33 (Medtr3g031220.1), MtRbohC (Medtr3g098350), MtRbohD (Medtr3g098320), MtPR10 (Medtr2g035150.1), MtPR5 (Medtr1g021945.1), MtPR1 (Medtr4g128750.1), MtPAL (Medtr1g064090.1), MtNPL (Medtr3g086320.1), FRK1 (Medtr8g015340), MtNIN (Medtr5g099060.1), MtENOD11 (Medtr3g415670) et MtNPR2 (Medtr2g028950). La liste des primers utilisés se trouve en **AnnexeII**.

Résultats

Génotypage du mutant d'insertion MPK3 (NF19267)

Afin de caractériser les fonctions des MAPKs lors de la symbiose chez *M. truncatula*, une première étape fut de génotyper une lignée prédite avec une insertion de transposon *tnt1* dans un exon de MPK3 (lignée NF19267, Noble Research Institute, <https://mtgea.noble.org>).

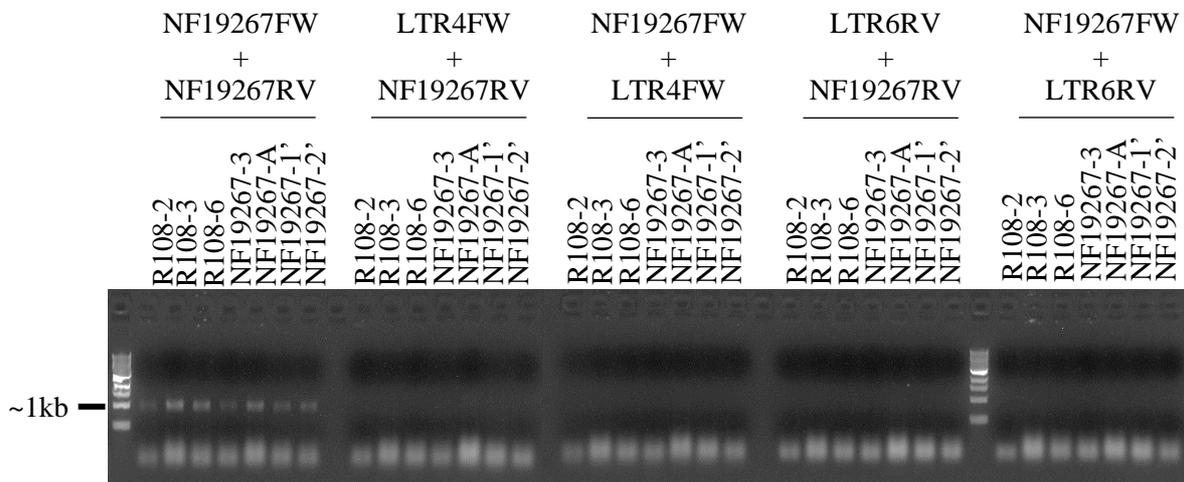


Figure 3 : Génotypage de lignée mutant d'insertion *tnt1* dans le gène MPK3 chez *M. truncatula* R108. R108 : lignée sauvage, NF19267 : lignée mutant MPK3. Les lignes supérieures indiquent les combinaisons de primers utilisées.

Le génotypage effectué à partir de jeune feuille de *M. truncatula* R108 a révélé une bande d'environ 1 kb avec le couple de primers spécifiques pour l'allèle WT. Quant aux couples d'amorces spécifiques pour l'insertion, on n'observe aucune bande quelles que soient les combinaisons testées (**Figure 3**). Ces résultats suggèrent soit que les plantes testées ne portent pas l'insertion *tnt1* dans le gène MPK3, soit que l'insertion se trouve à une position différente que celle prédite et que par conséquent, les primers utilisés dans l'étude ne sont pas adaptés.

Mise au point des tests d'interaction plante-bactéries

Dans un premier temps, nous avons souhaité vérifier que les outils biochimiques disponibles fonctionnaient chez *M. truncatula* R108 et tester également différentes procédures d'interactions plante-bactéries.

Ainsi les tests ont été réalisés sur des plantules de *M. truncatula* inoculées avec des cultures bactériennes soit en phase stationnaire soit en phase exponentielle de *P. syringae* DC3000. De plus un lot de plante a été inoculé par la méthode d'immersion dans de l'eau (voir Matériels et Méthodes), tandis qu'un autre lot a été inoculé directement au niveau de la racine avec la culture

bactérienne au moyen d'une pipette. Les racines ont ensuite été prélevées à différents temps après inoculation.

En ce qui concerne les outils biochimiques disponibles pour mesurer les activités MAPKs, nous avons quatre anticorps : un anticorps anti-pTpY qui reconnaît les formes phosphorylées, et donc actives, de certaines MAPKs ; un anticorps anti-MPK3 généré contre un épitope de la protéine d'*A. thaliana* partiellement dégénéré chez *M. truncatula* ; un anticorps anti-MPK6 généré contre un épitope de la protéine d'*A. thaliana* totalement conservé chez *M. truncatula* ; et un anticorps anti-MPK4 généré contre un épitope de la protéine de *M. sativa* totalement conservé chez *M. truncatula*.

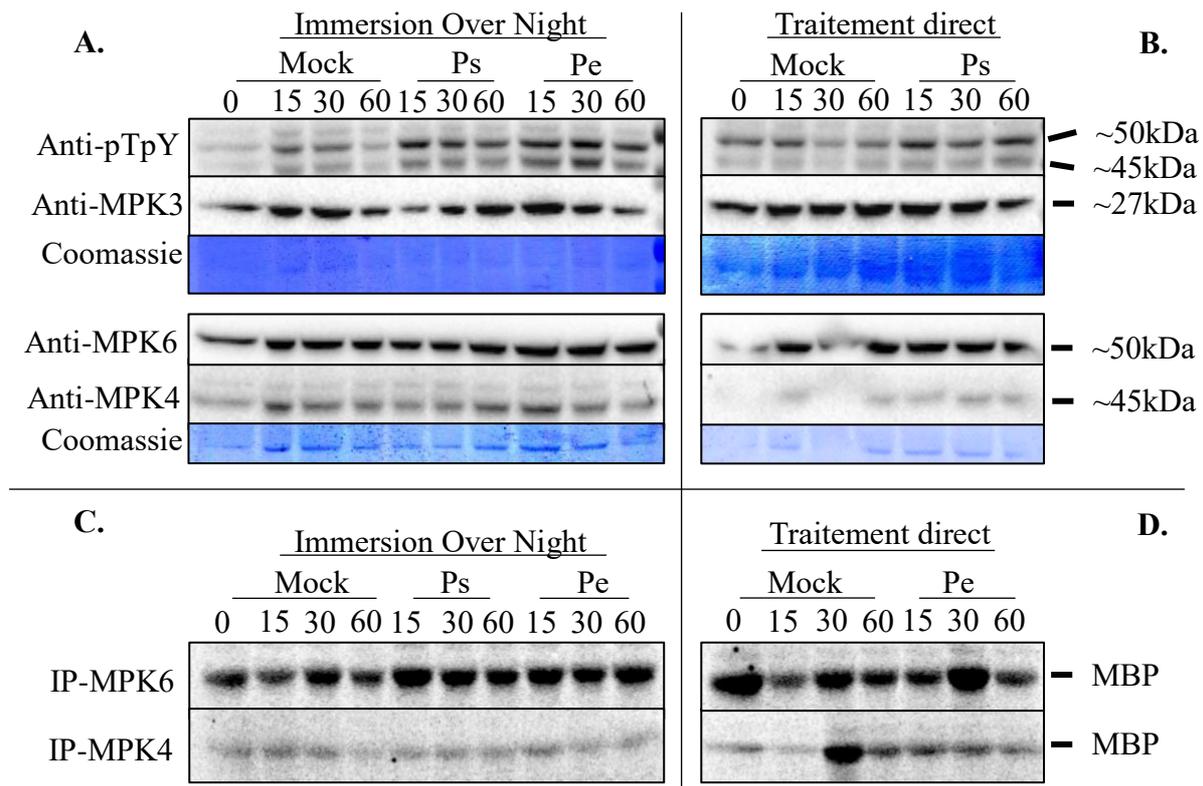


Figure 4 : Comparaison de différentes méthodes d'inoculation et vérification des outils biochimiques. **A** et **C** : Les plantes *M. truncatula* ont été inoculé avec une suspension cellulaire de *P. syringae* DC3000 (DO_{600} final=0.5) après avoir été immergé une nuit dans de l'eau stérile. **B** et **D** : Les plantes *M. truncatula* ont été inoculé avec une suspension cellulaire de *P. syringae* DC3000 (DO_{600} =0.5) appliqué directement sur les racines. Les cultures bactériennes de *P. syringae* utilisé était soit en phase stationnaire (Ps) soit en phase exponentielle (Pe), de l'eau stérile a été utilisée comme contrôle (mock). Les racines ont été prélevés après 0, 15, 30 et 60min post inoculation. **A** et **B** : L'analyse par Western blot a été réalisée en utilisant un anticorps anti-pTpY, anti-MPK6, anti-MPK4 et anti-MPK3. **C** et **D** : L'analyse des Kinases assays a été réalisé sur des extraits protéiques immunoprécipités (IP) soit avec l'anticorps anti-MAPK6 soit avec l'anticorps anti-MPK4 et la MBP a été utilisée comme substrat. Le Coomassie sert de contrôle de charge.

Les Western Blots réalisés avec l'anticorps pTpY permettent de détecter deux bandes, une à 50kDa et une à 45kDa qui correspondent, respectivement, aux tailles attendues de MPK6 et 3 chez *M. truncatula* (**Figure 4A et 4B**). De plus, pour les lots traités par la méthode d'immersion, on peut observer une augmentation d'intensité en présence de *P. syringae* DC3000 comparé aux contrôles, à la fois dans le cas des cultures en phase exponentielle et celles en phase stationnaire. De plus, on observe une plus forte intensité à 30 min dans le cas d'une culture en phase exponentielle par rapport aux autres temps testés, alors que pour les traitements avec une culture en phase stationnaire aucune différence d'intensité n'est clairement observée (**Figure 4A**). Dans le cas des traitements directs, on ne retrouve pas ces différences du fait d'intensités fortes chez les mocks surement dues à des activités non spécifiques des MAPKs dans ces conditions expérimentales (**Figure 4B**).

Nous avons également cherché à mesurer les quantités de MPK6/3 et 4 dans les racines traitées. L'utilisation d'anticorps anti-MPK3 a révélé une bande à 27kDa, ce qui est une taille inférieure à celle attendu pour MtMPK3. Ce résultat suggère que l'anticorps anti-MPK3 marquerait une autre protéine et ne permet pas de marquer la protéine MPK3 chez *M. truncatula*. L'utilisation de l'anticorps anti-MPK6 a permis de marquer une protéine de 50kDa, dont les quantités ne varient pas entre les échantillons. Ces résultats montrent que l'anticorps anti-MPK6 est, à priori, fonctionnel et que les différences d'activité observées avec le pTpY pour MPK6 ne sont pas dues à une différence de quantité de la protéine. On observe, pour le Western blot fait avec l'anticorps anti-MPK4, l'absence de bande, suggérant une absence de cette protéine dans nos échantillons, d'ailleurs cohérente avec l'absence d'un signal MPK4 pour les Western pTpY (**Figure 4A et 4B**).

Dans un second temps nous avons voulu vérifier l'activité des MAPKs par des Kinases Assays. Ceux-ci ont montré une absence d'activité pour MPK4 dans tous les échantillons traités ou non avec *P. syringae* DC3000, à l'exception du traitement direct avec de l'eau à 30min, vraisemblablement en raison d'une anomalie expérimentale. Pour MPK6, on observe une légère augmentation des signaux pour les échantillons traités avec *P. syringae* DC3000 comparativement aux mocks, résultat qui est cohérent avec les résultats des Western Blot anti pTpY (**Figure 4C et 4D**). Toutefois, on observe de fortes variations d'activité MPK6 quand on applique un traitement direct des solutions bactériennes, là encore vraisemblablement dues à des activations non spécifiques.

En conclusion, nous avons choisi de continuer l'étude avec des Western blot fait avec les anticorps anti-MPK6 et anti-pTpY car ceux-ci permettent respectivement de mesurer les quantités de MPK6 et les activités de MPK3 et MPK6 chez *M. truncatula* R108. Nous avons choisi la méthode d'immersion pour les interactions plante-bactéries puisque cette méthode présente moins de variation dans la mesure des activités MAPKs. Enfin, nous avons choisi d'utiliser des cultures

bactériennes en phase exponentielle car les plantes traitées avec une culture en phase exponentielle ont montré des signaux de plus forte intensité que des cultures en phase stationnaire.

Des activités MAPKs différent entre bactéries pathogènes et symbiotiques

Dans la suite de l'étude, nous observons l'activité des MAPKs en réponse à cinq bactéries différentes ; deux bactéries pathogènes *P. syringae* DC3000, un pathogène non naturel de *M. truncatula* mais qui est capable d'induire une activité MAPK au niveau des racines (Chen et al., 2017) et *A. tumefaciens* C58, une Rhizobia pathogène capable d'induire la formation de tumeur ; deux bactéries symbiotiques, *S. medicae* WSM419 et *S. meliloti* FSM-MA qui ont des efficacités symbiotiques différentes chez *M. truncatula* R108 (Kazmierczak et al., 2017) et enfin *R. leguminosorum* P221 qui est une rhizobia symbiotique mais incapable d'induire la formation de nodules chez *M. truncatula* et qui est utilisée ici comme contrôle. Deux réplicas biologiques ont été faits pour cette étude, mais seulement un a pu être analysé en raison de problèmes techniques.

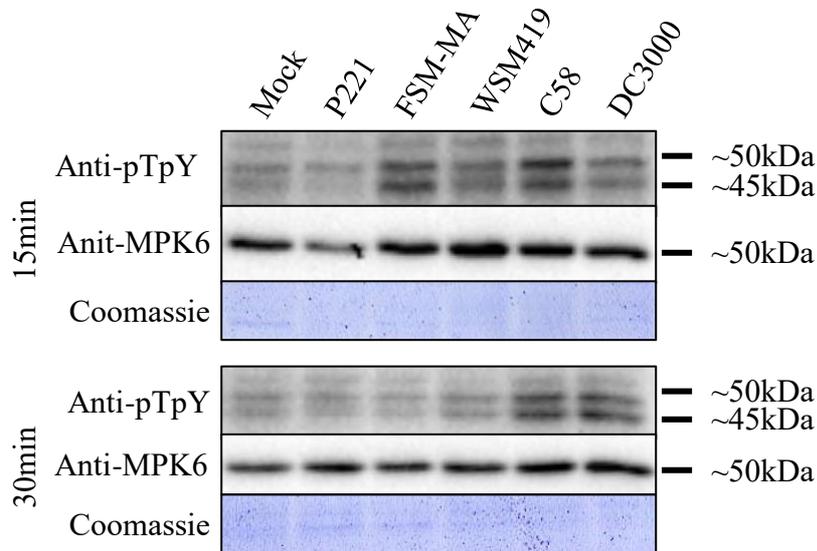


Figure 5 : Comparaison de l'activité MAPK en réponse à différentes bactéries pathogènes et symbiotiques chez la racine de *M. truncatula*. Les plantes *M. truncatula* ont été inoculées avec une suspension cellulaire de *P. syringae* DC3000, *A. tumefaciens* C58, *S. medicae* WSM419, *S. meliloti* FSM-MA ou *R. leguminosorum* P221 (DO_{600} final=0.5) après avoir été immergées une nuit dans de l'eau stérile. De l'eau stérile a été utilisée comme contrôle (mock). L'analyse par Western blot a été réalisée en utilisant un anticorps anti-pTpY et anti-MPK6 et un seul réplica biologique a été décrit. Le Coomassie sert de contrôle de charge.

L'utilisation de l'anticorps anti-pTpY a révélé une activation de MPK 3 et 6 dès 15min en présence de toutes les bactéries par rapport au contrôle. On note notamment que les signaux sont plus forts pour *S. meliloti* FSM-MA et *A. tumefaciens* C58. A 30min, on observe de manière remarquable des activités MAPKs uniquement en présence des deux bactéries pathogènes *P. syringae* DC3000 et *A. tumefaciens* C58 (**Figure 5**).

L'analyse des Western Blot avec l'anticorps anti-MPK6 a révélé des quantités similaires de MPK6 dans chaque échantillon sauf pour *R. leguminosorum* P221 à 15 min ce qui permet d'affirmer, mis à part pour *R. leguminosorum* P221, que les différences observées pour l'activité de MPK6 ne sont pas dues à des quantités différentes en protéines MPK6.

En parallèle, nous avons effectué un Kinase assays à partir des mêmes échantillons protéiques immunoprécipités avec l'anticorps anti-pTpY. L'idée était ici d'accumuler les signaux d'activité de MPK6 et 3 et ainsi d'obtenir des différences plus tranchées entre nos différents échantillons. Toutefois l'unique réplica décrit montre une différence d'activation MAPK à 15 min pour *S. meliloti* FSM-MA par rapport au contrôle et aux autres inoculations testées. A 30 min, on observe une activité plus importante en présence de *S. medicae* WSM419, de *P. syringae* DC3000 et de *A. tumefaciens* C58 par rapport au contrôle (**Annexe III**). Ces observations indiquent des activations MAPK différentes par rapport au résultat du Western blot (**Figure 5**). Ces différences peuvent s'expliquer soit par des problèmes techniques, soit par le fait que l'anticorps anti-pTpY reconnaît d'autres MAPKs que MPK6 et 3 avec des activités insuffisantes pour apparaître par Western mais révélées par « cumul » lors de l'immunoprécipitation.

Les gènes MAPKs n'ont pas été affectés dans les premières heures de l'interaction

Comme nos mesures d'activité MAPkinase tendent à montrer une différence entre les échantillons traités avec des bactéries pathogènes et ceux traités avec des bactéries symbiotiques (**Figure 5**), nous avons voulu voir si nous retrouvions cette différence au niveau des réponses transcriptionnelles de la plante. Nous avons ainsi mesuré les niveaux d'expression de différents gènes par RT-qPCRs à différents temps 1h, 6h et 24h. Deux réplicas biologiques ont été faits pour les temps 1h et 24h et un seul pour le temps 6h. Pour la suite, je présenterai les résultats du temps 6h mais ne considérerai pas les données comme significatives.

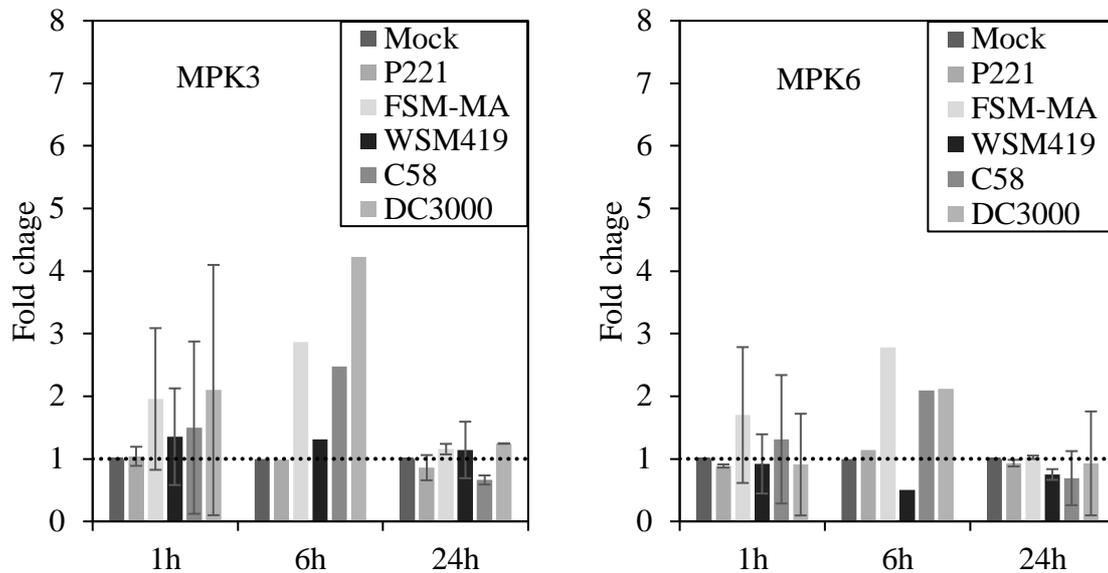


Figure 6 : Analyse RT-PCR quantitative des profils d'expression des gènes MAPK au cours des premières heures de l'interaction entre différentes bactéries pathogènes et symbiotiques au niveau des racines de *M. truncatula*. Les plantes *M. truncatula* ont été inoculé avec une suspension cellulaire de *P. syringae* DC3000, *A. tumefaciens* C58, *S. medicae* WSM419, *S. meliloti* FSM-MA ou *R. leguminosorum* P221 (DO₆₀₀ final=0.5) après avoir été immergé une nuit dans de l'eau stérile. Les résultats sont présentés sous forme de Fold change entre les expressions relatives dans les échantillons traités et mock. Une barre en pointillé marque la valeur 1 indiquant l'absence de variation d'expression. Les expressions relatives ont été calculées par rapport à l'actine. Pour les temps 1h et 24h, deux répliquas biologiques ont été effectués et aux temps 6h, un seul répliqua a été fait.

Les fold change d'expression entre le traitement avec bactéries et le traitement mock ne montrent aucune différences significative des niveaux d'expression sur les trois temps testés pour les deux gènes MPK3 et MPK6 (**Figure 6**). Ceci suggèrerait qu'en moins de 24h, les bactéries, à la fois symbiotiques et pathogéniques n'induisent pas d'expression des MPK 3 et 6. Ce résultat est cohérent avec les Western anti-MPK6 où aucune variation dans les quantités MPK6 n'a été observée dans l'ensemble des échantillons (**Figure 5**).

Les gènes de défense n'ont pas été affectés dans les premières heures de l'interaction

En plus des gènes MAPKs, nous avons testé différents gènes liés aux réponses de défense à partir des mêmes extractions d'ARN. Nous avons notamment testé les Rbohs (respiratory burst oxidase homologues) C et D impliqués dans la production de ROS dans les étapes précoces des réponses immunitaires. Pour le temps 24h deux répliquas biologiques ont été effectuées et pour les temps 1h et 6h, seul un répliqua a été fait.

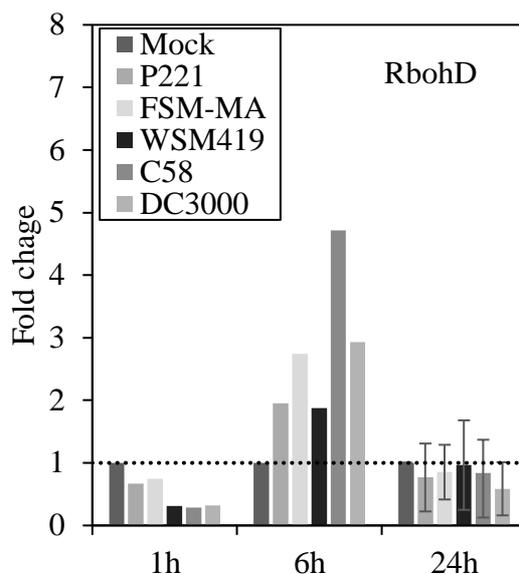


Figure 7 : Analyse RT-PCR quantitative d'un gène de la NADPH au cours des premières heures de l'interaction entre différentes bactéries pathogènes et symbiotiques au niveau des racines de *M. truncatula*. Les plantes *M. truncatula* ont été inoculé avec une suspension cellulaire de *P. syringae* DC3000, *A. tumefaciens* C58, *S. medicae* WSM419, *S. meliloti* FSM-MA ou *R. leguminosorum* P221 (DO_{600} final=0.5) après avoir été immergé une nuit dans de l'eau stérile. Les résultats sont présentés sous forme de Fold change entre les expressions relatives dans les échantillons traités et mock. Une barre en pointillé marque la valeur 1 indiquant l'absence de variation d'expression. Les expressions relatives ont été calculées par rapport à l'actine. Pour le temps 24h, deux répliquas biologiques ont été effectués et aux temps 1h et 6h un seul répliqua a été fait.

Les fold change d'expression entre le traitement avec bactéries et le traitement mock ne montrent aucune différences significative des niveaux d'expression sur les trois temps testés pour le gène RbohD (**Figure 7**). Quant au gène RbohC, aucune expression n'a pu être détectée dans l'ensemble des échantillons. Ceci suggère qu'en moins de 24h, les bactéries symbiotiques et pathogéniques n'affectent pas l'expression de RbohD. Quant à RbohC, les résultats montre, a priori, que ce gène n'est pas exprimé dans ces conditions.

En plus des gènes de la NADPH oxydase, nous avons testé d'autre gène de défense impliqués dans la PTI tel que FLS2 (flagellin-sensitive 2) qui est un récepteur de la flagelline, PR10 (pathogenesis-related 10) et WRKY33 (WRKY transcription factor 33) un facteur de transcription des gènes de défense dont on sait chez *A. thaliana* qu'il est induit en aval de l'activation de MPK3 et 6 (Mao et al., 2011).

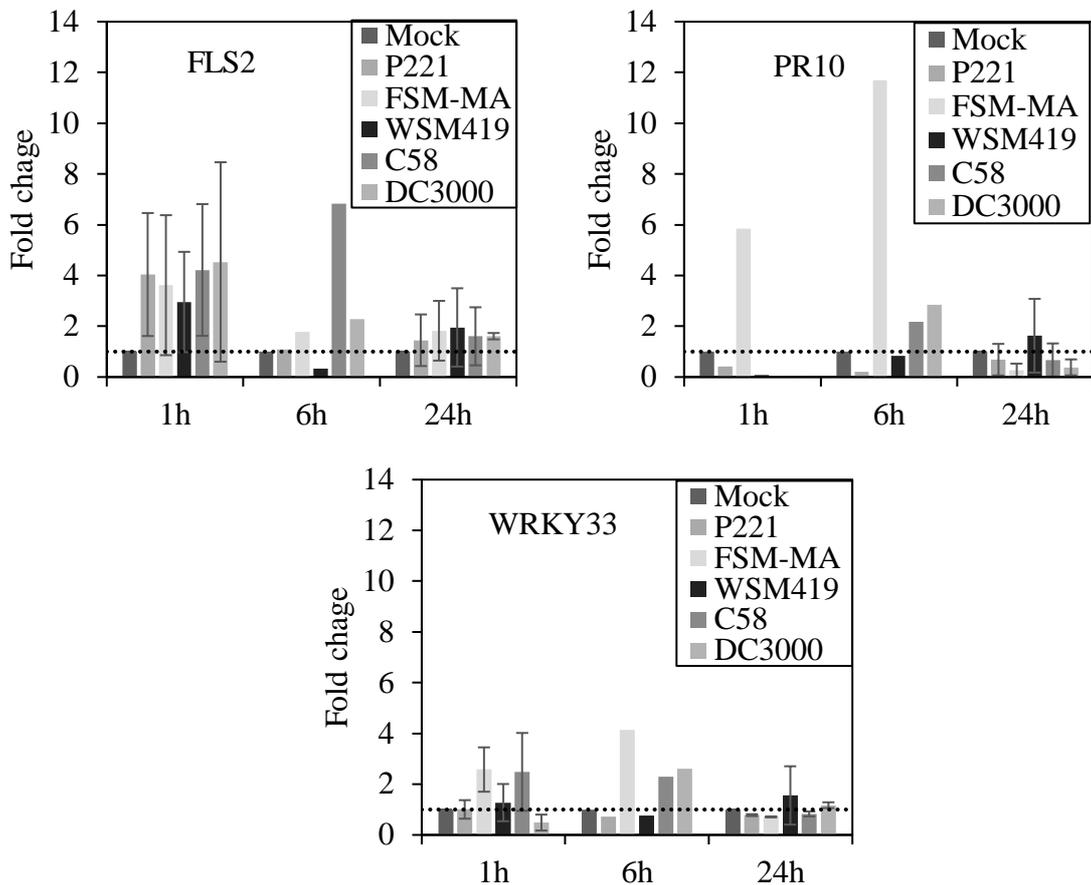


Figure 8 : Analyse RT-PCR quantitative des profils d'expression des gènes de défense au cours des premières heures de l'interaction entre différentes bactéries pathogènes et symbiotiques au niveau des racines de *M. truncatula*. Les plantes *M. truncatula* ont été inoculé avec une suspension cellulaire de *P. syringae* DC3000, *A. tumefaciens* C58, *S. medicae* WSM419, *S. meliloti* FSM-MA ou *R. leguminosorum* P221 (DO₆₀₀ final=0.5) après avoir été immergé une nuit dans de l'eau stérile. Les résultats sont présentés sous forme de Fold change entre les expressions relatives dans les échantillons traités et mock. Une barre en pointillé marque la valeur 1 indiquant l'absence de variation d'expression. Les expressions relatives ont été calculées par rapport à l'actine. Pour les temps 1h de FLS2 et WRKY33 et les temps 24h, deux répliquas biologiques ont été effectués. Aux temps 1h pour PR10 et les temps 6h, un seul répliqua a été fait.

Comme précédemment, les fold change d'expression entre le traitement avec bactéries et le traitement mock ne montrent aucune différences significatives des niveaux d'expression sur les trois temps testés pour les trois gènes FLS2, PR10 et WRKY33 (**Figure 8**).

En plus de ces trois gènes, nous avons testé un des homologues de FRK1 (FLG22-induced receptor kinase 1), un récepteur kinase induit suite à la perception de l'épitope flg22 chez *A. thaliana* (Asai et al., 2002). Il existe plusieurs homologues de FRK1 chez *M. truncatula*, mais nous nous sommes concentrés sur Medtr8g015340. Les résultats montrent a priori que ce gène n'est pas exprimé dans l'ensemble des échantillons (données non présentées).

Nous avons aussi testé différents gènes impliqués dans les voies hormonales et la production de métabolites secondaires antimicrobiens : PR1 (pathogenesis-related 1), PR5 (pathogenesis-related 5) et NPR2 pour la signalisation de l'acide salicylique et PAL (phenylalanine ammonia-lyase) pour la biosynthèse de phénylpropanoïdes.

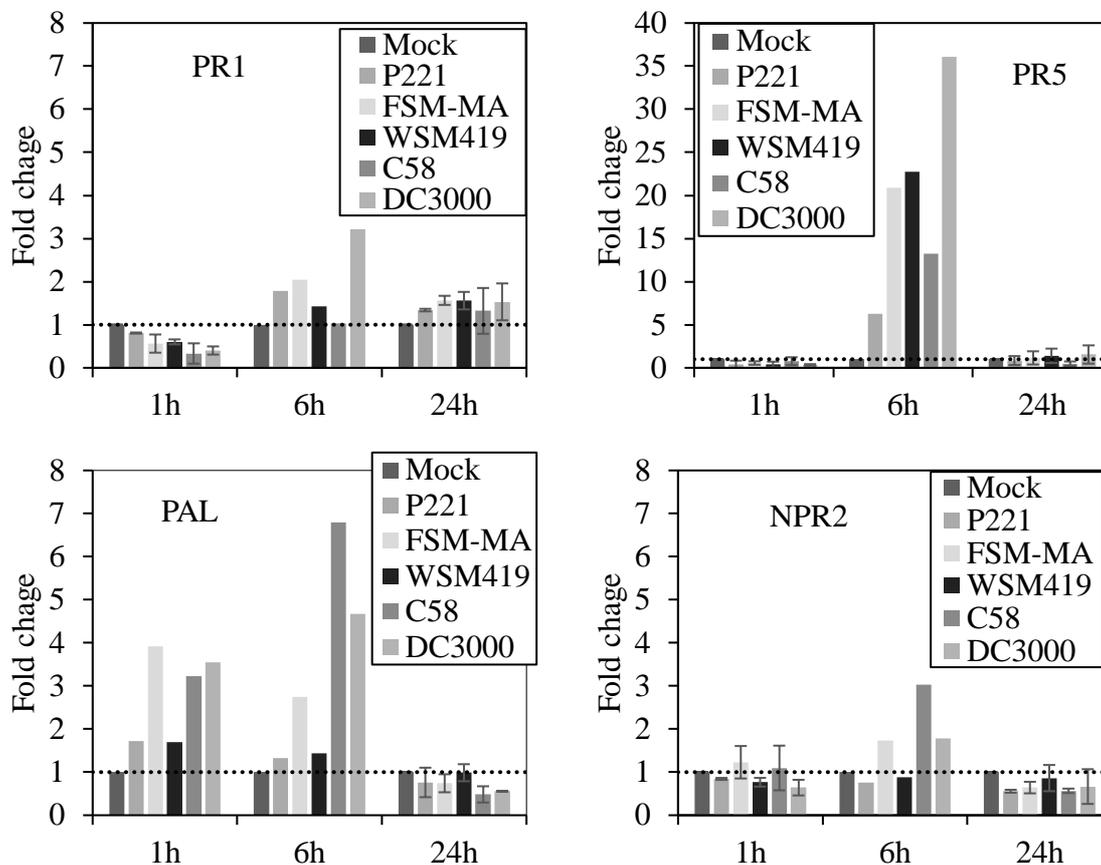


Figure 9: Analyse RT-PCR quantitative des profils d'expression des gènes marqueurs des voies hormonales et de la production de métabolites secondaires antimicrobiens au cours des premières heures de l'interaction entre différentes bactéries pathogènes et symbiotiques au niveau des racines de *M. truncatula*. Les plantes *M. truncatula* ont été inoculé avec une suspension cellulaire de *P. syringae* DC3000, *A. tumefaciens* C58, *S. medicae* WSM419, *S. meliloti* FSM-MA ou *R. leguminosorum* P221 (DO_{600} final=0.5) après avoir été immergé une nuit dans de l'eau stérile. Les résultats sont présentés sous forme de Fold change entre les expressions relatives dans les échantillons traités et mock. Une barre en pointillé marque la valeur 1 indiquant l'absence de variation d'expression. Les expressions relatives ont été calculées par rapport à l'actine. Pour les temps 1h de PR1, PR5 et NPR2 et les temps 24h, deux répliques biologiques ont été effectués. Pour les temps 1h pour PAL et les temps 6h, un seul réplica a été fait.

De nouveau, les fold change d'expression entre le traitement avec bactéries et le traitement mock ne montrent aucune différences significative des niveaux d'expression sur les trois temps testés pour ces différents gènes excepté PR5 au temps 6h, où une forte expression est induite par l'ensemble des bactéries ne montrant aucune spécificité entre pathogènes et symbiontes (**Figure 9**).

Les gènes marqueurs de la symbiose n'ont pas été exprimés dans les premières heures de l'interaction

En parallèle des gènes marqueurs des réponses de défenses, nous avons testé plusieurs gènes marqueurs de la symbiose induits dans les stades précoces de l'interaction symbiotique : NPL (nodulation pectate lyase), ENOD11 (early nodulin 11) et NIN (nodule inception). Sur les trois temps testés, aucune expression de ces gènes a été détecté en présence ou en absence de bactéries symbiotiques et pathogènes, suggérant des problèmes sur le plan expérimental (données non présentées).

Discussion

Dans cette étude, nous avons voulu savoir comment les réponses immunitaires de la plante sont modulées dans les stades précoces de l'interaction symbiotique par rapport à des interactions pathogéniques et d'autre part, quels impacts ces réponses précoces étaient susceptibles d'avoir sur la finalité de l'interaction.

Parmi les deux réplicas réalisés, un seul a pu être décrit pour les mesures d'activité des MAPK suite à des problèmes techniques. Sur ce réplica, les niveaux d'activité de MPK3 et 6 ont été induite dès 15min d'inoculation avec *P. syringae* DC3000, *A. tumefaciens* C58, *S. medicae* WSM419 et *S. meliloti* FSM-MA. A 30min, les deux pathogènes testés ont induit une forte activation des MPK 3 et 6 alors que les bactéries symbiotiques semblent avoir retrouvé un niveau basal (**Figure 3**). Ce résultat est cohérent avec une étude récente réalisée avec JA17 et une méthode de traitement légèrement différente où une activation plus faible de MPK 6 et 3 en présence de bactéries symbiotiques par rapport à des bactéries pathogènes avaient été observée (Chen et al., 2017). Ce résultat suggère en outre une inhibition rapide des voies MAPKs par les bactéries symbiotiques. Cette inhibition pourrait faire appel à des signaux spécifiques à la symbiose tel que les Facteur Nod dont une étude a montré qu'ils sont capables de supprimer partiellement la PTI chez des non légumineuses (Liang et al., 2013). Mais d'autres molécules et mécanismes d'inhibition pourraient aussi intervenir. Il est également possible que les bactéries symbiotiques soient moins bien perçues

par rapport aux bactérie pathogènes induisant ainsi moins de réponse immunitaire. Cette question mérite dans l'avenir davantage d'éclaircissements.

Pour les données d'expression deux répliquas biologiques ont été faits pour les temps 1h et 24h et un seul répliqua pour le temps 6h. Bien que les données montrent quelques tendances subtiles comme par exemple FLS2 qui semble être exprimé à 1h en présences des différentes bactéries (**Figure 8**) ou PR5 à 6h (**Figure 9**), suggérant aucune différence dans les réponses immunitaires induites par les pathogènes et symbiotiques, ainsi qu'aucun impact sur l'efficacité symbiotique. Ainsi que d'autres gènes semblent montrer quelques différences subtiles entre pathogènes et symbiotiques, on observe que RbohD, PAL et NPR2 sont exprimés à 6h et que les bactéries pathogènes induisent une expression plus forte que les bactéries symbiotiques (**Figure 7, 8 et 9**). Cependant, n'ayant qu'un seul répliqua pour ce temps, il serait important de répéter l'expérience pour conclure.

L'ensemble des résultats d'expression de gène de défense ne permettent finalement pas de conclure sur des différences significatives d'expression pour aucun des gènes testés et aucune des conditions de traitement (**Figure 6, 7, 8 et 9**). Nos données tendent même à indiquer qu'aucune des inoculations réalisées n'induit l'expression des gènes testés. Si cela était confirmé par la suite, cela montrerait qu'au niveau des racines, il n'y a pas de différence, au niveau transcriptionnel, en ce qui concerne les réponses produites par différents pathogènes et symbiontes. Ce résultat suggérerait alors que la spécificité des réponses de la plante hôte à des bactéries pathogènes et symbiotiques ne se feraient pas à des temps si précoces. De plus, l'absence de différence entre les deux bactéries symbiotiques indiquerait également que les réponses des temps précoces n'ont pas d'impact sur l'efficacité symbiotique finale.

Ces résultats restent toutefois surprenants. L'absence d'induction des gènes de défense en présence de pathogènes est un élément qui diffère de résultats publiés. En effet, il a été montré que les gènes de défense MPK3 et 6, FLS2, PR10, WRKY33 et PR5 étaient induit par *P. syringae* DC3000 à 24h au niveau des racines de *M. truncatula* JA17 (Chen et al., 2017). Une étude transcriptomique chez *M. truncatula* JA17 a aussi montré une induction des gènes de défense 1h après inoculation avec une bactérie symbiotique (Lohar et al., 2006).

Autre fait surprenant, les bactéries symbiotiques n'ont pas induit l'expression des gènes marqueurs de la symbiose, or il a été montré que ces différents gènes étaient exprimés à partir de 24h chez *M. truncatula* JA17 en présence de *S. meliloti* Sm2011 (Chen et al., 2017).

En plus des données publiées, nos résultats n'ont montré aucune concordance entre le niveau d'activité des MAPKs et l'expression des gènes de défense. L'activation des MPK 3 et 6 chez les pathogènes à 30min n'a pas induit une plus forte expression des gènes de défenses par rapport aux

bactéries symbiotiques, notamment des gènes WRKY33 ou PR1 qui est exprimé suite à l'activation de VIP1 par MPK3 chez *A. thaliana* (Mao et al., 2011 ; Djamei et al., 2007).

Pris dans leur ensemble, ces incohérences pointent potentiellement vers différents problèmes lors de la conception ou de la réalisation du protocole expérimental. Outre le faible nombre de réplicas, ce qui est inhérent à une étude limitée à quelques mois, il est possible que les temps choisis pour les analyses transcriptionnelles, ou encore que les gènes sélectionnés pour ces analyses ne soient pas pertinents. Il est également possible que le traitement mock utilisé dans notre protocole expérimental induise une forte reprogrammation génique qui masquerait les effets des expositions aux différentes bactéries. Il est également possible que l'écotype R108 se comporte différemment de JA17, ce qui expliquerait les écarts entre nos résultats et ceux publiés. Enfin une alternative à considérer serait que les activités MAPKs que nous observons avec des intensités différentes entre pathogènes et symbiontes soient en fait trop faible pour provoquer des différences claires au niveau de l'expression des gènes.

En résumé, nos travaux ont mis en évidence une différence remarquable dans le pattern d'activation précoce de MPK6 et 3 chez *M. truncatula* R108 en réponse à des bactéries symbiotiques et pathogéniques. Toutefois nous n'avons pas pu corrélérer ce résultat avec des différences d'expression pour différents gènes marqueurs des processus symbiotiques ou des réponses de défense, soit parce que les différences d'activité MAPK sont trop faibles pour induire des différences transcriptionnelles claires, soit en raison de défauts dans la réalisation expérimentale (mauvais choix de marqueurs, de temps, problèmes de manipulation entraînant de grandes variabilités...). En l'état, nos résultats suggèrent que dans les étapes précoces il n'y pas de différences, ou des différences subtiles, entre les réponses de la plante hôte à des bactéries symbiotiques et pathogéniques, et que la finalité des interactions (maladie, plus ou moins grande efficacité symbiotique...) se joue à des étapes ultérieures ou impliquent des mécanismes autres que ceux que nous avons analysés. Ces résultats ne permettent pas de conclure sur les caractéristiques des réponses immunitaires chez les légumineuses provoquées par des bactéries symbiotiques par rapport aux pathogènes ni sur l'impact de ces réponses précoces sur l'efficacité finale de la symbiose.

Perspectives du travail

Le génotypage effectué n'a pas permis de détecter des mutants d'insertion MPK3. Dans un premier temps, il s'agirait de génotyper avec des primers qui englobent l'ensemble du gène MPK3 afin de vérifier la présence d'une insertion dans ce gène. Une autre possibilité serait d'étudier des lignées silencées transitoirement via l'utilisation d'*Agrobacterium rhizogenes*. Ceci permettrait de caractériser et d'identifier les MAPKs impliqués dans les réponses immunitaires et symbiotiques.

En parallèle, des répliques des mesures d'activités MAPKs et des expressions de gènes de défense devront être réalisées. Il serait intéressant d'observer l'expression des différents gènes à des temps plus tardifs (48h et 72h par exemple) ainsi que tester d'autres gènes de défense tels que ACS2 et 6, deux gènes impliqués dans la synthèse de l'éthylène, une hormone connue pour jouer un rôle important dans la perception rapide à la fois de signaux pathogènes et symbiotiques (Joo et al., 2008; Berrabah et al., 2018). Autres éléments pouvant être modifiés, est d'utiliser *M. truncatula* JA17 en parallèle de *M. truncatula* R108 afin de vérifier, d'une part, si le protocole expérimental permet de retrouver des résultats publiés et d'autre part, cela permettra de voir si l'absence d'expression de gène est liée à l'écotype utilisé.

En ce qui concerne la différence d'activité MAPK, une suite intéressante serait... Dans cette étude, nous avons utilisé différentes bactéries symbiotiques et pathogènes, une alternative serait de comparer une souche sauvage de rhizobies avec différents mutants notamment pour les EPS et le Facteur Nod qui semble avoir un rôle dans la répression des réponses immunitaires (Liang et al., 2013). Cette approche serait susceptible d'éclairer les mécanismes par lesquels les bactéries symbiotiques inhibent les réponses immunitaires précoces.

Pour finir, si nous nous sommes intéressés ici aux réponses immunitaires durant les stades précoces de la symbiose, il serait intéressant également de regarder ces réponses à différents stades de la symbiose. L'équipe a notamment identifié des gènes MAPKs dont l'expression est fortement augmentée dans les nodules matures. L'étude du rôle potentiel de ces gènes MAPKs à la fois pour la symbiose et la réponse aux pathogènes est actuellement en cours avec la caractérisation de différents mutants *tnt1* pour *M. truncatula* et de mutants Tilling pour le pois.

De manière plus large, l'ensemble des données sur la modulation des réponses immunitaires chez les plantes légumineuses en interaction avec des bactéries rhizobiales pourront être utilisées pour l'amélioration éventuelle de la résistance et/ou l'efficacité symbiotique chez certaines légumineuses à intérêt agronomique.

Bibliographies

- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J** (2002) Map kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**: 977–983
- Berrabah F, Balliau T, A EH, George J, Zivy M, Ratet P, Gourion B** (2018) Control of the ethylene signaling pathway prevents plant defenses during intracellular accommodation of the rhizobia. doi: 10.1111/nph.15142
- Cardinale F, Jonak C, Ligterink W, Niehaus K, Boller T, Hirt H** (2000) Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *J Biol Chem* **275**: 36734–36740
- Chen T, Duan L, Zhou B, Yu H, Zhu H, Cao Y, Zhang Z** (2017) Interplay of Pathogen-Induced Defense Responses and Symbiotic Establishment in *Medicago truncatula*. *Front Microbiol* **8**: 973
- Djamei A, Pitzschke A, Nakagami H, Rajh I, Hirt H** (2007) Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling. *Science* **318**: 453–456
- Ehrhardt DW, Atkinson EM, Long SR** (1992) Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* **256**: 998–1000
- Fernandez-Pascual M, Lucas MM, de Felipe MR, Bosca L, Hirt H, Golvano MP** (2006) Involvement of mitogen-activated protein kinases in the symbiosis *Bradyrhizobium-Lupinus*. *J Exp Bot* **57**: 2735–2742
- Haag AF, Arnold MFF, Myka KK, Kerscher B, Dall'Angelo S, Zanda M, Mergaert P, Ferguson GP** (2013) Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium-legume* symbiosis. *FEMS Microbiol Rev* **37**: 364–383
- Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C, et al** (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: A new nomenclature. *Trends Plant Sci* **7**: 301–308
- Jamet A, Mandon K, Puppo A, Hérouart D** (2007) H₂O₂ is required for optimal establishment of the *Medicago sativa*/*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *J Bacteriol* **189**: 8741–8745
- Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME, Walker GC** (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat Rev Microbiol* **5**: 619–633
- Jones KM, Sharopova N, Lohar DP, Zhang JQ, VandenBosch KA, Walker GC** (2008) Differential response of the plant *Medicago truncatula* to its symbiont *Sinorhizobium meliloti* or an exopolysaccharide-deficient mutant. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 704–709
- Joo S, Liu Y, Lueth A, Zhang S** (2008) MAPK phosphorylation-induced stabilization of ACS6 protein is mediated by the non-catalytic C-terminal domain, which also contains the cis-

determinant for rapid degradation by the 26S proteasome pathway. *Plant J* **54**: 129–140

Kazmierczak T, Nagymihaly M, Lamouche F, Barriere Q, Guefrachi I, Alunni B, Ouadghiri M, Ibjibijen J, Kondorosi E, Mergaert P, et al (2017) Specific Host-Responsive Associations Between *Medicago truncatula* Accessions and *Sinorhizobium* Strains. *Mol Plant Microbe Interact* **30**: 399–409

Liang Y, Cao Y, Tanaka K, Thibivilliers S, Wan J, Choi J, Kang CH, Qiu J, Stacey G (2013) Nonlegumes respond to rhizobial nod factors by suppressing the innate immune response. *Science* (80-) **341**: 1384–1387

Libault M, Farmer A, Brechenmacher L, Drnevich J, Langley RJ, Bilgin DD, Radwan O, Neece DJ, Clough SJ, May GD, et al (2010) Complete Transcriptome of the Soybean Root Hair Cell, a Single-Cell Model, and Its Alteration in Response to *Bradyrhizobium japonicum* Infection. *Plant Physiol* **152**: 541–552

Lohar DP, Sharopova N, Endre G, Peñuela S, Samac D, Town C, Silverstein K a T, VandenBosch K a (2006) Transcript analysis of early nodulation events in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **140**: 221–234

Lopez-Gomez M, Sandal N, Stougaard J, Boller T (2012) Interplay of flg22-induced defence responses and nodulation in *Lotus japonicus*. *J Exp Bot* **63**: 393–401

Mao G, Meng X, Liu Y, Zheng Z, Chen Z, Zhang S (2011) Phosphorylation of a WRKY Transcription Factor by Two Pathogen-Responsive MAPKs Drives Phytoalexin Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 1639–1653

Mur LAJ, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E (2008) The hypersensitive response; The centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot* **59**: 501–520

O'Brien JA, Daudi A, Butt VS, Bolwell GP (2012) Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* **236**: 765–779

Ryu H, Laffont C, Frugier F, Hwang I (2017) MAP Kinase-Mediated Negative Regulation of Symbiotic Nodule Formation in *Medicago truncatula*. *Mol Cells* **40**: 17–23

Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JDG, Boller T, Felix G (2006) Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts *Agrobacterium*-Mediated Transformation. *Cell* **125**: 749–760

Annexes

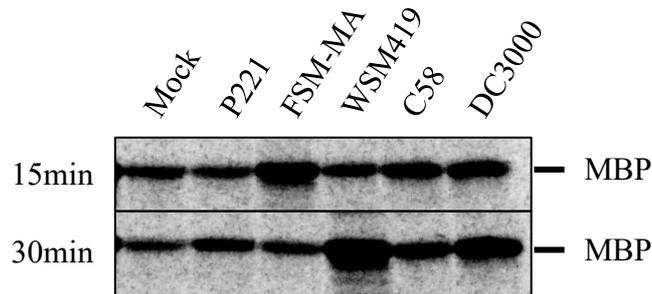
Annexe I : Liste des primers utilisés pour le génotypage

NOM	SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE	TM ET TAILLE ATTENDU
NF19267FW (SENS)	TGTTGAATACGGAGACGAATGAG	55°C, 1,1kb
NF19267RV (ANTI-SENS)	AGGACCAACCCAAATTTTAAGATG	
LTR4FW	TACCGTATCTCGGTGCTACA	56°C
LTR6RV	GCTACCAACCAAACCAAGTCAA	

Annexe II : Liste des primers utilisés pour les RT-qPCR

GENES	SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE	
	SENS	ANTI-SENS
ACTINE	ACGAGCGTTTCAGATG	ACCTCCGATCCAGACA
MTMAPK3	TGGTTGCTGTGAAGAAGATA	TGAGTTCGGTGGTTATGTAA
MTMAPK6	ACTGGCCCGTGTAACATCTG	TCTTCTGACGGGGTACCGAT
MTFLS2	ACAACCGCCTCTCAGGATTG	ACATATTTCTGCACCCGGCA
MTWRKY33	CATGATGTTCTGCACCACG	GGCTCCTCTTTGGCTCTACC
MTRBOHC	ACCTCAGCGTTCACATCCAA	CGCTCCATAAAGGACCGTCAA
MTRBOHD	ACATGGCTCAGGAGCAAGAC	TGAAGAAGGCGTGGAAGTC
MTPR10	GGGCTTCCAGACACAATAGAG	CCACCCTTGATTTCTCTTCAC
MTPR5	TGTCCACCCACAACTACTC	TCCATTTGAGCAAGTGAAAGTG
MTPR1	ATCCCCCAGAACATTGCTCG	CCATCCAACACCACTACCCC
MTPAL	GAATTGCTTCCCATGATAGTGGT GTTAG	GGCATTCAAAAACCTAATTAGCTC C
MTNPL	ACAACCGCAAGAGACTAGCA	CCTGGCTTAGGATTCACAGGG
FRK1	TGGCTGATTCGGCCTATCCA	TGGAGTTCCTGCAACAACAGTGG
MTNIN	GGAAGATTGAGAGGGGAAGCTT	GCAATGTGGGGATTTAGAGATT
MTENOD11	ATCCCACAATATGCCTCCA	AGGAAGTGGTGGCTTTAGC
MTNPR2	AAAGGATTGTCTGAAGAATGAAG GG	ACAAAGTTAAGAAGACGTCTCTGG

Annexe III : Comparaison de l'activité MAPK en réponse à différentes bactéries pathogènes et symbiotiques chez la racine de *M. truncatula* par immunokinase assay



Les plantes *M. truncatula* ont été inoculé avec une suspension cellulaire de *P. syringae* DC3000, *A. tumefaciens* C58, *S. medicae* WSM419, *S. meliloti* FSM-MA ou *R. leguminosorum* P221 (DO_{600} final=0.5) après avoir été immergé une nuit dans de l'eau stérile. De l'eau stérile a été utilisé comme contrôle (mock). L'analyse des Kinases assays a été réalisé sur des extrait protéique immunoprécipité avec l'anticorps anti-pTpY et la MBP a été utilisé comme substrat. Un seul réplica biologique a été décrite. Le Coomassie sert de contrôle de charge.