



HAL
open science

Effet de la nutrition azotée sur la résistance de la légumineuse *Medicago truncatula* à *Aphanomyces euteiches*

Elise Thalineau

► **To cite this version:**

Elise Thalineau. Effet de la nutrition azotée sur la résistance de la légumineuse *Medicago truncatula* à *Aphanomyces euteiches*. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2016. Français. NNT : 2016DIJOS011 . tel-01466925

HAL Id: tel-01466925

<https://theses.hal.science/tel-01466925>

Submitted on 13 Feb 2017

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.

Université de Bourgogne
Ecole doctorale Environnement Santé

Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon
Pôle mécanismes et gestions des interactions plantes-microorganismes – ERL CNRS 6300
Equipe NO et réponses de défense de la plante

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne
Sciences de la Vie

Effet de la nutrition azotée sur la résistance de la légumineuse *Medicago truncatula* à *Aphanomyces euteiches*

Par Elise Thalineau

Soutenue le 9 Décembre 2016

JURY

M. Fagard	Directeur de Recherche, INRA Versailles	Rapporteur
C. Jacquet	Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse	Rapporteur
M. Adrian	Professeur, Université de Bourgogne	Examineur
N. Pauly	Maître de Conférences, Université de Nice Sophia Antipolis	Examineur
HN. Truong	Chargé de recherche, INRA Dijon	Co-encadrante
S. Jeandroz	Professeur, AgroSup Dijon	Directeur de thèse

« Pour gagner, il faut prendre le risque de tout perdre. »

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord les membres du jury, Mesdames Marielle Adrian et Mathilde Fagard et Messieurs Christophe Jacquet et Nicolas Pauly, d'avoir acceptés d'évaluer mon travail.

Merci au Professeur David Wendehenne de m'avoir accueilli au sein de l'équipe et d'avoir suivi ce travail de près.

Pour m'avoir accordée leur confiance et m'avoir soutenue, je tiens à remercier très sincèrement tous ceux qui ont encadré ce travail et particulièrement mes directeurs de thèse, Hoai-Nam Truong et Sylvain Jeandroz. Merci d'avoir toujours été présents, de la préparation au concours à la soutenance, en passant par les manipulations et la rédaction. Hoai-Nam, merci pour tout ! Je suis contente d'avoir trouvé quelqu'un d'aussi « speed » que moi, si ce n'est plus... Je garde de bon souvenirs des manips (dans le noir) ensemble. Sylvain, merci d'avoir été un directeur de thèse aussi sympa ! Merci de ta disponibilité dans les moments importants.

Je souhaite également remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, Messieurs Michel Chalot et Pierre Frendo, d'avoir suivi mon travail et de m'avoir orientée pour mes travaux.

Je remercie l'équipe « Symbiose et état redox de la cellule » de l'INRA Sophia Antipolis de m'avoir formée à la transformation racinaire de *Medicago truncatula* et particulièrement Messieurs Nicolas Pauly et Alexandre Bosdari qui ont toujours répondu présents lors de mes questionnements.

Un grand merci à mes collègues de l'équipe NO: Carine, pour ton accueil et pour ta participation à ce travail, merci de m'avoir fait découvrir toute la gamme Lindt; Agnès, pour nos petites « bouffes »; Valérie et Angélique pour votre gentillesse et votre disponibilité; Claire, pour tes conseils avisés sur les protocoles de bioch; Seb, pour ta gentillesse et ton aide, tu es prêt à interrompre tes propres manips pour nous venir en aide; Steph, voleur de place de vélo, et Oliv', nageur hors pair, pour l'animation que vous mettez dans cette équipe.

Je tiens également à remercier les collègues des autres équipes: Jérôme pour ta bonne humeur, Francine pour tes sacrées expressions, Jonathan pour les prêts de produits chimiques et pour avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions de bioch', Arnaud de toujours te rendre disponible lorsque j'ai une question d'info, David de m'avoir formée à la qPCR...

Lénoch, cher collègue de bureau (que j'ai abandonné lâchement pour les derniers mois de rédac), merci pour ton soutien tant au niveau professionnel que personnel.

Maudinette, tu m'auras manqué cette dernière année de thèse, surtout nos petites soirées.

Popo, merci de m'avoir si bien accueilli à Dijon. A peine arrivée au labo, que tu me traînais déjà en soirée. Content de d'avoir partagé autant de choses avec toi.

Vinc', merci pour tes plaisanteries et merci de m'avoir fait découvrir la course à pied à 2 h du mat' (note à moi-même : ne jamais renouveler !).

Cannelloni, merci pour ta bonne humeur et ton rire perpétuel quand on te croise.

Hervé, toujours agréable de parler avec toi (science ou autre) et merci pour ton esprit déjanté.

Les princesses, les « blondasses », les barbies... Bref, merci à vous Justipouf et Daphnée.

Cécile, merci d'être une personne aussi sympathique. Et merci pour ta super technique de remplissage de plaque 384.

Carole, merci d'avoir toujours été là et de m'avoir soutenue dans toutes mes décisions.

Alice, merci pour nos soirées vikings et GOT, merci d'avoir testé avec moi tous les restaurants de Dijon et osé me traîner boire une bière pour finir à 5h du mat'...

Merci également à Julie, Luiz, Yuko, Charline, Emilie, Nora et Nass pour les moments passés ensemble.

Je remercie tous les stagiaires, Antoine (mon p'tit), Jana, Julien, Jordan, Laure et Camille (x2), d'avoir participé à ces travaux.

Merci à mes colocs, Lolo et Pierre de m'avoir accompagnée et supportée dans les coups durs. Mr Mourey, tes bons petits desserts vont me manquer. Lolo des îles, merci pour tes mojitos, pour nos soirées déguisées, pour tout, tout simplement !!

Je tiens également à remercier mes supers triathlètes ! Merci à l'équipe D2, de m'avoir fait vivre des saisons de tri de folie: Axel, coach, qui a toujours été là; Da Roch pour ta bonne humeur (enfin peut être pas dans la montée de Crépey...); Ju, d'avoir de plus grosses épaules

que moi, et surtout pour cette complicité; Adrie, pour tes encouragements sur tous les plans et pour m'avoir gavée avec tes « je ne sais pas nager... »; Caro, pour ton franc parler et ta volonté; Popo, de nous avoir apporté du bon chocolat suisse, pour tes expressions particulières et pour ta simplicité et Mathilde, la ptiote, de m'avoir remontée le moral dans les coups durs sportifs.

Je remercie également Lau (pour ta présence) et Seb d'avoir essayé en vain de me faire aimer le vélo, Bruno pour nos soirées, Alex et Bastien pour votre soutien quand je sortais avant vous de l'entraînement pour aller « arroser mes plantes », Laurence pour nos grandes discussions, Yannick pour cette saison de bike & run où nous avons tout déchiré et ta Caro complètement déjantée !

Merci également à tous les autres, Mélissa, Andréa, Charly, Arthur, Mektard, Toto, Titi, La Mary, François, La Fred, Pauline, Léa, Agnès et Laurent.

Je remercie aussi mes amies tourangelles de la natation synchronisée (Bérange, Nancy, Dudu, Jano, Cha, Lulu, Chlo...) et des girondins (Jess et Cha). Merci également à mes amis tourangeaux et bordelais Lolo, La momo, Pierrick, Rémi, Romain, Arnaud, Fred; Thomeline et Allan (les australiens) !

Merci à mon frère et Geta de votre attention, vous savez ce que c'est ! Et merci d'avoir trouvé le moyen de vous marier l'été de ma rédac en Roumanie. Merci également à ma sœur, pour ta grande goule et ton réconfort et Ben, pour les bons moments partagés. Et pour finir, un très grand merci à mes parents d'avoir toujours été là ! Et comme dirait si bien le père, passe ton bac d'abord !

Résumé

L'azote (N) est un facteur majeur limitant la croissance des plantes. Sa disponibilité peut également avoir un impact sur la résistance des plantes aux agents pathogènes en régulant leur immunité. Afin de mieux comprendre les liens entre la nutrition azotée et les défenses de la plante, nous avons analysé l'impact de la disponibilité en N sur la résistance de *Medicago truncatula* à l'agent pathogène racinaire, *Aphanomyces euteiches*, en prenant en compte la variabilité génétique de la plante. Cet oomycète est considéré comme un des facteurs limitant le plus la production des légumineuses. Deux conditions de nutrition azotée, non limitante ou carencée en N, et dix génotypes de *M. truncatula* ont été testés *in vitro*. Les résultats ont montré que la résistance est modulée par les conditions nutritionnelles, dépendamment du génotype. Les analyses d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme azoté et dans les réponses de défense ainsi que la quantification des teneurs en acides aminés et des composés métaboliques secondaires ont montré des réponses différentes selon les génotypes et la condition nutritive. Elles ont souligné en particulier le rôle potentiellement important de la glutamine dans ce pathosystème. De plus, nous avons mis en évidence l'importance de l'homéostasie du monoxyde d'azote (NO) dans la résistance de *M. truncatula* à *A. euteiches* et que la disponibilité en azote impactait l'homéostasie du NO en affectant les niveaux de S-nitrosothiols et l'activité de la S-nitrosogluthathion réductase dans les racines. Ces résultats soulignent l'importance du métabolisme azoté et de son interaction avec le génotype de la plante dans les réactions de défense chez *M. truncatula*.

Mots clés: *Medicago truncatula*, *Aphanomyces euteiches*, variabilité génétique, nutrition azotée, stress biotiques, monoxyde d'azote.

Abstract

Nitrogen (N) is a major limiting factor for plant growth. N availability can also impact plant resistance to pathogens by regulating plant immunity. To better understand the links between N nutrition and plant defense, we analyzed the impact of N availability of plant on *Medicago truncatula* resistance to the root pathogen, *Aphanomyces euteiches*, taking into account plant genetic variability. This oomycete is considered as the most limiting factor for legume production. Two conditions of N nutrition, non-limiting or deprived in N, and ten plant genotypes were tested *in vitro*. The results showed that the resistance is modulated by nutritional conditions, depending on plant genotype. Analysis of the expression of genes involved in N metabolism and defense and quantification of different amino-acids contents and secondary metabolic compounds showed different responses of the genotypes and highlighted a potential role of glutamine in this pathosystem. Furthermore, our work underlined the importance of nitric oxide (NO) homeostasis for *M. truncatula* resistance to *A. euteiches* and that N availability impacts NO homeostasis by affecting S-nitrosothiol levels and S-nitrosogluthathione reductase activity in roots. These studies highlight, therefore, the importance of N metabolism and its interaction with plant genotype in defense responses in *M. truncatula*.

Keywords: *Medicago truncatula*, *Aphanomyces euteiches*, genetic variability, nitrogen nutrition, biotic stress, nitric oxide.

Sommaire

Liste des figures et des tableaux	15
Abréviations.....	19
Introduction générale	21
Matériels et méthodes	29
1. Matériel biologique.....	31
1.1 Génotypes, germination des graines de <i>M. truncatula</i> et condition de culture.....	31
1.2 Conditions de culture de l'oomycète <i>A. euteiches</i>	31
1.3 Inoculation de <i>M. truncatula</i> par <i>A. euteiches</i>	33
2. Transformation des racines de <i>M. truncatula</i> par <i>Agrobacterium rhizogenes</i>.....	33
3. Annotation des symptômes et architecture racinaire.....	37
4. Détection d'<i>A. euteiches</i> par test ELISA.....	37
5. Quantification des différents composés	38
5.1 Mesure des concentrations en nitrate et azote total	38
5.2 Mesure des concentrations en phosphate.....	38
5.3 Mesure des concentrations en composés phénoliques solubles.....	39
5.4 Mesure des concentrations en acides aminés.....	40
6. Mesure des activités enzymatiques.....	40
6.1 Nitrate réductase	40
6.2 GSNO réductase	41
7. Quantification des formes actives de l'oxygène et de l'azote	41
7.1 Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	41
7.2 Monoxyde d'azote (NO) et peroxydinitrite (ONOO ⁻)	42
7.3 S-nitrosothiols (SNO)	42
8. Immunodétection des protéines.....	43
9. Analyse de l'expression de gènes	44
9.1 Extraction d'ARN et synthèse d'ADNc.....	44
9.2 Analyse de l'accumulation des transcrits par PCR quantitative en temps réel.....	45
10. Analyses statistiques	47
Chapitre I: Impact du génotype de la plante sur la résistance à <i>Aphanomyces euteiches</i> au cours d'une carence nutritionnelle	49
1. Introduction: données bibliographiques.....	51
1.1 Interaction plantes-microorganismes pathogènes	51
a. Reconnaissance de l'agent pathogène.....	51
b. La transduction des signaux.....	53

c. Les réponses de défense.....	57
1.2 Lien entre la résistance des plantes et la disponibilité en nutriments	59
1.3 Métabolisme de l'azote	61
a. Cycle de l'azote	61
b. Acquisition de l'azote par la plante.....	62
c. Réduction du nitrate et synthèse d'acides aminés	69
1.4 Réponse de la plante à la limitation en nitrate	71
a. Le nitrate: élément nutritif et molécule signal	71
b. Effet de la carence azotée chez les plantes.....	75
1.5 Implication de l'azote dans les défenses immunitaires.....	78
a. Fertilisation azotée et maladies.....	78
b. Effet de l'azote sur les réponses de défense des plantes	78
c. Effet de l'azote sur la virulence de l'agent pathogène	82
d. Rôle des transporteurs d'azote dans l'interaction plante-agent pathogène	83
e. Stress biotique et métabolisme des acides aminés.....	85
1.6 Pathosystème: <i>Medicago truncatula</i> / <i>Aphanomyces euteiches</i>	89
a. La légumineuse <i>Medicago truncatula</i>	89
b. L'oomycète <i>Aphanomyces euteiches</i>	91
c. L'interaction <i>Medicago truncatula</i> / <i>Aphanomyces euteiches</i>	97
1.7 Objectifs.....	99
2. Résultats.....	101
2.1 Effets des éléments nutritifs sur l'interaction <i>M. truncatula</i> / <i>A. euteiches</i>	101
2.2 Article scientifique.....	103
a. Introduction.....	103
b. Article: Genotypic variability of nitrogen modulation of <i>Medicago truncatula</i> resistance to <i>Aphanomyces euteiches</i>	104
2.3 Résultats complémentaires: protection par le BABA de <i>M. truncatula</i> à <i>A. euteiches</i> sur milieu complet ou carencé (NØ).....	131
Chapitre II: Rôle du monoxyde d'azote (NO) dans la modulation de la résistance par la carence azotée.....	133
1. Introduction: données bibliographiques.....	135
1.1 Le monoxyde d'azote.....	135
1.2 Biosynthèse du NO	137
a. La synthèse du NO chez les animaux	137
b. La synthèse du NO chez les plantes.....	139
1.3 Mécanismes d'action du NO.....	143

a. Modifications post-traductionnelles induites par le NO	143
b. La modulation de la transcription de gènes	145
1.4 Homéostasie du NO	145
a. Les hémoglobines	147
b. Le peroxynitrite	147
c. GSNO et GSNO réductase	149
1.5 Interaction NO/ROS et système antioxydant	149
a. Synthèse des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et burst oxydatif	149
b. Cross-talk du NO avec les ROS	153
1.6 Rôle du NO chez les plantes	154
a. Croissance et développement	154
b. Stress abiotiques	155
c. Stress biotiques	155
d. Interactions symbiotiques	159
e. NO et nutrition azotée	160
1.7 Conclusion	160
2. Résultats	161
2.1 Article scientifique: Cross-regulation between N metabolism and nitric oxide (NO) signaling during plant immunity	161
2.2 Résultats complémentaires: implication de l'hémoglobine dans la résistance de <i>M. truncatula</i> à <i>A. euteiches</i>	177
Chapitre III: Autre contribution	179
1. Caractérisation de la réponse du mutant B9 à l'infection par <i>A. euteiches</i>	181
2. Article scientifique: The <i>Medicago truncatula</i> hypermycorrhizal B9 mutant displays an altered response to phosphate and more susceptible to <i>Aphanomyces euteiches</i> ..	183
Conclusions & Perspectives	201
1. Conclusions	202
1.1 Effet de la carence azotée sur la résistance de <i>M. truncatula</i>	202
1.2 Effet de la carence azotée sur la signalisation immunitaire régulée par le NO	204
1.3 Lien entre résistance et signalisation immunitaire au cours de la modulation de la résistance par la carence azotée	205
2. Perspectives	207
2.1 Poursuivre la piste des RNS et de leur homéostasie	209
a. Intégrer la dimension « variabilité génotypique »	209
b. Mesure des ROS et RNS sur des temps courts d'infection	209
c. Etudier les modifications post-traductionnelles induites par le NO	211

<i>d. Etudier le rôle des MAPKs en lien avec le NO</i>	211
2.2 Poursuivre l'étude du rôle de la glutamine	212
<i>a. Etendre les dosages de la glutamine et des acides aminés à d'autres génotypes</i> ..	212
<i>b. Etudier les liens glutamine et statut redox</i>	212
<i>c. Etudier le rôle et la régulation de la glutamine synthétase</i>	215
2.3 Développer une approche plus globale et intégrée	216
2.4 Etudier l'impact de la carence azotée sur la résistance à <i>A. euteiches</i> en conditions « naturelles »	217
Activités scientifiques	221
Références	227

Liste des figures et tableaux

Matériels et méthodes

Figure MM.1: Vecteurs utilisés pour la transformation de <i>M. truncatula</i>	p.34
Tableau MM.1: Composition des différents milieux nutritifs	p.30
Tableau MM.2: Composition du milieu Fahraeus	p.32
Tableau MM.3: Composition du milieu Shb10	p.36
Tableau MM.4: Liste des primers utilisés en qPCR	p.46

Chapitre I

Figure I.1: Evénements aboutissant à la réponse immunitaire de la plante lors de l'interaction avec des agents pathogènes	p.50
Figure I.2: Interaction entre agent pathogène et plante-hôte dans le cadre de la résistance gène pour gène	p.52
Figure I.3: Interaction entre les différents acteurs des voies de signalisation de la transduction du signal induite par la cryptogéine chez le tabac	p.54
Figure I.4: Régulations croisées entre les voies de signalisation du SA, du JA, de l'ET et de l'ABA	p.56
Figure I.5: Effets des nutriments sur la sensibilité des plantes à différentes maladies	p.58
Figure I.6: Le cycle de l'azote	p.60
Figure I.7: Echange de signaux lors d'une symbiose rhizobienne-légumineuse	p.64
Figure I.8: Développement d'une mycorhize à arbuscules	p.66
Figure I.9: Assimilation du nitrate et de l'ammonium dans la plante	p.68
Figure I.10: Biosynthèse des acides aminés dans les plantes	p.70
Figure I.11: Réponse de la plante à la carence azotée	p.74
Figure I.12: Expression des transporteurs de nitrate (<i>AtNRT2.1</i>) et d'ammonium (<i>AtAMT1.1</i>) dans les racines d' <i>A. thaliana</i>	p.76
Figure I.13: Impact de la concentration en nitrate sur l'indice de nutrition azotée (NNI)	p.76
Figure I.14: La carence azotée entraîne une augmentation de la sensibilité de la tomate à l'agent pathogène nécrotrophe <i>Botrytis cinerea</i>	p.80
Figure I.15: Biosynthèse des anthocyanes et des phytoalexines issues de la phénylalanine	p.84
Figure I.16: Synthèse du glutathion, un antioxydant lors de la formation de ROS	p.84
Figure I.17: Interconnexions entre le métabolisme glutamine, redox et SA	p.86

Figure I.18 : Relation phylogénétique chez les Fabacées (légumineuses)	p.90
Figure I.19 : Relation phylogénétique chez les Papilionacées	p.90
Figure I.20 : Arbre phylogénétique des eucaryotes	p.92
Figure I.21 : Arbre phylogénétique des oomycètes	p.92
Figure I.22 : Diagramme illustrant le cycle de vie d' <i>Aphanomyces euteiches</i>	p.94
Figure I.23 : Symptômes provoqués par <i>Aphanomyces euteiches</i> (15 jours après infection) sur le génotype tolérant A17 et le génotype sensible F83005.5 de <i>Medicago truncatula</i>	p.96
Figure I.24 : Mesure des symptômes d'infection sur le génotype A17	p.102
Figure I.25 : Graphique représentatif d'une analyse en composante principale	p.130
Tableau I.1 : Effets de la fertilisation minérale sur les dégâts provoqués par la maladie des plantes	p.58
Tableau I.2 : Mesure des symptômes	p.100

Chapitre II

Figure II.1 : Oxydation/réduction du monoxyde d'azote	p.134
Figure II.2 : Transformation de la L-arginine en L-citrulline avec libération de NO	p.136
Figure II.3 : Fonctionnement générale des NOS animales	p.136
Figure II.4 : Les voies majeures de production de NO chez les plantes	p.138
Figure II.5 : Modifications post-traductionnelles induites par le NO	p.142
Figure II.6 : Régulation de l'homéostasie du NO	p.146
Figure II.7 : Production d'H ₂ O ₂ dans les cellules végétales et réaction dans les différents compartiments cellulaires	p.148
Figure II.8 : Formation des espèces réactives de l'oxygène	p.150
Figure II.9 : Exemple de régulation croisée entre NO et ROS dans les cellules végétales	p.152
Figure II.10 : Rôle du NO dans les réponses de défense sur le système NPR1/TGA1	p.156
Figure II.11 : Modèle schématique montrant les activités distinctes et chevauchantes du NO et de GSNO	p.158
Figure II.12 : Racines surexprimant <i>Hmp</i> , une hémoglobine bactérienne	p.176

Chapitre III

Figure III.1 : Plantes sauvage A17 et mutante B9 de <i>M. truncatula</i> cultivées pendant 5 semaines	p.180
Figure III.2 : Architecture racinaire	p.180
Figure III.3 : Symptômes d'infection des génotypes A17 et B9	p.182

Conclusions & Perspectives

- Figure **CP.1**: Mesure des teneurs en H₂O₂ 1h après inoculation des racines des géotypes A17 et F83005.5 de *M. truncatula* par les zoospores d'*A. euteiches* p.208
- Figure **CP.2**: Cinétique d'activation des MAPKs dans les racines des géotypes A17 et F83005.5 en réponse à la carence en nitrate et à *A. euteiches* p.210
- Figure **CP.3**: Tyrosine nitration de la glutamine synthétase p.214

Abréviations

ABA	acide abscissique	LOX	lipoxygénase
ACP	analyse en composante principale	LRR	leucine-rich repeats
ADN	acide désoxyribonucléique	LysM	motif de lysine
APX	ascorbate peroxydase	MAPK	mitogen-activated protein kinase
ARN	acide ribonucléique	MPT	modification post-traductionnelle
ATP	adénosine triphosphate	NAD⁺/NADH	forme oxydée/forme réduite de nicotinamide adénine dinucléotide
Avr	produit des gènes d'avirulence	NADP⁺/NADPH	forme oxydée/forme réduite de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
BABA	acide β -aminobutyrique	Ni:NOR	nitrite:NO réductase
BH4	tétrahydrobioptérine	nNOS	NOS neuronale
BSA	bovine serum albumin	NO	monoxyde d'azote
CaM	calmoduline	NO⁺	cation nitrosonium
cGMP	guanosine monophosphate cyclique	NO⁻	anion nitroxyde
CMA	corn meal agar	NO₂⁺	nitronium
COMT	caffeic acid 3-O-methyltransferase	NO₂⁻	nitrite
CO₃⁻	radical carbonate	NO₃⁻	nitrate
cPTIO	2-(4-carboxylphényl)-4,4,5,5-tetraméthylimidazoline-1-oxyl-3-oxyde	NOS	NO synthase
Cys	résidu cystéine	NPR1	non-expressor of pathogenesis-related gene 1
DAF	acide α - γ -di-amino-butyrrique	NR	nitrate réductase
DAMP	damage-associated molecular patterns	NUE	nitrogen use efficiency
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	NØ-IS	NØ-induced susceptibility
eNOS	nitric oxide synthase endothéliale	NØ-IR	NØ-induced resistance
ET	éthylène	O₂⁻	anion superoxide
ETI	effector triggered immunity	OG	polymère d'acide galacturonique
F-box	domaine protéique conservé de 40 à 50 acides aminés	ONOO⁻	peroxynitrite
FAD	flavine adénine dinucléotide	PAL	phenylalanine ammonia-lyase
FMN	flavine mononucléotide	PAMP	pathogen-associated molecular pattern
GC	guanylate cyclase	PR	pathogenesis related
Gln	glutamine	PRR	pattern recognition receptors
GPX	GSH peroxydase	PTI	PAMP triggered immunity
GSH	glutathion	QTL	quantitative trait loci
GSNO	S-nitrosoglutathion	R	gène de résistance
GSNOR	GSNO réductase	RBOH	respiratory burst oxidase homolog D
GSSG	glutathion disulfide	RNS	espèces réactives de l'azote
H₂O₂	peroxyde d'hydrogène	ROS	espèces réactives de l'oxygène
HO[·]	radical hydroxyle	SA	acide salicylique
HR	réaction hypersensible	SAR	résistance systémique acquise
iNOS	NOS inductible	SNO	S-nitrosothiol
ISR	résistance systémique induite	SOD	superoxide dismutase
JA	acide jasmonique		

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les plantes constituent la majorité des ressources énergétiques dont dépendent directement ou indirectement les hommes et les animaux. Ce sont les seuls organismes supérieurs à pouvoir convertir et stocker l'énergie lumineuse sous forme de glucides, lipides et protéines. Avec une demande de plus en plus importante, une agriculture intensive s'est mise en place, correspondant à un système de production agricole dont l'objectif est d'optimiser au maximum la production. Ce mode de production assure un rendement des cultures important, permettant de nourrir une population mondiale toujours plus nombreuse. Les intrants utilisés afin d'améliorer le rendement de la culture ont plusieurs fonctions. Ils peuvent permettre d'améliorer la qualité du sol (qualité nutritionnelle, amélioration des propriétés physico-chimiques) ou ont pour fonction d'éliminer les ravageurs ou les plantes invasives (adventices), grâce à des produits phytosanitaires (fongicides, herbicides, insecticides...).

Des intrants, pour améliorer les rendements

Pour pallier les problèmes de carence azotée dans les cultures et principalement, pour augmenter les rendements, les agriculteurs utilisent des intrants agricoles, et particulièrement des engrais azotés. L'utilisation intensive de ces intrants est apparue avec la révolution verte à partir des années 1960. Dans la dernière moitié du 20^{ème} siècle, une augmentation importante des rendements a été rendue possible par l'utilisation de fertilisants azotés, produit industriellement depuis les années 40 (Evans, 1998). Mais l'utilisation de ces intrants est très contestée. D'une part la production de ces engrais a un coût énergétique. En effet, l'obtention d'engrais azotés par le procédé d'Haber-Bosch se fait à une température de 1000 °C et sous une pression de 1000 atmosphères. La chaleur et la pression séparent les atomes d'azote (issus du N₂) et attachent un atome d'hydrogène pour former de l'ammoniac. Pour accomplir cette transformation, des carburants fossiles et du gaz naturel comme source d'hydrogène sont nécessaires et en font donc une réaction très coûteuse en énergie. D'autre part, l'utilisation de ces engrais n'est pas sans impact sur l'environnement et la santé humaine. En effet, les engrais azotés utilisés par les cultures se trouvent principalement sous forme de nitrate, qui est très mobile dans le sol. Les cultures sont capables d'utiliser seulement 30 à 40 % de l'azote appliqué (Raun and Johnson, 1999). Ainsi plus de 60 % de l'azote du sol est perdu par lessivage, ruissellement de surface, dénitrification, volatilisation et consommation microbienne. Les nutriments azotés qui sont perdus peuvent s'accumuler dans un milieu particulier (eutrophisation) favorisant ainsi la croissance et la prolifération d'espèces capables de les

assimiler facilement telles que les cyanobactéries ou les algues. Ceci provoque le développement important de ces espèces, entraînant une hypoxie du milieu aquatique et la mort des autres organismes (Camargo & Alonso, 2006). L'eutrophisation peut également avoir des effets indirects sur la santé humaine. En effet, ce processus favorise la production de toxines, de la famille des microcystines par certaines souches de cyanobactéries, pouvant avoir des effets cancérigènes chez les animaux et chez l'homme (Zhou *et al*, 2002; Fan *et al*, 2014). Dans l'organisme humain, le nitrate peut être transformé en monoxyde d'azote (NO) via la réduction en nitrite par les bactéries commensales. Le NO diffuse dans le sang où il se fixe à l'hémoglobine, provoquant la méthémoglobinémie, un empoisonnement du sang suivi d'une dégénération du foie (Sharma *et al*, 2013). Ainsi, l'utilisation de ces engrais met en péril la biodiversité et la santé humaine, en étant responsable de la pollution des sols, des nappes phréatiques et des cours d'eau.

Une stratégie pour réduire l'utilisation d'engrais est de promouvoir la culture d'espèces végétales ayant une bonne efficacité d'utilisation de l'azote (NUE, *nitrogen use efficiency*) et qui de ce fait ont moins besoin d'engrais pour croître et se développer. La NUE a été définie de nombreuses manières (Good *et al*, 2004), mais la plus simple est le rendement (graine, fruit, fourrage) par unité d'azote disponible dans le sol. La NUE peut être décomposée en deux parties. La première est l'efficacité d'absorption de l'azote, qui correspond à la capacité de la plante à extraire l'azote du sol. La seconde est l'efficacité d'assimilation et de remobilisation de l'azote. De nombreuses recherches visent ainsi à identifier les gènes majeurs impliqués dans la NUE soit par des approches de manipulation d'expression de gènes-clé de transport/assimilation et remobilisation de l'azote soit par des approches génétiques de QTL (Chardon *et al*, 2012). Les légumineuses par leur capacité à fixer l'azote par l'intermédiaire de la symbiose rhizobienne constituent un énorme potentiel pour le développement d'une agriculture à bas intrants azotés mais encore largement inexploité jusqu'à présent (Foyer *et al*, 2016). La gestion de la NUE présente donc un objectif écologique et économique majeur pour les cultures.

Protection des cultures par les produits phytosanitaires

Par ailleurs, les produits phytosanitaires ont été développés afin de lutter contre les maladies des plantes. En effet, l'arrivée d'une agriculture intensive a créé des conditions favorables aux maladies des plantes cultivées en concentrant des populations de végétaux sur

certaines surfaces et en effectuant des cultures successives de la même plante sur une même sole. Les chiffres permettant d'estimer les dégâts dus aux microorganismes pathogènes font souvent défaut. Ces évaluations doivent prendre en compte les pertes directes au champ ainsi que les pertes indirectes de rendement qui se manifestent tout au long des filières de commercialisation et des chaînes de transformation des productions végétales. Il est estimé que les pertes de rendement pré-récolte avoisinent environ 30 % dont environ 10 % sont dus aux agents pathogènes (Oerke, 2006).

Des stratégies d'amélioration de la résistance ont été développées pour limiter les dégâts provoqués par les agents pathogènes: la lutte culturale qui comprend les pratiques de gestion optimales aidant à prévenir les infestations (ex: la rotation); la lutte physique qui regroupe les techniques dont le mode d'action primaire ne fait intervenir aucun processus biologique, biochimique ou toxicologique (ex: enlever manuellement les plants infestés); la lutte génétique qui permet de sélectionner les variétés naturellement résistantes. Cependant, dans la plupart des cas, le recours aux produits phytosanitaires se révèle comme étant la solution la plus efficace. On parle alors de lutte chimique. Mais cette stratégie de lutte est de plus en plus contestée de par ses impacts négatifs sur l'environnement et la santé humaine (Bonnefoy N., Rapport d'information n°42, Sénat session ordinaire de 2012-2013). En effet, l'impact direct réside notamment dans la destruction des organismes vivants ciblés ou non par ces produits. Par exemple, un insecticide, utilisé pour une espèce d'insectes en particulier, entraîne également la destruction d'autres insectes. L'utilisation des produits phytosanitaires contribue à une destruction de la faune et de la flore locales. Il a pu être observé par exemple une diminution de la population d'abeilles suite à la raréfaction de la végétation. Des effets sur la santé humaine peuvent également être observés. En effet, l'intoxication par les produits phytosanitaires peut se faire lors de l'application même de ces produits, par dégradation de la qualité des eaux de consommation et/ou par dégradation de la qualité sanitaire de la matière première agricole (des résidus de ces produits peuvent être retrouvés dans les fruits et les légumes).

Un ensemble de méthodes de protection des végétaux par l'utilisation de mécanismes naturels est en plein développement. Il s'agit du biocontrôle qui repose sur la gestion des équilibres des populations de phytopathogènes plutôt que sur leur éradication. Grâce à l'utilisation de microorganismes antagonistes, la lutte biologique permet de combattre les agents pathogènes mais son efficacité est plutôt prouvée contre les ravageurs et reste inférieure à celle des pesticides dans le cas des microorganismes (Kouassi, 2001). Les stimulateurs des défenses des plantes sont des produits utilisables dans le cas du biocontrôle. Ces stimulateurs

de défenses, appelés éliciteurs et potentialisateurs, activent respectivement de manière directe et indirecte les mécanismes de défense de la plante. Le BION[®] (benzothiadiazole), analogue de l'acide salicylique, est l'éliciteur chimique majoritairement commercialisé (Lawton *et al*, 1996). Plusieurs études ont montré que l'acide β -aminobutyrique (BABA), un acide aminé non protéique et non synthétisé par les plantes, induisait une protection chez différentes espèces végétales contre plusieurs types de stress, aussi bien biotiques (Cohen, 2002) qu'abiotiques (Vijayakumari *et al*, 2016). Mais à fortes doses, le BABA, comme d'autres éliciteurs de réactions de défense, peut inhiber la croissance de la plante (Wu *et al*, 2010). Il semble donc important de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'induction de résistance afin d'optimiser l'utilisation des éliciteurs.

Les conséquences défavorables de l'agriculture intensive ont entraîné l'essor d'une agriculture durable qui vise à assurer une production agricole économiquement viable, socialement équitable et qui ne nuit ni à l'environnement ni à la santé. Parmi les applications mises en place pour une agriculture durable, la directive nitrates au niveau européen, créée dans les années 90, a pour objectif de réduire la pollution des eaux par les nitrates d'origine agricole. D'autre part, limiter les pesticides dans les cultures fait partie de l'enjeu de l'agriculture raisonnée qui autorise l'utilisation de produits phytosanitaires mais de façon raisonnable, uniquement s'ils s'avèrent vraiment indispensables, et privilégie les traitements biologiques. Cet objectif rentre dans le plan Ecophyto 2025 qui vise à réduire progressivement l'utilisation des produits phytosanitaires au niveau national tout en maintenant une agriculture économiquement performante.

Objectifs du travail

Dans le contexte d'une agriculture à bas intrants, il était intéressant d'étudier si la limitation en azote avait un impact sur la résistance des plantes aux agents pathogènes. J'ai ainsi étudié les effets de la nutrition azotée sur les réponses de défense de *M. truncatula* à *A. euteiches*. Nous avons également pris en compte la variabilité génotypique de la plante. Les expériences ont été réalisées sur un pathosystème simplifié *in vitro*.

Cadre du travail

Ce travail a été réalisé dans l'unité mixte de recherche Agroécologie et plus spécifiquement au sein du pôle Interaction Plantes-Microorganismes (IPM) dont les recherches s'inscrivent dans une stratégie globale de réduction des intrants par l'étude du fonctionnement et de la gestion des interactions plantes microorganismes. L'équipe « Monoxyde d'azote et réponses de défense de la plante » du pôle IPM, dans laquelle j'ai réalisé mon travail de thèse, a pour objectif d'appréhender les voies de signalisation cellulaire mobilisées dans les cellules végétales, au cours d'une interaction avec un microorganisme ou une molécule (effecteur ou éliciteur), conduisant à l'expression des réponses de défense de la plante. Dans ce contexte, l'équipe a démontré que le monoxyde d'azote (NO) était l'un des acteurs des processus de signalisation cellulaire rapidement mobilisé dans les cellules végétales lors des réponses de défense (Besson-Bard *et al*, 2008) et dont l'action est associée à la régulation de gènes et la modification de l'activité de protéines cibles (Jeandroz *et al*, 2013; Trapet *et al*, 2015; Rosnoblet *et al*, 2016).

Plan du mémoire

Ce mémoire de thèse est divisé en cinq parties. La première partie dresse un inventaire des matériels et méthodes utilisés pour la réalisation des différentes expériences. Trois chapitres font suite aux procédés expérimentaux et la dernière partie correspond aux conclusions et perspectives de ces travaux.

Le chapitre I concerne l'étude de l'impact du génotype de la plante sur la résistance à *A. euteiches* au cours d'une carence nutritionnelle. Ce chapitre commence par une introduction bibliographique et se poursuit par une partie résultats. Les premiers résultats présentés sont issus des expériences sur le génotype modèle (A17) de *M. truncatula* cultivé *in vitro* dans différentes conditions nutritives et montrent que la carence azotée a un effet sur la résistance de la plante à l'agent pathogène *A. euteiches*. Pour la suite des expériences, dix génotypes de *M. truncatula* ont été mis en culture sur deux milieux nutritifs différents (complet et carencé en azote). Ceci nous a permis de montrer que la résistance de *M. truncatula* à *A. euteiches* est modulée par la nutrition azotée et que cette modulation est dépendante du génotype de la plante. Ces résultats sont présentés sous la forme d'un manuscrit soumis pour publication « Genotypic variability of nitrogen modulation of *Medicago truncatula* resistance to *Aphanomyces euteiches* ». La partie résultats se termine par des expériences complémentaires.

Le second chapitre concerne l'étude du rôle du NO dans la modulation de la résistance par la carence azotée. Ce chapitre se décompose comme le précédent, avec en premier lieu une introduction bibliographique suivie de la partie résultats qui commence directement par l'article scientifique « Cross-regulation between N metabolism and nitric oxide (NO) signaling during plant immunity » publié en Avril 2016 dans *Frontiers in Plant Science*. Nous avons montré, grâce à l'utilisation de racines transformées, que l'homéostasie du NO est importante pour la résistance de *M. truncatula* à *A. euteiches* et que la disponibilité en nitrate dans le milieu avait une influence sur cette homéostasie. Une partie « résultats complémentaires » fait suite à cet article.

Le chapitre III correspond à ma contribution sur les travaux initiés par Hoai-Nam Truong, sur la caractérisation du mutant B9 de *M. truncatula*. Ce chapitre se divise en deux parties. La première concerne les travaux que j'ai réalisés dans le cadre de cet article et la seconde présente l'article scientifique « The *Medicago truncatula* hypermycorrhizal B9 mutant displays an altered response to phosphate and is more susceptible to *Aphanomyces euteiches* » publié dans *Plant Cell and Environment*. Ce travail, qui entrait dans la thématique des liens entre nutrition et défense, m'a permis de me familiariser avec le pathosystème nouvellement mis au point dans l'équipe et de contribuer à la publication d'un article (Truong *et al*, 2015).

La dernière partie de ce manuscrit correspond aux conclusions générales et aux perspectives de ces travaux.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

		Milieu complet	NØ	Milieu Gln	PØ	SØ
		Concentrations finales (mM)				
Macro- éléments	MgSO ₄ (1 M)	3	3	3	3	-
	KNO ₃ (1 M)	0,8	-	-	0,8	0,8
	KCl (1 M)	0,84	1,66	1,66	1,66	-
	KH ₂ PO ₄ (1 M)	1,3	1,3	1,3	-	1,3
	Ca(NO ₃) ₂ (1 M)	1,25	-	-	1,25	1,25
	CaCl ₂ (1 M)	-	1,25	1,25	-	-
	MgCl ₂ (1 M)	-	-	-	-	3
	Gln (0,2 M)	-	-	3	-	-
Vitamines 100 X	Glycine (4 mM)	0,04				
	Thiamine HCl (30 µM)	0,0003				
	Pyridoxine HCl (49 µM)	0,00049				
	Acide nicotinique (400 µM)	0,004				
	Myo-inositol (28 mM)	0,278				
Micro- éléments 100 X	Na Fe EDTA (2,3 mM)	0,023				
	KI (0,45 mM)	0,0045				
	MnCl ₂ 4H ₂ O (3 mM)	0,03				
	ZnSO ₄ 7H ₂ O (0,9 mM)	0,0092				
	H ₃ BO ₃ (2,4 mM)	0,024				
	CuSO ₄ 5H ₂ O (0,052 mM)	0,00052				
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O (0,9 µM)	0,00001				

Tableau MM.1 : Composition des différents milieux nutritifs

Cinq milieux nutritifs ont été utilisés pour les expériences: un milieu complet, trois milieux carencés en nitrate (NØ), en phosphate (PØ) ou en sulfate (SØ) et un milieu où la source d'azote était de la glutamine (Gln).

Le pH des milieux est ajusté à 5,5. L'agar utilisé est du Phytigel (Sigma) à 5 g.L⁻¹.

1. Matériel biologique

1.1 Géotypes, germination des graines de *M. truncatula* et conditions de culture

Dix géotypes de *M. truncatula*, issus de la core collection CC8 (INRA Montpellier, <http://www1.montpellier.inra.fr/BRC-MTR/>) (Jemalong-A17, F83005.5, DZA045.6, SA022322, SA028064, SALSES71B, ESP105.L, DZA315.16 et DZA012.J), et R108 ont été utilisés pour ces travaux.

Concernant la germination, les graines de *M. truncatula* sont placées dans de l'acide sulfurique concentré pendant 6 minutes. Elles sont ensuite rincées 3 fois à l'eau distillée puis stérilisées avec de l'eau de Javel suivi de 4 nouveaux lavages dans l'eau stérile. Les graines sont transférées sur milieu gélosé (0,7 % bacto-agar) et conservées une nuit à l'obscurité en chambre froide. Le lendemain, les graines sont transférées au phytotron (16h de jour - intensité lumineuse $380 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ - à 23 °C et 8h de nuit à 21 °C). Les plantes sont utilisées pour les expériences après l'émergence de la radicule (1 jour après passage au phytotron).

Une fois germées, les graines sont transférées sur un nouveau milieu nutritif dépendant de l'expérience réalisée. La composition de ces différents milieux est détaillée dans le tableau **MM.1**. Le temps de culture est également dépendant de l'expérience réalisée et sera précisé pour chaque analyse.

1.2 Conditions de culture de l'oomycète *A. euteiches*

La souche *A. euteiches* Drechs. ATCC 201684 a été utilisée pour l'inoculation des racines de *M. truncatula*. La souche RB84 a également été utilisée pour quelques expériences. Ces deux souches ont été isolées sur pois. La culture de cet oomycète est maintenue par des repiquages successifs (toutes les semaines) sur milieu CMA (Corn Meal Agar, Sigma, 1% CMA; 1% agar). Pour la production de zoospores, des explants pris directement sur ce milieu sont repiqués dans le milieu peptone glucose (0,5 % Glucose; 0,25 % extrait de levure; 1,5% agar). Après un jour de croissance, le mycélium obtenu est carencé par 3 lavages successifs (toutes les 2 h) avec de l'eau de Volvic stérile. Un 4^{ème} lavage est réalisé avec 30 mL d'eau de Volvic. Le mycélium est alors conservé toute la nuit à l'obscurité (23°C). Les zoospores sont

		Concentrations finales
Macro-éléments	NH ₄ NO ₃ (1 M)	1 mM
	CaCl ₂ (1 M)	0,9 mM
	MgSO ₄ (1 M)	0,5 mM
	KH ₂ PO ₄ (1 M)	0,7 mM
	Na ₂ HPO ₄ (1 M)	0,4 mM
	Citrate de fer (III) ammoniacal (20 mM)	20 µM
Micro-éléments	CuSO ₄ (1 mg.ml ⁻¹)	100 µg.L ⁻¹
	ZnCl ₂ (1 mg.ml ⁻¹)	
	H ₃ BO ₃ (1 mg.ml ⁻¹)	
	Na ₂ MoO ₄ (1 mg.ml ⁻¹)	
	MnCl ₂ (1 mg.ml ⁻¹)	

Tableau MM.2 : Composition du milieu Fahraeus

Le pH du milieu est ajusté à 7,5 et l'agar (Kalys) est à 13 g.L⁻¹.

récoltées le lendemain et leur concentration est déterminée à l'aide d'une cellule de Malassez, et ajustée à environ 10^5 zoospores.mL⁻¹ (avec de l'eau de Volvic).

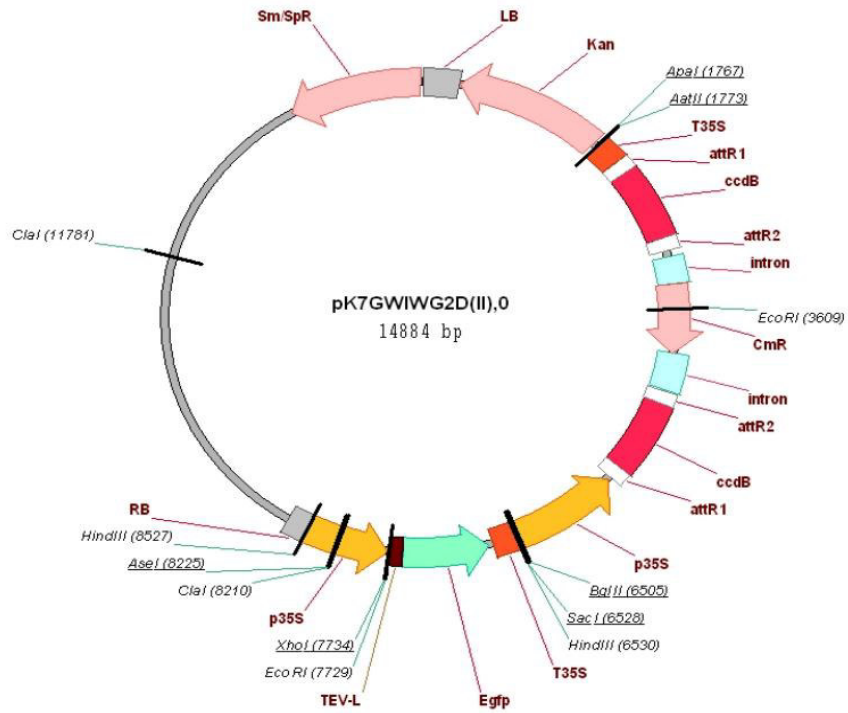
1.3 Inoculation de *M. truncatula* par *A. euteiches*

Pour les expériences où les zoospores d'*A. euteiches* sont utilisés pour l'infection (présence de l'agent pathogène pendant 3 à 21 jours), les graines germées (1 jour) de *M. truncatula* sont repiquées sur un milieu solide et infectées avec une moyenne de 10^5 zoospores.mL⁻¹ (500 zoospores/plantes). Dans le cas des expériences d'élicitation avec le BABA, les plantes sont repiquées au bout d'un jour sur milieu solide contenant 200 µM de BABA et sont infectées 1 jour après. Les plantes sont cultivées au phytotron pendant 3 jours à 3 semaines dans les mêmes conditions que ci-dessus. Pour ces expériences, 5 plantes sont déposées par boîte et ceci est répété 4 fois pour une même condition, soit une moyenne de 20 plantes pour une condition.

Pour les expériences où les zoospores d'*A. euteiches* sont utilisées pour infecter les racines transformées de *M. truncatula*, une suspension de 10 mL de zoospores d'*A. euteiches*, contenant 80 000 zoospores.mL⁻¹ dans de l'eau de Volvic, est ajoutée aux racines transformées repiquées 1 jour au préalable sur milieu Fahraeus (Tableau **MM.2**). Après 4 h d'incubation à l'obscurité à 23°C, la solution de zoospores est retirée et les racines sont incubées 1 semaine à l'obscurité à 23°C.

2. Transformation des racines de *M. truncatula* par *Agrobacterium rhizogenes*

Le vecteur pENTR4 portant le fragment *MtNIA1* ou *MtNIA2* (Horchani *et al.*, 2011) a été recombiné avec le vecteur pK7GWIWG2D (Karimi *et al.*, 2002) en utilisant l'enzyme LR clonase II (Invitrogen, France) afin de créer des vecteurs ARN interférence. Le gène *MtGSNOR* (Medtr7g099040) a été amplifié en utilisant l'ADNc de *M. truncatula* comme matrice et grâce aux amorces spécifiques 5'-AAAAGCAGGCTTCACCATGGCATCGTCGACTGAAGGT-3' (*GSNOR-forward*) et 5'-AGAAAGCTGGGTGTCAATGCAATGCAAGCACAC-3' (*GSNOR-reverse*) contenant les sites de recombinaison attB correspondants. Le gène *Hmp* a



Notes: Hairpin RNAi expression. Driven by 35S promoter. Contains GFP reporter.

[http://www.psb.ugent.be/gateway/index.php?NAME=pK7GWIWG2D\(II\)&_app=vector&_act=construct_show&](http://www.psb.ugent.be/gateway/index.php?NAME=pK7GWIWG2D(II)&_app=vector&_act=construct_show&)

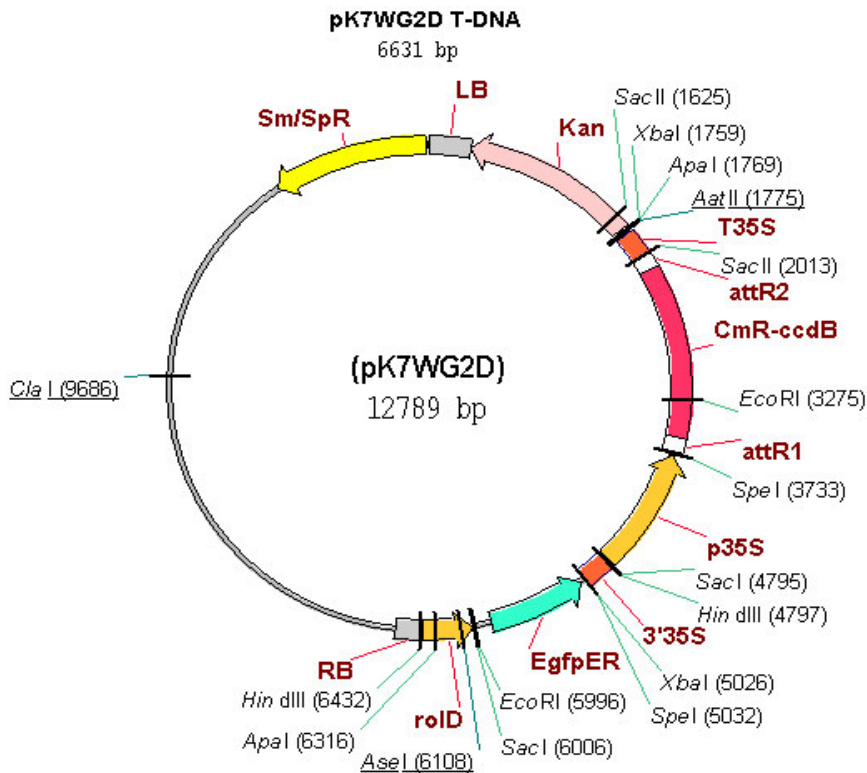


Figure MM.1: Vecteurs utilisés pour la transformation de *M. truncatula*

été amplifié à partir d'ADN génomique de *Sinorhizobium meliloti* avec les amorces spécifiques a76F et a76R (del Giudice *et al*, 2011; produit PCR fournit par A. Boscari). Les produits PCR ont été recombinés dans le vecteur d'entrée pDONR (Invitrogen) et vérifiés par séquençage. Le vecteur pDONR portant le gène d'intérêt, *MtGSNOR* ou *Hmp*, a été recombiné avec le plasmide pK7WG2d (Karimi *et al*, 2002) afin de créer un vecteur surexprimant le gène. Ces vecteurs ont ensuite été utilisés pour transformer les racines de *M. truncatula* (Figure **MM.1**).

La transformation des racines de *M. truncatula* par *Agrobacterium rhizogenes* a été réalisée selon le protocole Boisson-Dernier *et al*, 2001. La souche Arqua I d'*A. rhizogenes* (Quandt *et al*, 1993) contenant les vecteurs binaires (pK7GWIGW2D-MtNR1-2/GFP (RNAi::MtNIA1/2) et pK7WG2d-MtGSNOR/GFP (35S::GSNOR)) a été utilisée pour réaliser la transformation des racines de *M. truncatula*. Les plantes contrôles ont été transformées par *A. rhizogenes* contenant le vecteur vide pK7GWIGW2D ou pK7WG2d.

Les plantes sont mises à germer pendant 4 jours. Les racines sont coupées pour garder une longueur d'environ 1 cm et la zone sectionnée est inoculée par les bactéries. Les plantes sont alors transférées sur milieu Fahraeus (Tableau **MM.2**) + 1 mM d'ammonitrate (NH_4NO_3) (Boisson-Dernier *et al*, 2001 et communication personnelle N. Pauly) contenant $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de kanamycine. Les plantes sont alors conservées pendant une semaine en chambre climatique à 20°C afin d'optimiser l'infection, puis la température est augmentée (25°C), afin de favoriser l'élongation racinaire. Une semaine après, les racines transformées sont sélectionnées à la loupe, grâce à la fluorescence de la GFP. Seules les racines émettant de la fluorescence sont conservées et repiquées sur milieu Shb10 (Tableau **MM.3**) contenant $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de kanamycine et $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'augmentin afin de stopper la croissance des bactéries. Les cultures de racines sont conservées à l'abri de la lumière.

		Concentrations finales
Macro-éléments 20 X	KH ₂ PO ₄ (0,05 M)	2,5 mM
	NH ₄ NO ₃ (0,05 M)	2,5 mM
	KNO ₃ (0,45 M)	22,5 mM
	MgSO ₄ (0,03 M)	1,5 mM
	CaCl ₂ (0,03 M)	1,5 mM
Micro-éléments 100 X	MnSO ₄ (6,62 mM)	66,2 µM
	CuSO ₄ (0,08 mM)	0,8 µM
	ZnSO ₄ (0,34 mM)	3,4 µM
	KI (0,6 mM)	6 µM
	H ₃ BO ₃ (8,09 mM)	80,9 µM
	Na ₂ MoO ₄ (0,04 mM)	0,4 µM
	CoCl ₂ (0,08 mM)	0,8 µM
Vitamines 100 X	Thiamine HCl (1,48 mM)	14,8 µM
	Pyridoxine HCl (0,24 mM)	2,4 µM
	Acide nicotinique (4,06 mM)	40,6 µM
	Myo-inositol (28 mM)	6 µM
FeEDTA 100 X	FeSO ₄ (10 mM)	55 µM
	Na ₂ EDTA (8 mM)	44 µM

Tableau MM.3 : Composition du milieu Shb10

Le pH du milieu est ajusté à 6 et l'agar (Kalys) est à 14 g.L⁻¹.

3. Annotation des symptômes et architecture racinaire

Une annotation des symptômes est réalisée entre 10 jours et 3 semaines après infection par *A. euteiches*. Les symptômes mesurés sont les pourcentages de cotylédons jaunes, de brunissement de la tige et de plantes mortes (Bonhomme *et al*, 2014), généralement à 3 semaines et le pourcentage de brunissement de la racine principale à 10 jours après inoculation. De plus, le stade de développement de la plante est également noté au bout de 3 semaines (nombre de cotylédons, de feuilles monofoliées et trifoliées).

Une analyse de l'architecture racinaire est réalisée à 10 jours grâce au logiciel Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Les paramètres suivants sont mesurés: taille de la racine primaire, nombre/densité et taille des racines secondaires.

A partir de 21 jours, les plantes sont récoltées et une mesure la biomasse racinaire et aérienne est réalisée.

4. Détection d'*A. euteiches* par test ELISA

Les racines infectées sont prélevées au bout de 18-21 jours et broyées dans du tampon Mc Ilvaine (500 µL pour 100 mg de matière fraîche; 22,75 mM d'acide citrique; 154,5 mM de Na₂HPO₄; pH 6,8). Après 15 min de centrifugation à 20 000 g à 4°C, l'extrait protéique est dilué au 5^{ème} dans du tampon carbonate de sodium (50 mM; pH 9,2). Le développement d'*A. euteiches* dans les racines est estimé par test ELISA grâce à un sérum polyclonal de lapin dirigé contre *A. euteiches* et à un anticorps secondaire de souris, anti-lapin, conjugué à la phosphatase alcaline comme décrit par (Slezack *et al*, 1999). Ce test est réalisé sur les extraits protéiques obtenus à partir d'un pool de racines (2 à 3 racines pour une condition et ceci répété au moins 4 à 8 fois). L'activité de la phosphatase alcaline est mesurée par une augmentation de l'absorbance à 405 nm pendant 2-3 h (Phosphatase substrate, P4744-1G Sigma) et rapportée à la quantité de matière fraîche.

5. Quantification des différents composés

5.1 Mesure des concentrations en nitrate et azote total

Le protocole de mesure des concentrations en nitrate est basé sur la réduction du nitrate en nitrite par le vanadium (Miranda *et al*, 2001). La détection colorimétrique des nitrites se fait à 540 nm en présence de sulfanilamide et de N-1-naphtylethylenediamine (NNED). Environ 100 mg de racines, cultivées *in vitro*, sur milieux complet ou NØ, entre 3 et 21 jours, sont collectées et broyées dans l'azote liquide. Du tampon acétate (45 mM; pH 5) est ajouté aux échantillons à raison de 500 µL pour 20 mg de matière fraîche puis les échantillons sont vortexés. Après 15 min dans la glace, accompagnée de vortex occasionnels, les échantillons sont centrifugés 15 min à 13 000 g à 4°C. Le surnageant récupéré est utilisé pour la détermination des concentrations en nitrate. Il est dilué au 5^{ème} et le volume est ajusté à 100 µL avec de l'eau. La réaction est déclenchée par ajout de 100 µL de réactif (200 mL HCL 0,5 M; 0,5 g de chlorure de Vanadium; 0,2 g sulfanilamide et 0,01 g de NNED). Les échantillons sont alors placés à 60 °C pendant 2 h et l'absorbance est lue à 540 nm et comparée à celle d'une gamme étalon de nitrate.

Le contenu en azote total a été déterminé par la méthode Dumas (Allen *et al*, 1974), basée sur la combustion totale des échantillons grâce à un courant d'hélium enrichi par une quantité déterminée d'oxygène pur. Les gaz produits sont alors réduits par du cuivre puis desséchés; le CO₂ est piégé. L'azote est ensuite quantifié à partir de l'analyseur ThermoQuest C/N NC 2500 (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France), en utilisant approximativement 5 mg de matière sèche des parties aériennes.

5.2 Mesure des concentrations en phosphate

Le réactif BIOMOL GREENTM (Enzo Life Sciences, BML-AK111-0250) est utilisé pour mesurer les concentrations en phosphate. En présence de phosphate inorganique, il permet la formation d'un complexe absorbant à 620 nm. Environ 100 mg de racines, cultivées *in vitro*, sur milieux complet ou limitant en phosphate, entre 3 et 21 jours, sont collectées et broyées dans l'azote liquide. Du tampon acétate (45 mM; pH 5) est ajouté aux échantillons à raison de

300 µL pour 20 mg de matière fraîche racinaire (ou 500 µL pour 20 mg de matière fraîche foliaire) puis les échantillons sont vortexés. Après une incubation de 15 min dans la glace, accompagnée de vortex occasionnels, les échantillons sont centrifugés 15 min à 13 000 g à 4°C. Le surnageant récupéré est utilisé pour la détermination des concentrations en phosphates solubles. Entre 5 et 20 µL d'extrait (éventuellement dilué au 5^{ème} dans du tampon acétate) complétés à 50 µL final avec du tampon acétate sont utilisés pour le dosage. Le réactif BIOMOL GREENTM (100 µL) est alors ajouté à cette dilution. Les échantillons sont alors laissés pendant 30 min à température ambiante. L'absorbance est lue à 650 nm et comparée à celle d'une gamme étalon de phosphate.

5.3 Mesure des concentrations en composés phénoliques solubles

La quantification des composés phénoliques solubles a été réalisée selon le protocole de Djébali *et al*, (2011). Les racines de *M. truncatula* sont broyées dans l'azote liquide. Les échantillons (100 mg) sont repris dans 500 µL de méthanol aqueux (80 %) pendant 5 min à température ambiante dans un tube Eppendorf fermé. Après centrifugation 2 min à 10 000 g, le surnageant est transvasé dans un tube propre et le culot est de nouveau repris dans 500 µL de méthanol aqueux (80 %). Après 5 min d'incubation et 5 min de centrifugation à 10 000 g, le surnageant est récupéré et ajouté dans le même tube que le 1^{er} surnageant. Le surnageant (1 mL) est séché au SpeedVac et le résidu sec est repris dans 500 µL de méthanol 50 %. Les échantillons sont directement utilisés pour déterminer les composés phénoliques solubles ou stockés à – 20°C.

Le réactif de Folin-Ciocalteu permet de doser les composés phénoliques. Cette méthode est basée sur la réduction du phospho-molybdène et du phospho-tungstate présents dans le réactif de Folin-Ciocalteu. Pour le dosage, on ajoute 500 µL de réactif de Folin dilué 10 fois à 100 µL d'échantillon. Après 3 min, on ajoute 400 µL de carbonate de sodium (75 g.L⁻¹) et on laisse incuber 1 h à température ambiante. La lecture est faite à 760 nm et la teneur en composés phénoliques est déterminée selon une courbe étalon réalisée avec différentes quantités en acide férulique (de 1 à 30 µg).

5.4 Mesure des concentrations en acides aminés

La quantification des concentrations en acides aminés a été réalisée au sein de la plateforme Plateau de profilage métabolique et métabolomique (P2M2) au Centre de Recherche Angers-Nantes BIA. Les plantes ont été cultivées pendant 10 jours sur milieux complet ou NØ et infectées ou non par *A. euteiches*. L'extraction est basée sur le mélange méthanol-chloroforme-eau selon la procédure suivante: 10 mg de matière sèche ont été resuspendus dans 400 µL de méthanol contenant 100 µM de la solution acide DL-3-aminobutyrique. Les suspensions sont agitées pendant 15 min à température ambiante et 200 µL de chloroforme sont alors ajoutés suivie de 5 min d'agitation. Enfin, 400 µL d'eau sont ajoutés aux échantillons qui sont vortexés. La phase de séparation est induite par centrifugation de 5 min à 13 000 g. La phase supérieure, contenant entre autres les acides aminés, est transférée dans un tube propre et utilisée pour l'analyse. Les échantillons (50 µL) sont séchés sous vide. Les résidus secs sont alors resuspendus dans 50 µL d'eau ultrapure et 10 µL sont utilisés pour la dérivation grâce au kit AccQ-Tag Ultra derivatization (Waters, Milford, MA, USA). Les acides aminés dérivatisés sont analysés par UPLC-DAD (*Ultra Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector*) (Waters) selon (Jubault *et al*, 2008).

6. Mesure des activités enzymatiques

6.1 Nitrate réductase

La nitrate réductase (NR) réduit le nitrate en nitrite qui développe une coloration rose par réaction avec le N-naphtylethylendiamine dihydrochloride (NNED) en milieu acide. La mesure de l'activité NR a été réalisée sur les racines transformées. Celles-ci sont broyées dans l'azote liquide. L'extraction a été réalisée dans le tampon MOPS (1 mL pour 100 mg de matière fraîche ; 50 mM MOPS-KOH, pH 7,6 ; 5 mM NaF ; 1 µM Na₂MoO₄ ; 10 µM FAD ; 1 µM leupeptine ; 0,2 g/g matière fraîche polyvinylpyrrolidone ; 2 mM β-mercaptoéthanol ; 5 mM EDTA). Après 5 min de centrifugation à 20 000 g à 4°C, le surnageant est utilisé pour mesurer l'activité NR. La solution suivante est ajoutée aux échantillons (90 µL pour 10 µL d'échantillon): 50 mM MOPS-KOH, pH 7,6 ; contenant 1 mM NaF, 10 mM KNO₃, 0,17 mM NADH et 5 mM EDTA. Après 15 min d'incubation à 30 °C, la réaction est stoppée par ajout

de 100 μL de sulfanilamide (1 % w/v dans 3 N HCl) puis de 100 μL de NNED (0,02%, w/v) et l'absorbance est lue à 540 nm. L'activité NR est estimée selon une courbe étalon faite avec différentes concentrations de nitrite.

6.2 GSNO réductase

Le dosage de l'activité GSNO réductase (GSNOR) présente dans les racines de plantules ou dans les cultures de racines est basé sur la capacité de cette enzyme à réduire le GSNO en glutathion oxydé (GSSG) par oxydation du NADH. Après broyage dans l'azote liquide, les protéines sont extraites dans 50 mM de tampon Tris-HCl, pH 8 ; 0,5 mM EDTA et 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cocktail inhibiteur de protéase (sc-29131, Santa Cruz Biotechnology) (1 mL de tampon pour 100 mg de matière fraîche). L'activité GSNOR est déterminée grâce à l'oxydation du NADH en présence de GSNO, par la mesure de la diminution de l'absorbance à 340 nm à 25 °C en utilisant 25 μg de protéines dans un volume total de 200 μL de tampon d'extraction contenant 350 μM de NADH avec ou non 350 μM de GSNO. L'activité GSNOR est déterminée en soustrayant les valeurs de l'oxydation du NADH en absence de GSNO aux valeurs en présence de GSNO. L'activité GSNOR est alors estimée selon la courbe étalon obtenue en mesurant l'absorbance de différentes concentrations de NADH.

7. Quantification des formes actives de l'oxygène et de l'azote

7.1 Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

La concentration en H_2O_2 a été mesurée en utilisant la sonde fluorescente Amplex Red[®] couplée à la peroxidase (Ashtamker *et al*, 2007). Pour cela, le génotype A17 a été cultivé *in vitro* pendant 7 jours sur milieu complet ou NØ en présence ou non d'*A. euteiches* avec les racines à l'abri de la lumière. Les racines ont été broyées dans la glace, à l'obscurité, dans 1 mL de tampon KRPG (145 mM NaCl ; 5,7 mM K_2HPO_4 ; 4,86 mM KCl ; 0,54 mM CaCl_2 ; 1,22 mM MgSO_4 ; 5,5 mM glucose ; pH 7,35) avec 10 μM d'Amplex Red[®] et 0,2 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ de

peroxidase (Horse Radish Peroxidase HRP) pour 100 mg de matière fraîche. La catalase, qui catalyse la dismutation de l' H_2O_2 en H_2O et O_2^- , a été utilisée comme contrôle. Pour cela, les échantillons ont été broyés avec le même tampon mais sans Amplex Red[®] et avec $1 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de catalase à la place. L'Amplex Red[®] est alors ajoutée 10 min après. Une fois broyés, les échantillons sont centrifugés 15 min à $10\,000 \text{ g}$ à $4 \text{ }^\circ\text{C}$ et $100 \mu\text{L}$ de surnageant est utilisé pour quantifier au spectrofluorimètre (Mithras, Berthold Technology) la résorufine ($\lambda_{\text{ex}} = 560 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 584 \text{ nm}$) issue de la réaction de l'Amplex Red[®] avec le H_2O_2 . Les unités relatives de fluorescence ont été converties en μmol d' H_2O_2 par mg de matière fraîche sur la base d'une courbe étalon réalisée avec différentes concentrations d' H_2O_2 .

7.2 Monoxyde d'azote (NO) et peroxyneutre (ONOO⁻)

Les concentrations de NO et d'ONOO⁻ ont été déterminées sur les racines du génotype A17 cultivé *in vitro* pendant 7 jours sur milieu complet ou NØ en présence ou non d'*A. euteiches* et les racines à l'abri de la lumière ou sur les racines transformées. Pour cela, 100 mg de racines ont été broyées dans la glace à l'obscurité dans le tampon Tris-HCl (10 mM, pH 7,5), KCl (10 mM) avec $5 \mu\text{M}$ d'aminophenyl fluorescéine (APF) pour doser ONOO⁻ ou $10 \mu\text{M}$ de 4,5-diaminofluorescéine (DAF) pour doser le NO. L'épicatéchine, « piègeur » d'ONOO⁻, et le cPTIO, « piègeur » de NO, ont été utilisés comme contrôle. Après 10 min d'incubation à $4 \text{ }^\circ\text{C}$ avec 1 mM d'épicatéchine ou $500 \mu\text{M}$ de cPTIO, l'APF ou le DAF a été ajouté aux échantillons à une concentration finale de $5 \mu\text{M}$ et $10 \mu\text{M}$, respectivement.

Après 15 min de centrifugation à $10\,000 \text{ g}$ à $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $100 \mu\text{L}$ de surnageant est utilisé pour quantifier l'ONOO⁻ ou le NO ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$) au spectrofluorimètre (Mithras, Berthold Technology).

7.3 S-nitrosothiols (SNO)

La quantification des SNO a été réalisée, sur les racines du génotype A17 cultivé *in vitro* pendant 7 jours sur milieu complet ou NØ en présence ou non d'*A. euteiches* avec les racines à l'abri de la lumière ou sur les racines transformées, en utilisant la méthode de Saville-Griess (Gow *et al*, 2007). Il s'agit d'une méthode indirecte basée sur la détection des nitrites. La réaction de Saville permet de lyser les liaisons S-NO par ajout de chlorure de mercure en milieu

acide libérant les nitrites. Ces derniers réagiront avec le sulfanilamide produisant un ion diazonium qui formera un composé coloré après réaction avec du NNED, il s'agit de la réaction de Griess. Les racines sont broyées dans la glace à l'obscurité dans le tampon d'extraction (0,1 M Tris-HCl, pH 7.5 ; 1 mM PMSF) à raison d'1 mL pour 100 mg de matière fraîche. Après 15 min de centrifugation à 10 000 g à 4 °C, 100 µL de surnageant est incubé avec 100 µL de solution A (0,5 M HCl ; 1 % sulfanilamide) ou 100 µL de solution B (0,5 M HCl ; 1 % sulfanilamide et 0,2 % HgCl₂). Après 15 min d'incubation à température ambiante, 100 µL de réactif de Griess (0,5 M HCl ; 0,02 % N-(1-naphtyl)-éthylenediamine dihydrochloride) sont ajoutés aux échantillons. Après 15 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 540 nm. La différence d'absorbance entre la solution B et la solution A est calculée. La concentration en SNOs est alors estimée à partir de cette différence d'absorbance selon la courbe étalon obtenue en utilisant différentes concentrations de GSNO.

8. Immunodétection des protéines

L'immunodétection des protéines est réalisée à partir de racines de plantes cultivées pendant 7 jours sur milieu complet ou NØ en présence ou non d'*A. euteiches*. Les racines sont broyées dans l'azote liquide et 200 µL de tampon d'extraction de protéines sont ajoutés pour 100 mg de broyat (50 mM HEPES pH 7.4; 100 mM NaCl; 1 mM DTT; 4 mM EGTA; 2 mM MgCl₂; 1 mM cocktail inhibiteur de protéase (Sigma); 100 µM Na₃VO₄; 50 mM 2-glycérophosphate). Les extraits sont incubés 15 min dans la glace et après 20 min de centrifugation à 20 800 g à 4 °C, le surnageant est récupéré et les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford à l'aide d'une gamme étalon établie à partir de la sérum albumine bovine (BSA). Par la suite, 15 µg de protéines sont dénaturées à 95 °C pendant 5 min en présence de Laemmli 1 X. Celles-ci sont déposées sur un gel SDS-PAGE 10 % polyacrylamide en conditions dénaturantes (150 V, 1 h). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose par transfert semi-sec (15 V, 30 min) ou liquide (80 V, 1 h) (tampon de transfert : 192 mM glycine; 25 mM Tris pH8,3; 20 % MeOH). Une coloration au rouge Ponceau (0,5 % rouge Ponceau; 1 % acide acétique) est effectuée pour évaluer la quantité de protéines. La membrane est saturée à l'aide d'une solution de TBS-Tween (Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 5 mM EGTA; 0,1 % Tween 20) et 2 % lait en poudre, une nuit à 4 °C sous faible agitation.

Les protéines tyrosine-nitrées sont révélées par un anticorps primaire de souris anti-nitrotyrosine (10006966; Cayman Chemical Company) (1 h; dilué au 10 000^{ème}). La membrane

est ensuite lavée et incubée avec l'anticorps secondaire anti-souris couplé à l'HRP (7076S; BioRad) dirigé contre l'anticorps primaire (1 h; dilué au 20 000^{ème}).

La glutamine synthétase est révélée par un anticorps primaire de lapin (AS08295; Agrisera) ciblé contre les deux isoformes de la GS (1 h; dilué au 10 000^{ème}). La membrane est lavée puis incubée avec un anticorps anti-lapin couplé à l'HRP (7074S; BioRad) dirigé contre l'anticorps primaire (1 h; dilué au 20 000^{ème}).

Le western blot est révélé à l'aide du kit de chimiluminescence LumiGLO (Cell signaling).

9. Analyses de l'expression de gènes

9.1 Extraction d'ARN et synthèse d'ADNc

Les ARN sont extraits en utilisant le TRIzol[®] (Life Technologies) comme réactif, selon les recommandations du fabricant. Cette extraction est réalisée sur les plantes cultivées *in vitro* pendant 1 à 3 semaines sur les différents milieux nutritifs ou sur les racines transformées. Le TRIzol est ajouté aux échantillons congelés et broyés à raison de 500 μL pour 100 mg de matériel biologique. Du 1-bromo-3-chloropropane est ensuite ajouté aux échantillons (50 μL pour 500 μL de TRIzol). La phase aqueuse est récupérée après 15 min de centrifugation à 11 200 g à 4 °C et les ARN sont précipités avec 250 μL d'isopropanol. Après une seconde centrifugation de 10 min à 11 200 g à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot d'ARN lavé avec 500 μL d'éthanol 75 %. Les échantillons sont de nouveau centrifugés (5 min, 11 200 g, 4 °C), le surnageant est éliminé et le culot séché. Les ARN sont élués dans de l'eau exempte de nucléases. Après 10 min d'incubation à 65 °C, les échantillons sont placés 1 h à - 20°C. Une dernière centrifugation est réalisée (10 min, 11 200 g, 4 °C) et le surnageant, contenant les ARN, est transvasé dans un tube propre. L'intégrité des ARN est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %. Les ARN sont ensuite dosés par spectrophotométrie UV à l'aide d'un Nanodrop (Thermo Fischer).

Les ADNc sont synthétisés à partir de 1 μg d'ARN totaux à l'aide de la reverse transcriptase M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) (Promega). Après dénaturation des ARN par chauffage à 70°C pendant 5 min en présence de 250 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ d'oligo(d(T))₁₅ et de

RNasine[®] Plus (40 U. μ L⁻¹), la solution suivante est ajoutée : tampon de réaction 5X M-MLV ; 0,5 mM dNTP ; 25 U. μ L⁻¹ RNasin[®] (Promega) ; 200 U. μ L⁻¹ M-MLV Reverse Transcriptase dans un volume final de 20 μ L. On effectue ensuite une série d'incubations : 10 min à 25 °C ; 60 min à 42 °C et 15 min à 70 °C.

9.2 Analyse de l'accumulation des transcrits par PCR quantitative en temps réel

Les PCR quantitatives (qPCR) sont réalisées à l'aide du kit GoTaq qPCR Master Mix et de l'appareil ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Selon les expériences, les qPCR sont réalisées soit en plaque 96 soit en plaque 384 puits. Les réactions sont réalisées dans un volume final de 15 μ L pour les plaques 96 et de 5 μ L pour les plaques 384.

	Plaque 96 puits	Plaque 384 puits
SYBR Green de type BRYT Green [®] (GoTaq qPCR Master Mix, Promega)	7,5 μ L	2,5 μ L
Amorces (Forward et Reverse) 10 μ M	0,15 μ L	0,25 μ L
H ₂ O	2,35 μ L	0,25 μ L
ADNc (dilués 60 fois)	5 μ L	2 μ L

L'amplification PCR est réalisée selon le programme suivant : une première étape de dénaturation (95 °C ; 2 min), 40 cycles composés d'une étape de dénaturation (95 °C ; 15 s) et d'une étape d'hybridation/élongation (60 °C ; 60 s). Les gènes *MtEF1* et *MtUBQ* sont utilisés comme gènes de référence pour normaliser les valeurs obtenues pour les gènes candidats, mais seuls les profils d'expression relatifs à EF1 sont montrés. Les amorces spécifiques des gènes (efficacité 80-100 %) utilisées dans ces travaux sont récapitulées dans le tableau **MM.4**. Les niveaux d'expression sont calculés en réalisant le Δ Ct entre le gène candidat et le gène de référence (Δ Ct_{gène candidat – gène de référence}). Pour le chapitre I, la moyenne des Ct du gène *MtEF1* dans toutes les expériences est égale à 15 cycles. Comme le nombre total de cycles d'une analyse qPCR est de 40, un gène est considéré comme exprimé si Δ Ct_{gène candidat – gène de référence} est supérieur ou égal à 25. Ainsi, l'expression des gènes est quantifiée à partir de la formule suivante : $25 - \Delta$ Ct_{gène candidat – gène de référence}, qui est d'autant plus élevée que le gène est exprimé. Pour le chapitre II, les expressions relatives ont été exprimées par $2^{-\Delta$ Ct_{gène candidat – gène de référence}.

Gene (Mt4.0)	Gene description	Sequence (5'-3')	
		Forward	Reverse
Medtr6g021805.1	<i>MtEF1</i> , Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	AAGCTAGGAGGTATTGACAAG	ACTGTGCAGTAGTACTTGGTG
	<i>AeTUB</i> , Tubulin (Rey et al, 2013)	TGTCGACCCACTCCTTGTG	TCGTGAGGGACGAGATGACT
	<i>AeCRN13</i> , Crinkler family (Ramirez et al, 2015)	TTATTGCTGTGCCAAATCAG	GATATTGTATCTTGCGGTGAC
Medtr3g073180	<i>MtNIA1</i> , Nitrate reductase 1	TGTTCCACAGGCTTCTCCAGATACA	CATACAGCGTCGTA CT CAGCGACA
Medtr5g059820	<i>MtNIA2</i> , Nitrate reductase 2	GCAAACCGGACGGAGGATGA	CCGTGATGAATCCCACTATATTCC
Medtr4g057890	<i>MtNRT2.1</i> , Nitrate transporter 2 family	AAATACAACCTCCTACCCACTAG	CAATATTA ACTTATTA AAGCATGGG
Medtr8g069775.1	<i>MtNRT2.3</i> , Nitrate transporter 2 family	CAGCAGCACC ACTTGTTCCTATAAT	GCAACACCGGCATTTCTT
Medtr1g106420.1	<i>MtLBD38</i> , Lateral organ boundaries domain-containing protein 38	GTTGACGGCACTCCCTGAT	CAACGTGGAAGACTCCGATT
Medtr6g071070.1	<i>MtGS1a</i> , Glutamine synthetase 1a	GTGTTCTTCTTCTTCCTTCAC	GGTGTAACATCACAAATCAC
Medtr3g065250.1	<i>MtGS1b</i> , Glutamine synthetase 1b	ATAAGCCACCACGCTACTTC	AACCATAACAAGGACTCAGATC
Medtr2g021255.1	<i>MtGS2a</i> , Glutamine synthetase 2a	TCACTTGAACCCATTTCTAAG	CCAGAGTGACTGCCATTAC
Medtr3g021430.1	<i>MtCOMT1</i> , Chalcone-O-Methyltransferase	TGTTGGTTGATGTGGGTGGT	ACCTGGATAATCTGGAGCGT
Medtr3g018930.1	<i>MtCCNBS</i> , atCc-nbs-lrr resistance protein	AGGTGGCTGCTGGCACTCCT	AGGCTGATCAGGGAGGAAGGCA
Medtr4g120970	<i>MtPR10</i> , Pathogenesis-related protein 10	AGCGAAATTGGTTGAAGGCT	ATCTCCTTTGGTTTGGTATTTAACT
Medtr7g101425.1	<i>MtPAL1</i> , Phenylalanine ammonia-lyase	AACGGTGCTCCTCTTCCAAT	GGACACACATTAGCAATACCATAAA
Medtr5g098720.1	<i>MtPAL2</i> , Phenylalanine ammonia-lyase	CCCATCCCAATATGATCTGC	GCCATCTTTCCACACATGA
Medtr3g083920.1	<i>MtCHS1</i> , Chalcone synthase	GGTCACCTTCGAGAAGCAGG	AGACAAGGCCAGGAACATCC
	<i>MtCHS2</i> , Chalcone synthase (Badis et al, 2015)	TGTGCAGTCCAAACCATCTCA	TGGCTCTGACCCAATACCAG
Medtr5g024020.1	<i>MtLOX</i> , Lipoxygenase	GCCCTATACTTTGCTTCATCG	TCATCCCACAAGCATCATACA
Medtr7g099040.1	<i>MtGSNOR</i> , S-nitrosoglutathion reductase	GTGACTGGGCGTGTATGGAA	TGCAAGCACACAACGAAGAC
	<i>SmHmp</i> , haemoglobin	AGGCTTCACCATGCTCACTC	TGAGCCTGAAACATCCGCTT

Tableau MM.4 : Liste des primers utilisés en qPCR

L'efficacité de chaque primer a été testée. Les primers utilisés ont une efficacité supérieure à 80 % en qPCR.

10. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant les logiciels XLSTAT et R. Tous les paramètres mesurés ont été analysés en utilisant le test ANOVA sur le logiciel XLSTAT suivi d'un test de Fisher. Seulement les différences significatives avec $p < 0,05$ majoritairement (ou $p < 0,1$) ont été considérées.

Les analyses en composante principales (ACP) et un test de Monte Carlo ont été réalisés sur R en utilisant le logiciel ade4TkGUI, afin d'intégrer les différents paramètres développementaux et de sensibilité à *A. euteiches* mesurés.

CHAPITRE I

IMPACT DU GÉNOTYPE DE LA PLANTE SUR LA RÉSISTANCE À *APHANOMYCES EUTEICHES* AU COURS D'UNE CARENCE NUTRITIONNELLE

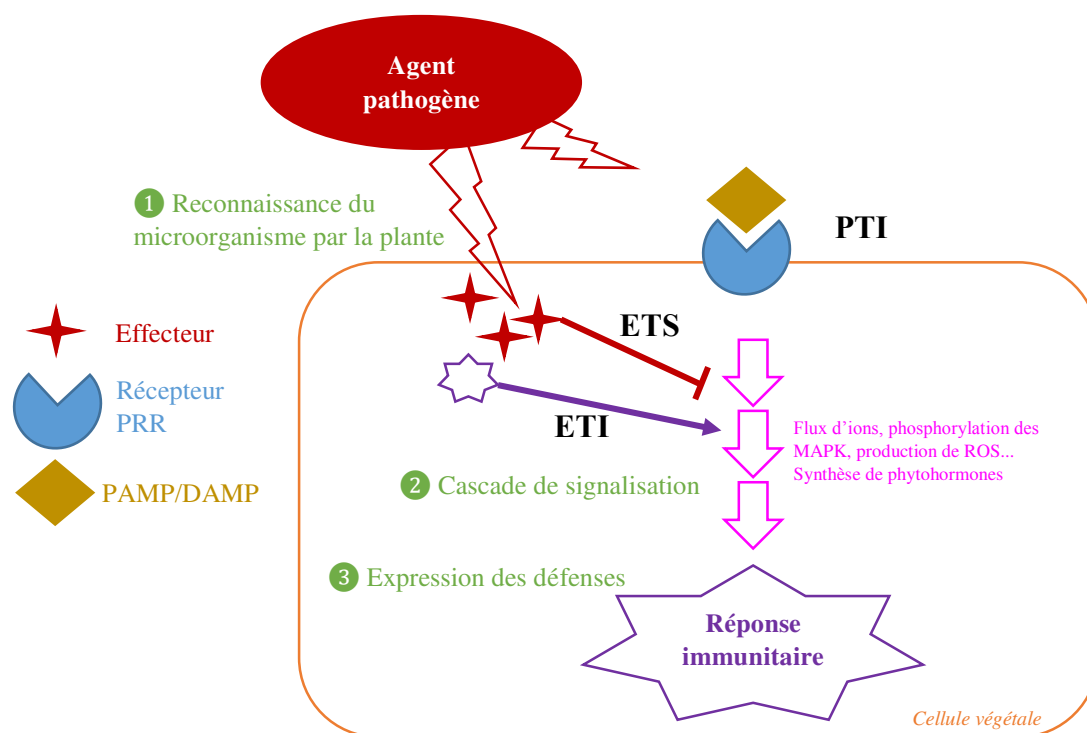


Figure I.1: Événements aboutissant à la réponse immunitaire de la plante lors de l'interaction avec des agents pathogènes

Lors d'une attaque par un agent pathogène, les PAMP (pathogen-associated molecular patterns) et/ou les DAMP (damage-associated molecular patterns) activent les récepteurs PRR (pattern recognition receptors) de la plante qui initient une voie de signalisation conduisant à un premier niveau de réponse immunitaire appelée **PTI** (PAMP-triggered immunity). Certains agents pathogènes ont acquis la capacité de produire des effecteurs, capables d'inhiber la **PTI**, conduisant à l'**ETS** (effector-triggered susceptibility). A leur tour, les plantes ont acquis la capacité de produire des récepteurs, les protéines R, capables de reconnaître ces effecteurs et d'activer une cascade de signalisation dans la plante, qui se met en place par l'intermédiaire de messagers secondaires et qui va aboutir à l'expression des défenses entraînant un deuxième niveau de réponse immunitaire de la plante, cette réponse immunitaire secondaire est appelée **ETI** (effector-triggered immunity). La plupart des réponses de défense activées lors de la **PTI** et de l'**ETI** sont communes aux deux formes d'immunité. Cependant, les défenses activées pendant l'**ETI** sont généralement considérées comme plus rapides et amplifiées par rapport à celles activées pendant la **PTI** (Jones et Dangl, 2006).

1. Introduction : données bibliographiques

1.1 Interaction plantes-microorganismes pathogènes

Dans leur environnement, les plantes sont en contact permanent avec des microorganismes pathogènes. La coévolution entre les microorganismes et les plantes a permis à ces dernières de développer des stratégies de défense. De manière schématique, trois étapes caractérisent l'interaction entre une plante et un agent pathogène: la reconnaissance du microorganisme par la plante, la cascade de signalisation permettant la transduction du stimulus et l'expression des défenses (Figure I.1).

a. Reconnaissance de l'agent pathogène

La reconnaissance de l'agent pathogène par la plante met en jeu des récepteurs. La nature des ligands et des récepteurs conditionne deux niveaux de résistance induite: une résistance peu intense à large spectre et une résistance plus forte et plus spécifique.

Le premier niveau de défense est déclenché par la reconnaissance de motifs moléculaires appelés PAMP (pathogen-associated molecular patterns) ou DAMP (damage-associated molecular patterns). Les PAMP sont des molécules d'origine microbienne. Parmi les PAMP les plus étudiés, on retrouve la flagelline, une protéine majoritaire du filament du flagelle des bactéries (Ali & Reddy, 2008), ou encore la chitine, un polymère de N-acétylglucosamine faisant partie de la paroi cellulaire des champignons (Wan *et al*, 2008). Les DAMP sont des molécules provenant de la plante elle-même, libérées suite aux dommages provoqués par les microorganismes lors de l'infection. Parmi les DAMP les mieux caractérisés, on peut citer les oligogalacturonides (OG), qui sont des oligomères de résidus d'acide galacturonique, libérés de la paroi cellulaire suite à la dégradation partielle par les microorganismes d'un composant majeur de la pectine, l'homogalacturonane (Nothnagel *et al*, 1983). Les PAMP et les DAMP sont alors reconnus par des récepteurs situés sur la membrane plasmique des cellules appelés Pattern Recognition Receptors (PRR). Cette reconnaissance engendre l'activation de voies de signalisation aboutissant à la première forme d'immunité, la PTI (*PAMP-triggered immunity*) (Figure I.1) (Jones & Dangl, 2006). La PTI est activée par un large spectre de molécules fortement conservées à travers différents groupes de microorganismes.

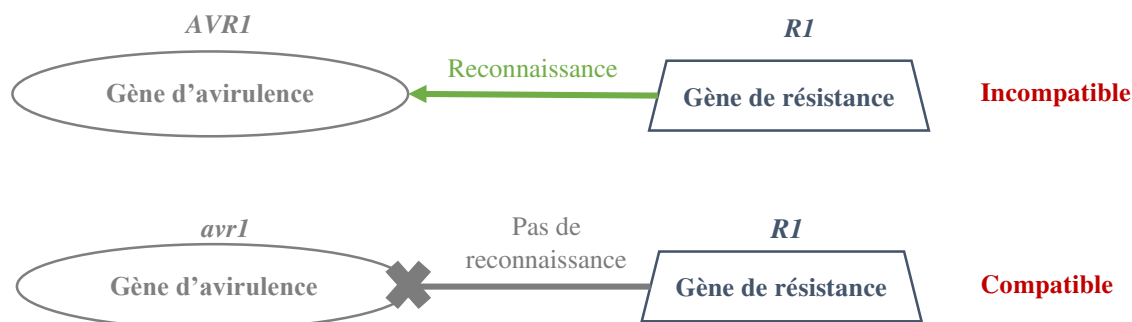


Figure I.2: Interactions entre agent pathogène et plante-hôte dans le cadre de la résistance gène pour gène

Différents génotypes de l'agent pathogène: *AVRI* ou *avrI*

Génotype de la plante hôte : *RI*

Deux natures possibles de l'interaction: incompatible (conduit à la résistance) et compatible (conduit à la maladie)

La résistance est déterminée par l'interaction entre le produit d'un gène de la plante (gène *R*), et le produit d'un gène de l'agent pathogène (gène d'avirulence *Avr*). La formation du complexe des produits *R-Avr* induit un signal qui conduit à une cascade d'évènements aboutissant à la **résistance**. L'interaction entre l'agent pathogène et la plante-hôte est alors **incompatible**. Lorsque la formation du complexe des produits *R-Avr* est impossible, cela conduit à la **maladie**. Dans ce cas, l'interaction est alors dite **compatible**.

Adapté de Phytopathologie P. Lepoivre, 2007

Le deuxième niveau de défense des plantes contre les parasites, plus intense que la PTI, est lié à la détection directe ou indirecte de certaines molécules microbiennes, les effecteurs, par des récepteurs codés par les gènes de résistance (R). En effet, au cours de l'évolution, certains microorganismes ont acquis la capacité de produire des effecteurs qui sont libérés à l'intérieur de la cellule de la plante hôte et qui, en réprimant la PTI, contribuent à la virulence de l'agent pathogène. On parle alors d'ETS (*effector-triggered susceptibility*). Certains génotypes de plantes ont alors mis en place un système pour se défendre – les protéines R – capables de percevoir ces effecteurs et d'activer la deuxième forme d'immunité, l'ETI (*effector-triggered immunity*) (Figure I.1). Cette forme de résistance avait été décrite par les travaux d'Harold H. Flor en 1942, sur le lin (*Linum usitatissimum*) et l'agent de rouille du lin (*Melampsora lini*), ce qui a permis d'énoncer le concept gène-pour-gène, selon lequel les plantes hôtes possèdent le gène R correspondant aux gènes Avr de l'agent pathogène (Figure I.2). Une perte ou une altération de l'un de ces deux gènes conduit à la maladie (réaction compatible). Au contraire, la reconnaissance du produit du gène Avr par la protéine R initie une cascade d'événements cellulaires conduisant à la résistance (réaction incompatible). Ce modèle gène-pour-gène présupposait l'existence d'une interaction physique entre l'effecteur Avr et la protéine R. Des preuves du contact direct entre les deux types de protéines ont été fournies pour quelques modèles (Jia *et al*, 2000; Deslandes *et al*, 2002; Dodds *et al*, 2006). Cependant, les cas d'interaction directe R-Avr restent rares, laissant supposer une relation plus complexe (Ellis *et al*, 2000). Un autre modèle a été proposé, impliquant l'intervention d'une troisième composante dans cette interaction. Dans ce dernier modèle, appelé « hypothèse de garde », la protéine Avr et la protéine R feraient partie d'un complexe incluant une protéine de garde médiant l'interaction (Bergelson *et al*, 2001; Luderer *et al*, 2001; Van der Hoorn *et al*, 2002).

b. La transduction des signaux

Suite à la perception de l'agent pathogène par le récepteur, une cascade de signalisation se met en place afin d'induire des réponses de défense par l'intermédiaire de messagers secondaires (Figure I.1).

L'utilisation de modèle simplifié (cultures de cellules traitées par des PAMP ou DAMP) a permis de décrypter des événements précoces de signalisation. Un des premiers événements de signalisation observable dans les suspensions cellulaires en réponse aux PAMP ou aux DAMP correspond à une augmentation des flux d'ions à travers la membrane plasmique, tels que des influx de Ca^{2+} et H^+ , des efflux de K^+ , de Cl^- et de NO_3^- (Tavernier *et al*, 1995; Gauthier

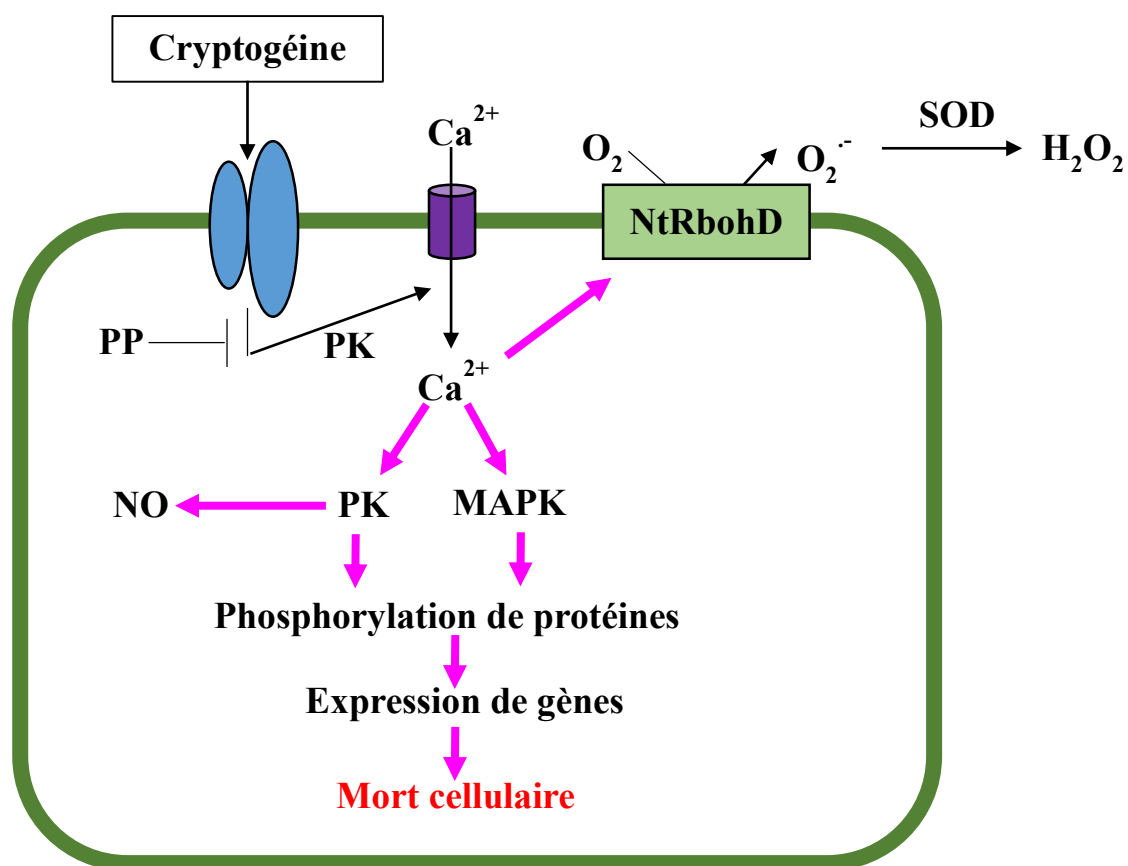


Figure I.3: Interaction entre les différents acteurs des voies de signalisation de la transduction du signal induite par la cryptogéine chez le tabac

PP, protéine phosphatase; **PK**, protéine kinase; **NtRbohD**, respiratory burst oxidase homologues D; **SOD**, superoxide simutase.

Adapté de Garcia-Brugger et al, 2006

et al., 2007). Par exemple, en réponse à la flagelline, un flux d'ions est observé dans des suspensions cellulaires de tomate, de tabac, de pomme de terre, d'*Arabidopsis* (Felix *et al.*, 1999). Ces flux ioniques opèrent généralement en amont d'autres événements de signalisation intracellulaire. Les autres événements de signalisation précoce communément observés en réponse aux éliciteurs sont l'activation de protéines kinases (dont les MAPK), la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), appelée le « burst » oxydatif (Gómez-Gómez *et al.*, 1999), la production de monoxyde d'azote (NO) et de peroxy-nitrite (ONOO⁻) (Garcia-Brugger *et al.*, 2006) (voir chapitre II). Ces événements de signalisation sont liés. Par exemple, il a été montré dans le modèle cryptogéine-tabac que la perception de la cryptogéine conduisait à l'activation de protéines kinases ou l'inhibition de protéines phosphatases, qui à leur tour, induisent un influx de Ca²⁺ responsable ensuite de la production de ROS, de l'activation de nouvelles protéines kinases comme les MAPK. Ces dernières interviennent en amont de la production de NO ou de la régulation de gènes de défense (pour revue, Garcia-Brugger *et al.*, 2006) (Figure I.3).

Les phytohormones, telles que l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET) sont reconnues comme des hormones jouant un rôle majeur dans la régulation des défenses. Bien que leur rôle soit moins décrit dans la littérature, les hormones, telles que l'acide abscissique (ABA), l'auxine, les gibbérellines et les cytokinines contribuent elles aussi à la régulation des voies de signalisation des défenses. Les phytohormones sont considérées comme signaux secondaires et peuvent constituer un lien entre les événements précoces de signalisation et l'activation finale des réponses de défense (Pieterse *et al.*, 2012). Par exemple, des MAPK vont phosphoryler et stabiliser des enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'ET ce qui conduit à la production d'ET qui pourra induire l'expression de gènes de défense (Liu & Zhang, 2004).

Ces différentes hormones semblent contrôler l'établissement des défenses contre les bioagresseurs en fonction du mode de vie de ces derniers. La voie du SA est impliquée dans les défenses contre les microorganismes pathogènes biotrophes, celle des JA et de l'ET dans les défenses contre les microorganismes pathogènes nécrotrophes, et celle des JA contre les herbivores. Cependant, ces voies de signalisation ne sont pas indépendantes les unes des autres et certains acteurs moléculaires d'une voie peuvent jouer un rôle antagoniste ou synergique sur les voies contrôlées par d'autres hormones (Figure I.4). Ainsi, la signalisation par le SA est souvent antagoniste à celle médiée par le JA et, de ce fait, une signalisation accrue par le SA en réponse à des biotrophes est souvent accompagnée d'une diminution de la résistance de la

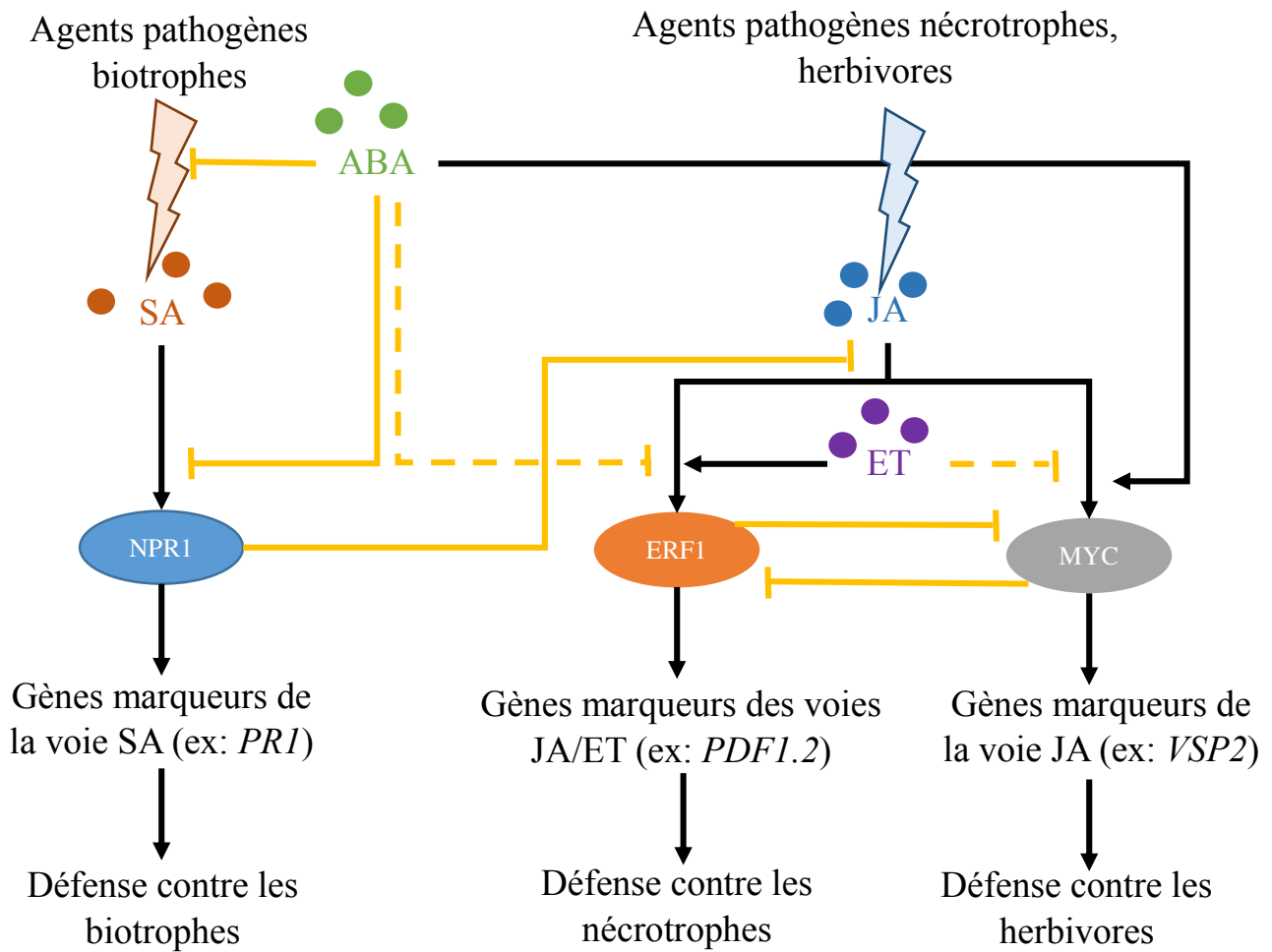


Figure I.4: Régulations croisées entre les voies de signalisation du SA, du JA, de l'ET et de l'ABA

Les voies de signalisation hormonales sont activées en réponse aux agents pathogènes biotrophes, nécrotrophes et aux herbivores. Les acteurs clés de ces voies sont les suivants, NPR1 (non expressor of PR1) pour la voie du SA, qui régule négativement la voie du JA; ERF1 (ethylene response factor 1) pour la voie du JA/ET. L'ET favorise l'activation de la voie passant par ERF1; MYC pour la voie JA. L'ET réprime la branche MYC. De plus, l'ABA est impliquée indirectement dans la régulation des défenses en réprimant la voie du SA et de l'ET, et en activant la voie du JA.

Adapté de Pieterse et al, 2012

plante vis-à-vis de nécrotrophes. De plus, des hormones n'étant pas directement impliquées dans la régulation des défenses, peuvent influencer les voies du SA, du JA et de l'ET, comme par exemple le cas de l'ABA, qui est capable de réprimer la voie du SA et celle de l'ET, et de favoriser la voie du JA (Pieterse *et al*, 2012) (Figure I.4).

Ces phytohormones interviennent non seulement dans la résistance locale à l'infection mais aussi dans la mise en place de la résistance dans l'ensemble de la plante, c'est-à-dire la résistance systémique acquise (SAR, voir paragraphe suivant) et la résistance systémique induite (ISR, voir paragraphe suivant). Le SA joue un rôle primordial dans le déclenchement de la SAR (Delaney *et al*, 1994). Cette hormone s'accumule à la fois au site d'infection et dans les tissus distaux. Le JA et l'ET semblent être impliqués dans l'ISR. En effet, les gènes dont l'expression est inductible par le JA et l'ET sont fortement exprimés chez les plantes ayant induit l'ISR suite à l'attaque d'un agent pathogène (Verhagen *et al*, 2004).

c. Les réponses de défense

La reconnaissance des microorganismes et la transduction des signaux mènent à l'expression des défenses de la plante afin de contenir ou bloquer la progression du parasite. Plusieurs types de réponses sont décrits pour faire face aux microorganismes pathogènes. Tout d'abord, les plantes peuvent renforcer leur paroi cellulaire, par exemple par des dépôts de lignine et de callose (un polymère β -1,3-glucane) au niveau du site d'infection (Hückelhoven, 2007). Les plantes produisent également des molécules ayant une action sur l'agent pathogène comme les phytoalexines (Hammerschmidt, 1999), possédant des structures chimiques variées (Ahuja *et al*, 2012) ou les protéines PR (pathogenesis-related) dotées d'activités enzymatiques variées telles que la glucanase, les chitinases, les peroxidases... (Loon *et al*, 2006). La production de ROS peut être également considérée comme un moyen de lutte direct contre les agents pathogènes en plus de son rôle dans la signalisation cellulaire. Enfin, on observe également l'activation de mécanismes de type « réponse hypersensible » (HR) (Mur *et al*, 2006). La HR est caractérisée par le développement d'une zone de mort cellulaire (*PCD*, *programmed cell death*) autour du site d'infection (Mur *et al*, 2008) qui constitue une défense efficace contre les agents pathogènes biotrophes en les privant de nutriments. La mise en place de la HR au niveau du site d'infection déclenche généralement l'activation d'une SAR visant à protéger les autres tissus de la plante en prévention d'une attaque ultérieure par un agent pathogène. Cette résistance généralisée peut durer plusieurs mois, voire être transmise à la génération suivante (Kachroo & Robin, 2013). L'ISR est un autre processus de résistance induite qui implique des microorganismes bénéfiques.

Élément minéral	Diminution de la maladie	Augmentation de la maladie	Effet variable
Azote (N, NH ₄ , NO ₃)	168	233	17
Phosphore (P)	82	42	2
Potassium (K)	144	52	12
Calcium (Ca)	66	17	4
Manganèse (Mn)	68	13	2
Cuivre (Cu)	49	3	0
Zinc (Zn)	23	10	3
Bore (B)	25	4	0
Fer (Fe)	17	7	0
Soufre (S)	11	3	0
Magnésium (Mg)	18	12	2
Silicium (Si)	15	0	0
Chlorure (Cl)	9	2	8

Tableau I.1: Effets de la fertilisation minérale sur les dégâts provoqués par la maladie des plantes

Ce tableau est basé sur 1180 rapports.

Extrait de Huber & Graham, 1999

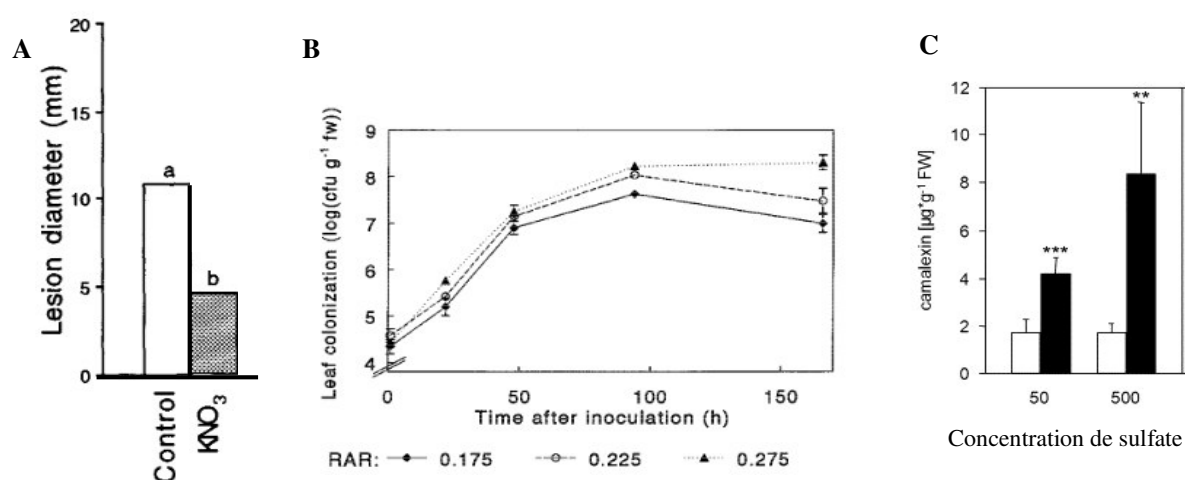


Figure I.5: Effets des nutriments sur la sensibilité des plantes à différentes maladies

(A) Mesure du diamètre des lésions provoquées par *Alternaria solani* sur les feuilles de tomate ayant été vaporisées (KNO₃) ou non (control) avec du nitrate (Blachinski et al, 1996). (B) Mesure de la colonisation des feuilles de tomate par *Pseudomonas syringae* en fonction des niveaux de fertilisation azotée (RAR) ajoutés (Hoffland et al, 2000). (C) Mesure du contenu en camalexine dans les plantes d'*A. thaliana* infectée (histogramme noir) ou non (histogramme blanc) par *Alternaria brassicicola* et en présence de 50 ou 500 µM de sulfate. (Kruse et al, 2012).

Tout comme la SAR, l'ISR se définit comme un état de résistance permettant de protéger la plante entière face à une future attaque par des microorganismes pathogènes ou herbivores (Pieterse *et al*, 2014).

1.2 Liens entre la résistance des plantes et la disponibilité en nutriments

Les nutriments sont essentiels pour la croissance et le développement des plantes mais peuvent également affecter la sévérité des maladies (Huber and Graham, 1999). Aucune règle générale n'est observée concernant leurs effets. En fonction de l'agent pathogène ou de la plante, un nutriment particulier peut participer à la diminution ou à l'augmentation de la sévérité d'une maladie (Tableau I.1). Par exemple, l'application d'azote provoque une diminution de la sensibilité de la tomate à *Alternaria solani* (Blachinski *et al*, 1996) alors qu'une augmentation de sensibilité est observée lors de l'infection par *Pseudomonas syringae* chez cette même plante (Hoffland *et al*, 2000) (Figure I.5 A-B). Le soufre, le phosphore et plus particulièrement l'azote sont trois macroéléments dont nous avons étudiés les effets sur la résistance de *M. truncatula* à *A. euteiches*.

Le soufre (S), présent dans les acides aminés soufrés, les hétérosides soufrés et certaines vitamines, est prélevé dans les racines sous forme de sulfate. Ce macroélément est impliqué dans la formation de composés de défense (phytoalexines, glucosinolates, glutathion...) nommés sulfur-containing defense compounds (SDC) (Rausch & Wachter, 2005). L'exposition à des stress biotiques conduit à l'augmentation de la synthèse de SDC. Par exemple, des plantes d'*A. thaliana* montrent une augmentation des concentrations en cystéine et en glutathion trois jours après inoculation par *Alternaria brassicicola* (Kruse *et al*, 2007). L'effet direct du S sur la concentration en glucosinolates (camalexine) et sur la résistance de la plante a été démontré (Kruse *et al*, 2012). En effet, des plantes d'*A. thaliana*, cultivées en conditions optimales synthétisent plus de camalexine (Figure I.5 C) et sont significativement moins infectées que les plantes carencées (cultivées avec dix fois moins de sulfate).

Le phosphore fait partie de nombreuses molécules organiques de la cellule (ADN, ARN, ATP et phospholipides) et est assimilé par la plante sous forme de phosphate inorganique. Les effets du phosphore sur la résistance aux maladies sont variables.

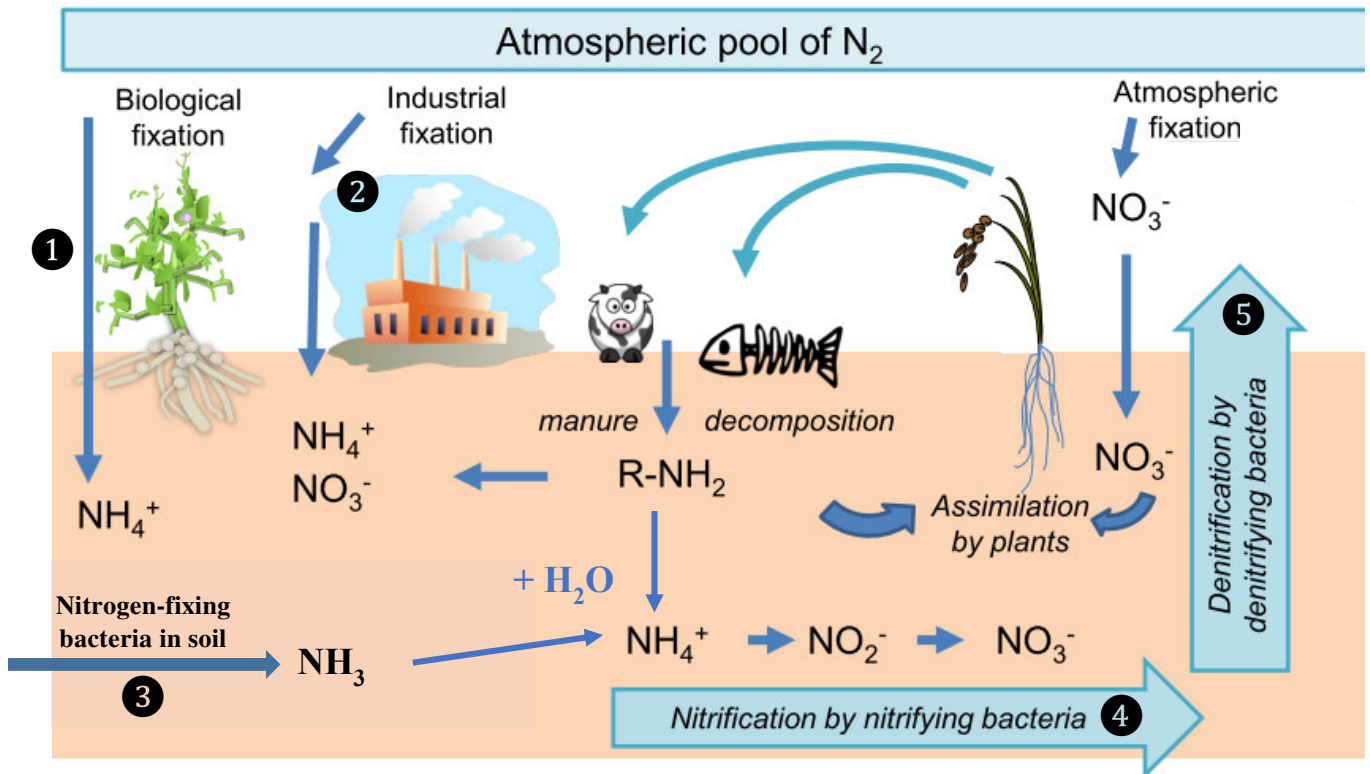


Figure I.6: Le cycle de l'azote

L'azote atmosphérique (N_2) peut être fixé par les plantes par l'intermédiaire de symbioses ①, industriellement, grâce à la réaction de Haber-Bosch ($N_2 + 3H_2 \leftrightarrow 2NH_3$) ② et par les bactéries pour produire de l'ammoniac (NH_3) puis de l'ammonium (NH_4^+) ③. Les bactéries nitrifiantes vont former du nitrate (NO_3^-) à partir du NH_4^+ ④. Les bactéries dénitrifiantes peuvent transformer NO_3^- en N_2 ⑤.

Adapté de *The Plant Cell*, 2014 American Society of Plant Biologists

La fertilisation phosphatée du blé entraîne une diminution des pertes provoquées par l'oomycète *Pythium* (Huber, 1980). D'autres études montrent que l'application du phosphate a un effet inverse. Il peut augmenter la sévérité des maladies comme par exemple celle causée par le mildiou (*Bremia lactucae*) de la laitue (Huber, 1980).

L'azote est le macroélément quantitativement le plus important pour la croissance des plantes. L'azote est le constituant principal des protéines et un des constituants de la chlorophylle, ce qui en fait un des acteurs principaux de la photosynthèse. Les plantes stockent l'azote essentiellement sous forme de nitrate ou d'acides aminés et de protéines, dans leurs racines, tiges, feuilles, graines... Elles mobilisent ces réserves quand la croissance et le développement de nouveaux organes nécessitent des besoins en azote importants (Morot-Gaudry, 2001) et que le prélèvement d'azote ne suffit plus à couvrir ces besoins, comme par exemple lors de la sénescence (Bieker & Zentgraf, 2013).

Il est aujourd'hui largement reconnu que la disponibilité en azote a une influence sur les interactions plante/agents pathogènes (Fagard *et al*, 2014). L'effet de l'azote sur la résistance de la plante et sur l'expression des réponses moléculaires de défense des plantes sera développé dans la partie I.1.5 (*Implication de l'azote dans les défenses immunitaires*).

1.3 Métabolisme de l'azote

a. Cycle de l'azote

Le cycle de l'azote décrit les processus biochimiques de transformation de cet élément en assurant une circulation rapide dans les différents compartiments de l'écosystème. Ce cycle est complexe en raison du grand nombre de transformations de l'azote dans l'environnement et de la difficulté pour les êtres vivants à l'incorporer. Trois sources d'azote existent pour les êtres vivants: l'azote atmosphérique (diazote N_2), l'azote minéral (nitrate NO_3^- , ammoniac NH_3 et ammonium NH_4^+) et l'azote organique (acides aminés, protéines...). Le principal réservoir d'azote est l'atmosphère ce qui fait du N_2 la forme majoritaire d'azote. La force de la triple liaison qui relie les deux atomes de N, rend ce composé indisponible pour la plupart des êtres vivants s'il n'est pas fixé, c'est-à-dire transformé en azote assimilable. L'azote atmosphérique est fixé soit par les plantes par l'intermédiaire de symbioses, soit par des bactéries pour produire de l'ammonium ou soit industriellement (réaction de Haber-Bosch) (Figure **I.6**).

Minoritairement, les décharges électriques et les ultraviolets peuvent transformer le N₂ en monoxyde d'azote (NO) alors oxydé en dioxyde d'azote (NO₂), puis en acide nitrique (HNO₃). Ce dernier atteint le sol par les précipitations ou sous forme de particules sèches sur lesquelles il a été adsorbé dans l'atmosphère. Cet apport d'azote reste faible et se trouve surtout important dans les régions tropicales et montagneuses (Prather et al, 2001). Dans le sol, le nitrate et l'ammonium sont donc les principales formes d'azote inorganique disponibles pour la plante (Raven *et al*, 1992). Les microorganismes décomposeurs (bactéries, champignons) transforment la matière organique azotée provenant des plantes ou d'animaux morts en CO₂, H₂O et NH₃ (minéralisation). Au contact de l'eau, l'ammoniac se transforme en ammonium. Les bactéries nitrifiantes permettent la formation de nitrate à partir d'ammonium. Dans les sols bien aérés, la nitrification est rapide, il en résulte une faible concentration en ammonium. Si le sol est inondé, donc privé d'oxygène, l'ammonium s'accumule (Crawford & Forde, 2002). Une dénitrification s'effectue aussi dans le sol grâce à des bactéries dénitrifiantes qui, dans certaines conditions peuvent transformer le nitrate en diazote, inutilisable par la plupart des plantes (Figure I.6).

b. Acquisition de l'azote par la plante

Selon leur position phylogénétique, les plantes vont acquérir l'azote par prélèvement direct du sol des formes minérales (nitrate et ammonium) et/ou par l'intermédiaire de symbioses.

- Prélèvement direct des formes minérales de l'azote par les racines des plantes:

Les concentrations en nitrate et ammonium dans les sols varient selon le degré de minéralisation et de nitrification (quelques micromolaires à plusieurs millimolaires) (Marschner *et al*, 1995). Des systèmes très spécifiques de transport de nitrate ou d'ammonium ont été développés chez les plantes : un système de transport à haute affinité (*HATS, High Affinity Transport System*) et un système de transport à basse affinité (*LATS, Low Affinity Transport System*) (Crawford & Forde, 2002).

L'utilisation de l'azote du sol implique tout d'abord le franchissement de la membrane plasmique des cellules racinaires. Dans le cas du nitrate, le potentiel négatif de la membrane ainsi que le gradient de concentration ne permettent pas, en général, l'entrée passive du nitrate dans le cytoplasme, et un système de transport actif couplé à une pompe à protons H⁺/ATPase est donc nécessaire (Glass et Siddiqi, 1995). Les transporteurs de nitrate sont codés par deux familles de gènes : des gènes appartenant à la famille NRT1/PTR (NPF) impliqués, en général,

dans le transport à faible affinité et les gènes de la famille NRT2 responsables pour la plupart du transport à haute affinité (Forde, 2000). Chez *A. thaliana*, deux gènes de la famille NPF (*AtNPF6.2* et *AtNPF6.3/AtNRT1.1*) sont importants pour le transport du nitrate lorsqu'il est présent dans le milieu à hautes concentrations. Ces deux transporteurs ont une faible affinité pour le nitrate mais, dans le cas de *AtNPF6.3*, une haute affinité est observée dans certaines conditions. Chez *M. truncatula*, deux gènes de la famille NPF ont été caractérisés: le gène *NIP/LATD* codant pour un transporteur à haute affinité pour le nitrate impliqué dans le contrôle de l'architecture racinaire et la formation de nodosités (Yendrek *et al*, 2010; Bagchi *et al*, 2012), et le gène *MtNPF6.8 (MtNRT1.3)* qui a été identifié comme ayant une double affinité (Morère-Le Paven *et al*, 2011) pour le nitrate similaire à celle du « transcepteur » *AtNPF6.3* (Wang *et al*, 1998; Liu *et al*, 1999) et qui pourrait jouer un rôle dans la croissance de la racine primaire.

Chez *A. thaliana*, sept transporteurs appartenant à la famille NRT2 ont été mis en évidence (Orsel *et al*, 2002, pour revue) alors que chez *M. truncatula*, uniquement trois transporteurs de cette famille ont été caractérisés. Le gène *MtNRT2.1* phylogénétiquement proche du gène *AtNRT2.1*, coderait vraisemblablement pour un transporteur à haute affinité du nitrate, impliqué de façon majoritaire dans le transport du nitrate du milieu extérieur dans la racine, alors que le gène *MtNRT2.2* est très peu exprimé. En revanche, *MtNRT2.3* qui est proche phylogénétiquement de *AtNRT2.5*, un gène important pour le transport et la remobilisation du nitrate chez des plantes limitées en azote, pourrait avoir un rôle dans la redistribution du nitrate chez *M. truncatula* (Pellizzaro *et al*, 2015). A ce jour, le nitrate est le seul substrat identifié des transporteurs NRT2 caractérisés chez les plantes supérieures.

Dans le cas de l'ammonium, son transport actif est assuré par un uniport d'ammonium voltage dépendant, piloté par la famille de transporteurs AtAMT (Ludewig *et al*, 2002). La complémentation fonctionnelle d'un mutant de levure, déficient pour le transport de l'ammonium, a permis d'identifier le premier gène *AMT1* : *AMT1.1* (Ninnemann *et al*, 1994). Depuis, le séquençage complet du génome d'*A. thaliana* a révélé quatre autres séquences homologues (*AtAMT1.1* à *AtAMT1.5*) (Gazzarrini *et al*, 1999; Sohlenkamp *et al*, 2000). Deux de ces gènes *AtAMT1.1* et *AtAMT1.3* contribuent pour 70 % de l'influx à haute affinité de l'ammonium sans toutefois être indispensables pour la croissance des plantes (Loqué *et al*, 2006). Le séquençage du génome de *M. truncatula* a permis de mettre en évidence huit gènes *AMT* (Benedito *et al*, 2010) dont quatre appartiennent à la famille *AMT1*, transporteurs à haute affinité de l'ammonium (Yuan *et al*, 2007), alors que le reste appartient à la sous-famille des *AMT2*, qui code pour des transporteurs impliqués dans le transfert de l'ammoniac

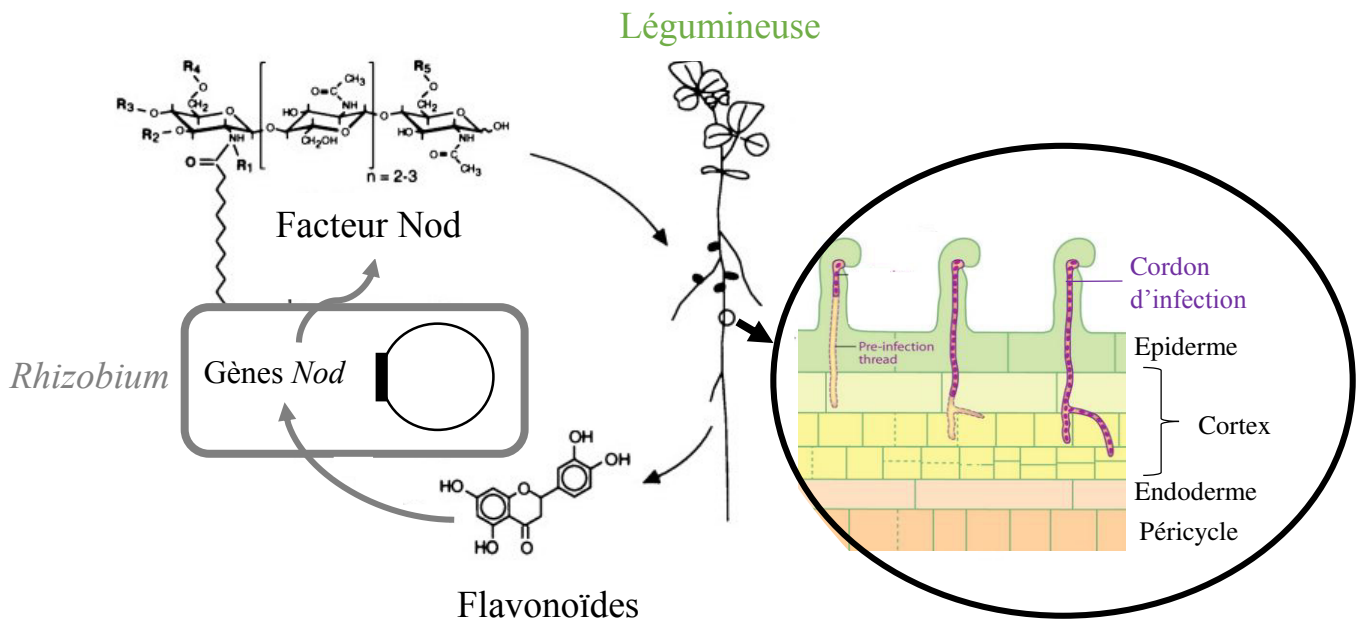


Figure I.7: Echange de signaux lors d'une symbiose rhizobienne-légumineuse

Les (iso)flavonoïdes, les stachydrines et les acides aldoniques, composés importants pour la mise en place de la symbiose, sont trouvés dans les exsudats racinaires. Ils peuvent diffuser passivement à travers la membrane bactérienne (Begum et al, 2001; Wang et al, 2012) et constituent alors les premiers signaux de l'hôte qui déclenchent chez la bactérie l'expression de gènes de régulation de la nodulation (nod), qui permettent à leur tour la production de facteur Nod, qui sont des lipochitooligosaccharides (Peters & Verma, 1990). La production de ce facteur Nod va induire des modifications morphologiques, physiologiques et moléculaires complexes permettant la pénétration de la bactérie au sein de la plante hôte (Oldroyd et al, 2011). Le zoom montre un cordon d'infection passant par le cortex racinaire vers un groupe de cellules en division, qui deviendra le primordium nodulaire.

Adapté de Schultze et Kondorosi, 1998; Oldroyd et al, 2011

(Sohlenkamp *et al*, 2000; Neuhäuser *et al*, 2009). Les données publiques des microarray suggèrent qu'en condition standard de croissance, la plupart des *AMT* de *M. truncatula* sont faiblement exprimés (<http://www.bioinfo.noble.org/gene-atlas>).

- Acquisition de l'azote par les plantes grâce à des symbioses :

Les bactéries du genre *Rhizobium* sont capables d'établir une symbiose avec des plantes de la famille des Fabacées (légumineuses) en induisant la formation d'un organe particulier, appelé nodosité, véritable organe d'échanges métaboliques entre les bactéries et la plante. Une des particularités des légumineuses est leur richesse en protéines (jusqu'à 40 % MS de protéines dans la graine). La symbiose, entre ces plantes et les bactéries, présente donc un intérêt agronomique considérable puisqu'elle permet de réduire l'apport en engrais azotés tout en fournissant un moyen efficace de produire des aliments riches en protéines (Hirsch *et al*, 2001).

Les interactions entre les *Rhizobiums* et les légumineuses se produisent dans la rhizosphère par des échanges de signaux qui vont permettre à la symbiose de s'établir par la formation de nodosité (Figure I.7). A l'intérieur de la nodosité, la bactérie se différencie en bactéroïde, qui est la forme sous laquelle elle est capable de réduire le N_2 en NH_4^+ grâce à un complexe enzymatique appelé nitrogénase (Wang *et al*, 2012). L'ammonium est la principale source d'azote exportée depuis les bactéroïdes mais ceux-ci peuvent également sécréter des acides aminés tels que l'alanine et l'aspartate (Allaway *et al*, 2000; Parsons *et al*, 2002). La nitrogénase étant très sensible à l'oxygène, la fixation azotée optimale se fera dans des conditions de faible pression en oxygène. Ceci est réalisé au sein de la nodosité par la séquestration de l' O_2 par des leghémoglobines (hémoprotéines de structure proche de l'hémoglobine) de plante (Ott *et al*, 2005).

La formation d'une symbiose rhizobienne est dépendante de la disponibilité en azote minéral présent dans le sol. Cette disponibilité en azote est considérée comme le principal facteur environnemental affectant la fixation symbiotique de N_2 , et par conséquent la source de nutrition azotée de la plante (Streeter, 1988). Il a été montré que la présence d'azote minéral dans le sol inhibe la symbiose au profit de l'acquisition directe de l'azote du sol (Voisin *et al*, 2002). La symbiose ne se met donc en place que lorsque la plante est limitée en azote. Par ailleurs, des études quantitatives indiquent que la répression de la symbiose par le nitrate du sol ou l'efficacité de fixation symbiotique de N_2 pouvait différer selon les espèces ou les génotypes d'une même espèce. Harper & Gibson, (1984) ont testé la capacité de nodulation, en présence de différentes concentrations en nitrate, de huit légumineuses: le lupin (*Lupinus angustifolius*),

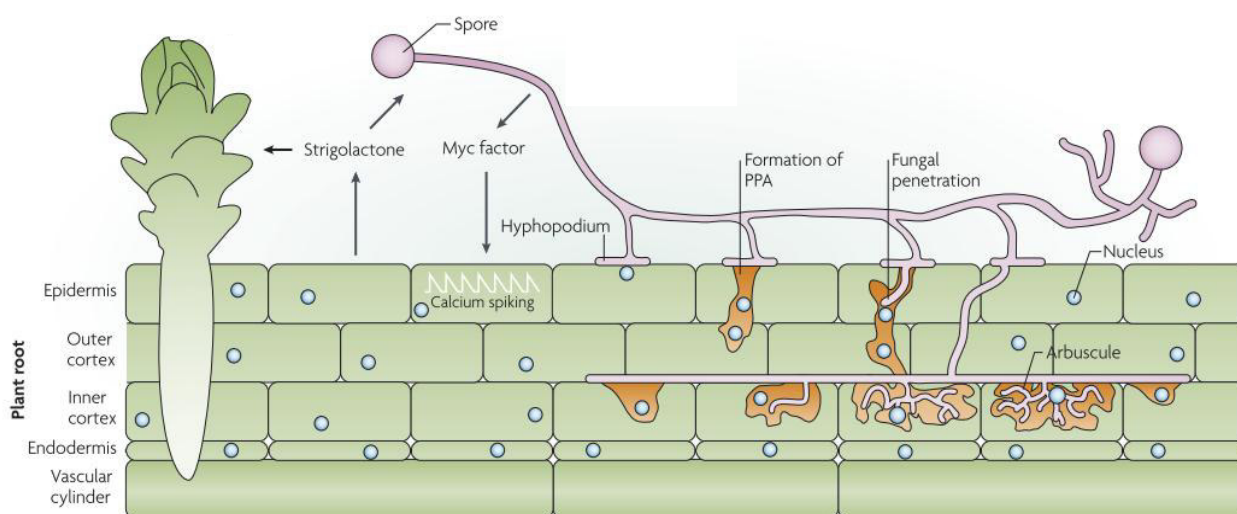


Figure I.8: Développement d'une mycorhize à arbuscules

Les racines des plantes vont émettre des strigolactones qui vont induire la germination des spores, la ramification de l'hyphe et l'augmentation de l'activité physiologique des spores et de l'hyphe. Les champignons produisent des facteurs mycorhiziens (Myc) qui vont induire des oscillations calciques dans les cellules de l'épiderme de la racine et activer les gènes de plantes liés à la symbiose. Le champignon MA va former un appressorium (hyphopodium), à partir duquel le champignon peut pénétrer dans le cortex et l'épiderme. Suite à une stimulation chimique et mécanique, les cellules de plantes produisent un appareil de pénétration (PPA) à travers lequel l'hyphe va pouvoir s'étendre. Le champignon pénètre dans les cellules de la plante et entre dans l'apoplaste où il va former des branches (arbuscule) et s'agrandir le long de l'axe de la racine. La membrane plasmique de la cellule végétale augmente considérablement sa surface et s'invagine tout autour de l'arbuscule. C'est à cette interface cellulaire que les échanges de nutriments entre les partenaires ont principalement lieu (Reinhardt, 2007).

Extrait de Parniske, 2008

le pois (*Pisum sativum*), le trèfle (*Trifolium subterraneum*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), le siratro (*Macroptilium atropurpureum*), le soja (*Glycine max*), le pois antaqué (*Lablab bean*) et la luzerne tronquée (*Medicago truncatula*). Les trois dernières espèces, le soja, le pois antaqué et *M. truncatula* montrent une sensibilité plus importante au nitrate. En effet, le nombre de nodosités apparentes est plus faible que pour les autres espèces et l'activité nitrogénase est inhibée en présence d'1 mM de nitrate. Généralement, l'exigence en azote des plantes est maintenue quelle que soit la source azotée (Sagan *et al*, 1993 ; Voisin *et al*, 2002). Cependant, certaines espèces, comme le soja ou *M. truncatula* par exemple, sont connues pour être mauvaises fixatrices par rapport au pois. En effet, lorsque la fixation symbiotique N₂ est la seule source azotée, le besoin en azote des plantes peut ne pas être comblé, les plantes sont alors carencées (Gan *et al*, 2002; Moreau *et al*, 2008).

Les symbioses mycorhiziennes à arbuscule (MA) se rencontrent chez plus de 80 % des plantes terrestres y compris de nombreuses espèces cultivées telles que le blé, le maïs, le soja et les légumineuses (Wang & Qiu, 2006). Elles jouent un rôle clé dans l'assimilation de nutriments. En effet, le mycélium extra-radicalaire des champignons agit comme une extension du système racinaire et augmente l'absorption du phosphore, de l'azote, du soufre et du magnésium, mais également des oligo-éléments tels que le cuivre et le zinc. De plus, les champignons mycorhiziens offrent également des avantages non-nutritionnels aux plantes, en améliorant leur résistance contre les stress abiotiques (sécheresse, salinité, métaux lourds) et biotiques (agents pathogènes, herbivores) (Smith & Read, 2008).

L'établissement de la symbiose MA se fait aussi par des échanges de signaux entre la plante et le champignon mycorhizien (Figure I.8).

Il apparaît que les symbioses MA puissent également jouer un rôle dans la fourniture d'azote à la plante. En effet, des expériences par marquage ¹⁵N ont montré que l'azote pouvait être transféré par le champignon MA à la plante hôte (Govindarajulu *et al*, 2005), mais l'importance quantitative de l'azote transféré reste encore controversée (Smith & Smith, 2011). Le nitrate et l'ammonium peuvent être transportés par le champignon MA mais c'est l'ammonium qui est souvent la source préférentielle d'azote (Bücking & Kafle, 2015). Des études ont montré que des transporteurs d'ammonium chez un champignon MA avaient une plus grande affinité pour l'ammonium que les transporteurs à haute affinité AMT des plantes (Pérez-Tienda *et al*, 2012), ce qui conférerait une plus grande aptitude des plantes mycorhizées à acquérir de l'ammonium lorsqu'il est limitant dans le sol. Plus récemment, le rôle critique d'un transporteur symbiotique d'ammonium pour l'entretien et l'efficacité nutritionnelle de la

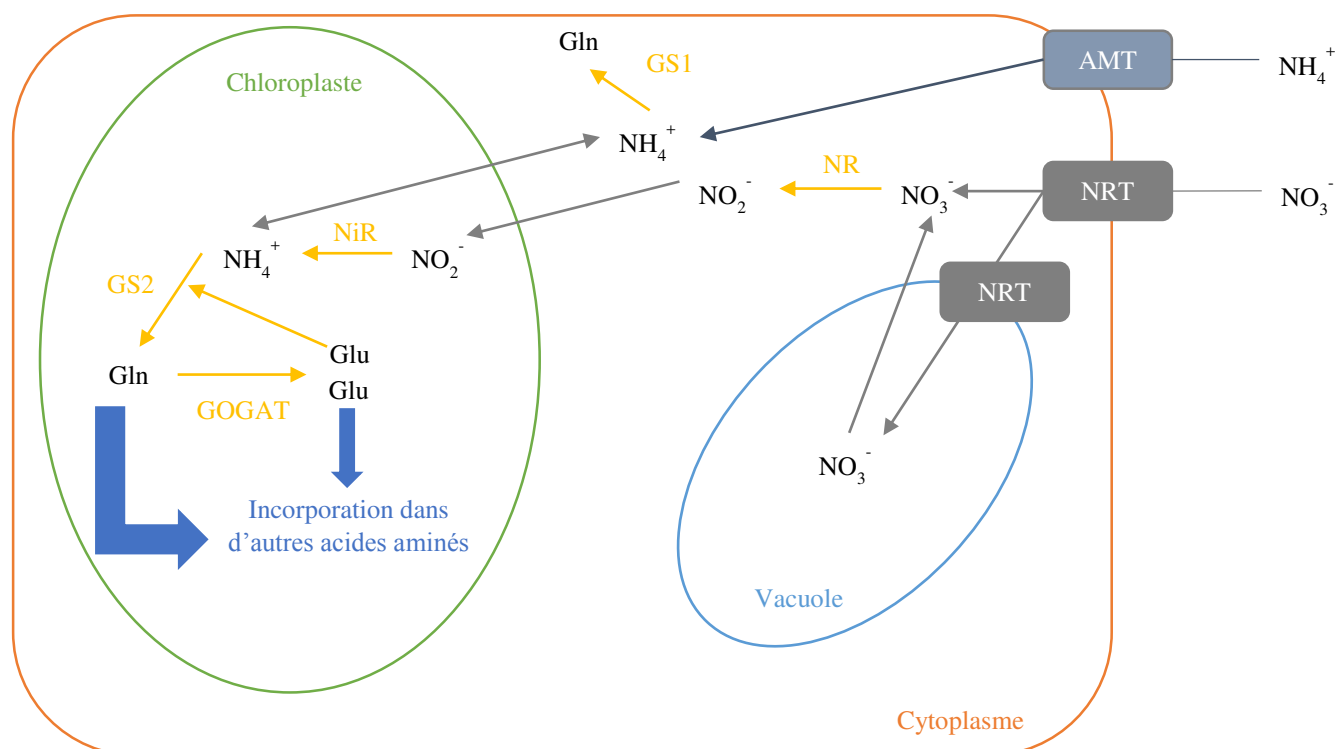


Figure I.9: Assimilation du nitrate et de l'ammonium dans la plante

Le nitrate (NO_3^-) est prélevé à l'aide de transporteurs de nitrate (NRT) et l'ammonium à l'aide de transporteurs d'ammonium (AMT). Une fois dans la cellule, le nitrate peut être stocké dans la vacuole ou est réduit dans le cytosol en nitrite (NO_2^-) par la nitrate réductase (NR). Le nitrite est transporté dans le chloroplaste. Celui-ci y est alors réduit en ammonium (NH_4^+) par la nitrite réductase (NiR). L'ammonium (NH_4^+) est incorporé au glutamate par la glutamine synthétase (GS) pour former la glutamine. Un transfert d'un groupement amide de la glutamine sera ensuite effectué à l' α -cétoglutarate par la GOGAT. Deux molécules de glutamate sont ainsi formées, l'une étant recyclée pour la formation de glutamine, l'autre utilisée pour la synthèse des acides aminés (Hirel & Lea, 2001; Mifflin & Habash, 2002). Les premiers acides aminés dans la cellule sont donc la glutamine et le glutamate, qui peuvent alors être utilisés pour former l'aspartate et l'asparagine via les deux enzymes aspartate aminotransférase (AAT) et asparagine synthétase (AS), ainsi que les autres acides aminés et molécules azotées. Glutamine, glutamate, aspartate et asparagine assurent alors la translocation de l'azote des organes sources vers les organes puits (Peoples et Gifford, 1993).

Adapté de The Plant Cell, 2014 American Society of Plant Biologists et de Krapp et al, 2015

symbiose MA a été mis en évidence (Breuillin-Sessoms *et al*, 2015; Javot *et al*, 2011), soulignant l'importance potentiel de l'azote dans cette symbiose.

c. Réduction du nitrate et synthèse des acides aminés

Le nitrate a plusieurs devenir dans la plante. Une fois absorbé, le nitrate peut être stocké dans les vacuoles ou assimilé. Son assimilation peut s'effectuer dans les racines ou dans les parties aériennes après export du nitrate dans le xylème et transfert dans les feuilles. Selon les conditions environnementales et les espèces de plantes considérées, la proportion de nitrate réduit au niveau foliaire ou racinaire peut varier (Smirnoff & Stewart, 1985). Le nitrate doit nécessairement être réduit en ammonium pour être assimilé. La réduction du nitrate est assurée par l'action successive de deux enzymes, la nitrate (NR) et la nitrite (NiR) réductase. Dans le cytosol, la NR catalyse la réduction du nitrate en nitrite. Toxique, le nitrite est immédiatement transféré dans les plastes où il est pris en charge par la NiR et réduit en ammonium (Figure I.9). L'ammonium, lui aussi toxique pour la plante, doit être immédiatement assimilé. Les principaux acteurs des processus d'assimilation de l'ammonium dans la plante sont la glutamine synthétase (GS) et la glutamate synthase (GOGAT). L'action combinée de la GS et de la GOGAT au cours du cycle GS/GOGAT va aboutir à l'incorporation de l'ammonium dans les acides aminés (Figure I.9).

De façon générale, deux isoformes de GS existent chez les plantes, aux rôles et localisations différents. La GS1, cytoplasmique, interviendrait surtout pour l'assimilation de l'azote dans les racines (Coruzzi, 2003) ou dans la remobilisation de l'azote lors de la sénescence foliaire. La GS2, localisée dans le chloroplaste, joue un rôle prépondérant dans l'assimilation de l'ammonium issu de la réduction du nitrate dans les chloroplastes et/ou dans la réassimilation de l'ammonium photorespiratoire.

M. truncatula comprend une famille multigénique de GS, constituée de quatre gènes, *MtGS1a* et *MtGS1b* codant pour un polypeptide cytosolique de 39 kDa; *MtGS2a* et *MtGS2b* codant pour un polypeptide localisé dans le plaste de 42 kDa. *MtGS2b* est spécifique de la graine et se retrouve seulement chez *M. truncatula* et quelques espèces apparentées (Seabra *et al*, 2010). Les trois autres GS sont exprimées dans tous les organes de la plante, mais de manière tissu-spécifique. *MtGS1a* est fortement exprimée dans les nodosités, où sa fonction consiste à assimiler l'ammonium produit par la fixation de l'azote (Carvalho *et al*, 2000a), mais également fortement exprimée dans les faisceaux vasculaires de tous les organes de la plante et probablement impliquée dans l'approvisionnement en glutamine pour le transport (Carvalho *et*

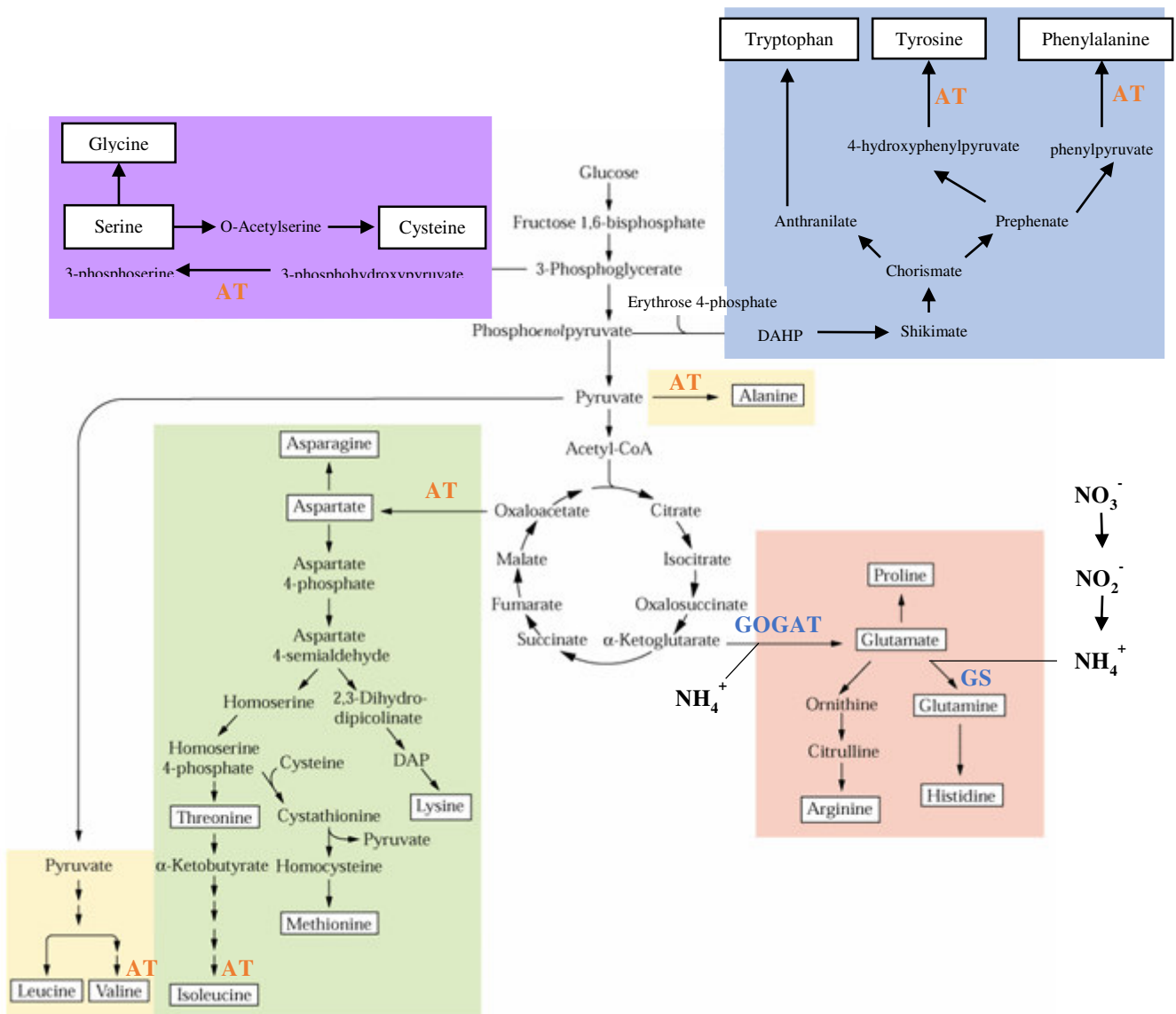


Figure I.10: Biosynthèse des acides aminés dans les plantes

Le glutamate synthétisé va permettre d'introduire un groupement aminé au sein du métabolisme des acides aminés. Le groupe aminé du glutamate peut être transféré à divers acides α -cétoniques en formant les acides aminés correspondants. L'aspartate, l'alanine, l'isoleucine, la valine, la phénylalanine, la tyrosine et la 3-phosphosérine sont obtenues par réaction de transamination grâce à une aminotransférase (AT).

Adapté de Buchanan et al, 2000

al, 2000b). *MtGS1b* est exprimé dans tous les organes de la plante, mais son expression est augmentée au cours de la sénescence et ce gène coderait probablement une isoenzyme responsable de la réassimilation de l'ammonium dérivé du catabolisme protéique (Carvalho *et al*, 2000b). *MtGS2a* est fortement exprimée dans tous les tissus photosynthétiques, où sa fonction est l'assimilation de l'ammonium issu de la photorespiration ou de la réduction du nitrate (Melo *et al*, 2003).

Deux types de GOGAT existent, localisées dans le chloroplaste: la NADH-GOGAT qui a un rôle prépondérant dans l'assimilation primaire de l'ammonium et la ferrédoxine-GOGAT (Fd-GOGAT) qui serait plus spécifiquement impliquée dans les processus de réassimilation de l'ammonium photorespiratoire (Coruzzi, 2003).

Par transamination, l'azote est ensuite transféré à d'autres substrats carbonés (acides α -cétoniques) pour former de nouveaux acides aminés (aspartate, alanine, glycine ...), eux-mêmes précurseurs de tous les autres acides aminés (Figure I.10). Les acides aminés synthétisés peuvent aussitôt contribuer à la biosynthèse des protéines, ou être transitoirement stockés dans les vacuoles ou transportés vers d'autres tissus.

1.4 Réponse de la plante à la limitation en nitrate

a. Le nitrate : élément nutritif et molécule signal

De nombreux facteurs environnementaux et endogènes contrôlent le transport et l'assimilation du nitrate à différents niveaux (transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel). Par exemple, la lumière ou les sucres issus de la photosynthèse (Lejay *et al*, 1999, 2003) augmente l'expression des gènes impliqués dans l'utilisation du nitrate, permettant ainsi de coordonner le métabolisme de l'azote avec la photosynthèse et le métabolisme carboné.

Chez *A. thaliana*, le nitrate induit l'expression des gènes de transport de nitrate *NRT1.1/NPF6.3*, *NRT2.1* ainsi que les gènes *NIA1*, *NIA2* et *NII* codant respectivement pour des isoformes de nitrate réductase et pour la nitrite réductase. De façon plus générale, des études transcriptomiques ont mis en évidence que le nitrate induit non seulement des gènes nécessaires à son absorption et à sa réduction, à l'assimilation de l'ammonium, mais aussi des gènes impliqués dans la glycolyse, la voie oxydative des pentoses et dans la synthèse des acides organiques (Crawford, 1995; Scheible *et al*, 1997a, 2000) et réprime le métabolisme des

phénylpropanoïdes (Fritz *et al*, 2006). Des études pharmacologiques (utilisation d'inhibiteurs de synthèse protéique), génétiques et physiologiques (utilisation de mutants incapables d'assimiler le nitrate), cinétiques (effets du nitrate à court terme) ou de doses de nitrate ont permis de montrer que cette régulation par le nitrate est due au nitrate en tant que tel et non à un effet nutritionnel (lié à son assimilation en azote organique) (Medici & Krouk, 2014 pour revue). Ces résultats indiquent que le nitrate est donc une molécule signal qui est rapidement (en l'espace de quelques minutes; Krouk *et al*, 2010) et spécifiquement détectée par les cellules des plantes et que la voie de signalisation du nitrate ajuste l'expression d'un grand nombre de gènes pour adapter et coordonner le métabolisme des cellules et des organes, ainsi que le développement et la croissance des plantes à la disponibilité en nitrate.

Le nitrate régule aussi de nombreux processus non pas en tant que signal mais par sa métabolisation en tant que source d'azote pour les plantes. Les acides aminés issus de la réduction du nitrate, en particulier la glutamine, ont été proposés comme des indicateurs endogènes du statut azoté de la plante et répriment l'expression de gènes de transport du nitrate, de l'ammonium et de gènes d'assimilation du nitrate par feedback négatif (Nunes-Nesi *et al*, 2010 pour revue). Pour les gènes impliqués dans le transport du nitrate, des expériences de « split-roots » montrent que cette régulation par le statut azoté de la plante intervient de façon systémique.

Chez *M. truncatula*, des analyses transcriptomiques ont confirmé la similitude des réponses moléculaires au nitrate avec celles d'*A. thaliana* et établi que l'acquisition de l'azote (sous forme NH_4^+ , NO_3^- et N_2) est aussi régulée par le statut azoté de la plante (Ruffel *et al*, 2008).

Pour l'ammonium, il n'est pas clair s'il agit comme le nitrate aussi en tant que molécule signal (Nacry *et al*, 2013). En effet, l'ammonium induit l'expression de certains transporteurs AMT1 chez le riz et d'autres espèces végétales. Cependant, cet effet est aussi observé avec la glutamine, ce qui suggère que ce sont des métabolites dérivés de l'assimilation de l'ammonium (la glutamine) et non l'ammonium en tant que tel qui participent à la régulation de ces transporteurs (Sonoda *et al*, 2003). Certains gènes de la famille *AMT1* chez *A. thaliana* sont au contraire induits par la carence azotée et réprimés par la glutamine. Au niveau post-traductionnel, l'inhibition du transporteur AMT1.1 par l'ammonium par contre semble faire intervenir une perception de l'ammonium en tant que signal (Lanquar *et al*, 2009).

	Changements développementaux	Changements métaboliques
A	Croissance préférentielle des racines par rapport aux parties aériennes	Augmentation du transport de NO_3^- et NH_4^+ et remobilisation de l'azote
	Accélération de la sénescence	Diminution de l'accumulation de la chlorophylle
		Augmentation de l'accumulation des anthocyanes
		Diminution des pools de composés contenant de l'azote (acides aminés, protéines)
		Augmentation des pools de composés riches en carbone (amidon, acides organiques, composés phénoliques)

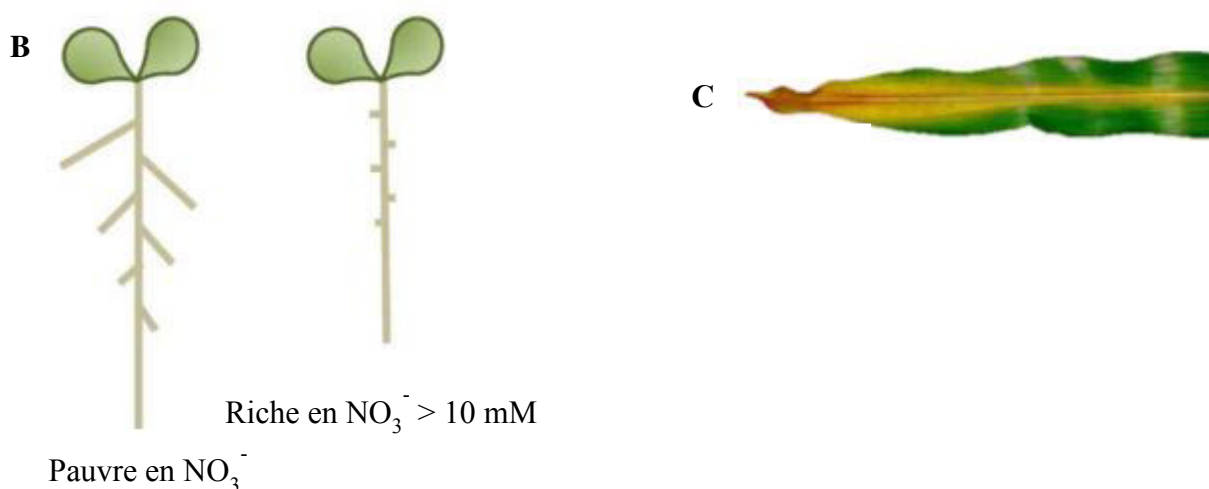


Figure I.11: Réponse de la plante à la carence azotée

(A) Des changements développementaux et métaboliques sont observés au cours d'une carence azotée. (B) La carence azotée favorise le développement de la racine primaire et celui des racines secondaires. En condition d'excès en nitrate, la croissance de la racine primaire et celle des racines secondaires sont réduites. (C) La carence azotée accélère la sénescence.

Extrait de The Plant Cell, 2014 American Society of Plant Biologists

Par ailleurs, le nitrite et certains acides aminés tels que la glutamine et le glutamate ont aussi été proposés comme molécules signal contrôlant différents processus physiologiques chez les plantes comme le développement racinaire, les réponses de défense et le métabolisme des plantes (Wang *et al*, 2007b; Forde, 2014; Kan *et al*, 2015).

b. Effet de la carence azotée chez les plantes

L'azote est le nutriment le plus important puisé par les plantes dans le sol, puisqu'après l'eau, il est le principal facteur limitant la croissance des plantes (Vitousek & Howarth, 1991). Ces dernières ont donc une dépendance fondamentale vis-à-vis de cet élément minéral. Cependant, l'azote peut se retrouver en quantité insuffisante entraînant une carence azotée chez la plante. La déficience en azote peut avoir plusieurs impacts sur la plante. En effet, des changements de l'architecture de la plante sont observés (Figure I.11) tels qu'une inhibition de la croissance des parties aériennes (Zhao *et al*, 2005), une croissance préférentielle des racines (Scheible *et al*, 1997b; Stitt & Krapp, 1999), une augmentation de l'élongation et de la densité des racines latérales (Forde, 2002, 2014), une accélération de la sénescence due à une remobilisation de l'azote des feuilles vers les racines (Thomas & Villiers, 1996; Kato *et al*, 2005) (Figure I.11) et une floraison avancée (Vidal *et al*, 2014).

Des impacts de la carence au niveau métabolique sont également observables. Au niveau des métabolites primaires, les différentes études montrent: une large diminution des niveaux de glutamine et du rapport glutamine/glutamate (Foyer *et al*, 2003), une diminution des teneurs en acides aminés totaux dans les feuilles, une augmentation des teneurs en acides aminés mineurs, une baisse des concentrations de protéines (Scheible *et al*, 1997a, 2000), une diminution des niveaux de chlorophylle et une augmentation de l'amidon (Zhao *et al*, 2005). Au niveau des métabolites secondaires, on observe une synthèse de phénylpropanoïdes corrélée à l'induction des gènes impliqués dans le métabolisme de ces derniers (comme la PAL par exemple) (Fritz *et al*, 2006) et une augmentation de la synthèse d'anthocyanes dans les feuilles (Martin *et al*, 2002) corrélée à l'induction des gènes *MYB* et *BHLH* importants pour l'accumulation des anthocyanes et autres flavonoïdes (Lea *et al*, 2006). De plus, le statut antioxydant des plantes est perturbé lors d'une carence en azote. En effet, une diminution de l'activité de la superoxyde dismutase est observée dans les feuilles d'une plante carencée (Polesskaya *et al*, 2004). Quelques heures de carence azotée conduisent à une augmentation de la production de ROS dans les racines d'*A. thaliana* (Shin *et al*, 2005).

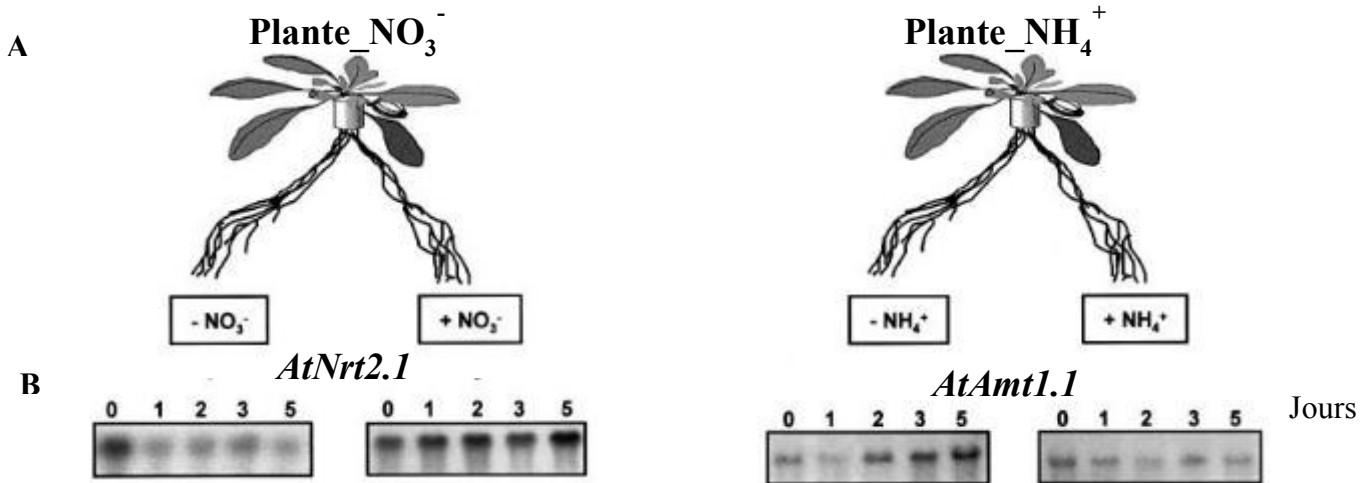


Figure I.12: Expression des transporteurs de nitrate (*AtNRT2.1*) et d'ammonium (*AtAmt1.1*) dans les racines d'*A. thaliana*

Les plantes NO_3^- sont cultivées pendant 6 semaines en présence d'1 mM de NO_3^- et les plantes NH_4^+ sont cultivées pendant 5 semaines avec 1 mM de NO_3^- et pendant une semaine avec 1 mM de NH_4^+ . **(A)** Culture des racines d'*A. thaliana* en système split-roots pendant 5 jours. La moitié des racines sont en présence de 1 mM de NO_3^- ou 1 mM de NH_4^+ et l'autre moitié en absence d'azote. **(B)** Analyses cinétiques par northern blot du changement des niveaux des transcrits de *AtNrt2.1* et *AtAmt1.1* dans les racines cultivées en présence et en absence d'azote.

Adapté de Gansel et al, 2001

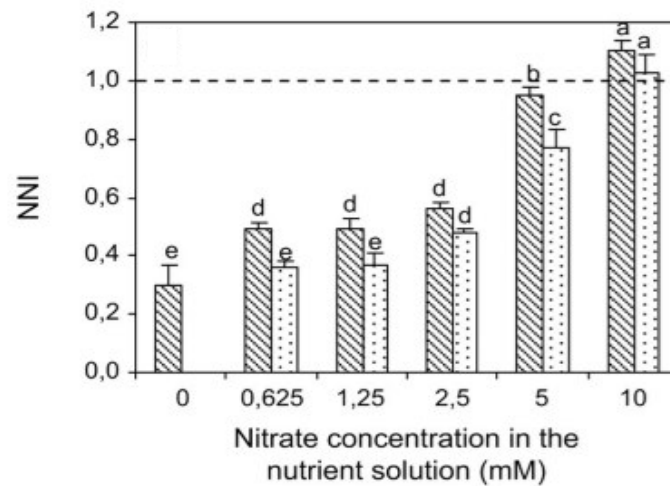


Figure I.13: Impact de la concentration en nitrate sur l'indice de nutrition azotée (NNI)

L'expérience a été réalisée sur le génotype A17 de *M. truncatula* inoculé par *Rhizobium meliloti* (histogramme haché) ou Nod- (histogramme en points). Le NNI augmente progressivement avec les niveaux de concentrations en nitrate. En présence de la symbiose, à 5 et 10 mM de nitrate, NNI est égal à 0,95 et 1,1, respectivement, démontrant que la nutrition azotée est optimale. Cependant, quand les concentrations en nitrate sont inférieures à 5 mM, NNI reste inférieur à 1 montrant ainsi que l'assimilation de l'azote est insuffisante malgré la fixation symbiotique.

Extrait de Moreau et al, 2008

Par ailleurs, une régulation systémique de la carence sur le transport de l'azote a lieu dans les plantes. En effet, chez *A. thaliana*, des expériences de split-roots où une partie des racines d'une plante est soumise à une carence en azote alors que l'autre partie continue à être alimentée en azote (Figure I.12) montrent que la plante s'adapte à la carence locale en azote en augmentant l'expression de gènes de transport du nitrate dans la partie racinaire distale exposée à un milieu riche en nitrate. Ce phénomène de compensation systémique de la carence en azote est observé pour le nitrate mais pas pour l'ammonium (Gansel *et al*, 2001). Récemment, dans cette signalisation systémique, le rôle de petits peptides impliqués dans la signalisation, appartenant à la famille des gènes CEP (*C-terminally encoded peptide*) qui sont régulés par une limitation azotée (Delay *et al*, 2013), a été mis en évidence.

Chez les légumineuses, la carence azotée va favoriser la symbiose rhizobienne. Comme mentionné précédemment, chez *M. truncatula*, la symbiose ne permet pas de couvrir les besoins azotés de la plante. En effet, lorsque les plantes de *M. truncatula* sont inoculées par *Rhizobium meliloti* et cultivées sur un milieu où la concentration en nitrate est inférieure à 5 mM, l'indice de nutrition azoté (NNI) qui mesure le statut azoté de la plante est inférieur à 1 suggérant ainsi que la fixation symbiotique est insuffisante pour satisfaire l'exigence azotée de la plante (Figure I.13) (Moreau *et al*, 2008).

Comme chez *A. thaliana*, des expériences de split-roots ont montré qu'il existait chez *M. truncatula* un phénomène de compensation systémique de la carence en azote imposée localement à une partie des racines par augmentation de l'acquisition de l'azote dans les racines distales et que sur des temps courts (quelques jours), ce phénomène ne s'observait que pour le nitrate et pas pour l'ammonium et N₂ (Ruffel *et al*, 2008). Dans des expériences à plus long terme (Jeudy *et al*, 2010), la carence en N₂ locale conduit à une stimulation de la croissance des nodosités existantes et la formation de nouvelles nodosités permettant de compenser la carence locale en N₂. Une régulation locale et une régulation systémique liée au statut azoté s'exercent sur le développement *de novo* de la nodosité.

Chez *M. truncatula*, plus d'une dizaine de gènes CEP ont été identifiés dont une majorité est induite par la limitation en azote. Le peptide MtCEP1 inhibe le développement des racines latérales et stimule la formation de nodosités (Imin *et al*, 2013) tout en rendant la nodulation moins sensible à la répression par le nitrate.

1.5 Implication de l'azote dans les défenses immunitaires

a. Fertilisation azotée et maladies

De nombreuses études agronomiques indiquent que la disponibilité en azote influence la résistance des plantes aux maladies (Huber & Watson, 1974; Dordas, 2008). Cependant, cet effet est très variable selon les cas et pourrait en partie être corrélé au mode de vie de l'agent pathogène. En effet, la fertilisation azotée augmente la sensibilité des plantes aux agents pathogènes biotrophes alors qu'elle diminue chez les plantes infectées par des agents pathogènes nécrotrophes (Snoeijers *et al*, 2000; Mittelstrass, 2006; Dordas, 2008). Chez la pomme de terre par exemple, des résultats contradictoires sont observées entre *Phytophthora infestans* (hémibiotrophe) et *Alternaria solani* (nécrotrophe). En effet, la fertilisation azotée augmente la résistance des plantes à *A. solani* alors que les plantes deviennent plus sensibles à *P. infestans*. De plus, il a été montré qu'en limitation azotée, *A. thaliana* est plus sensible à la bactérie *Erwinia amylovora* alors que cette même limitation provoque une augmentation de la résistance de la plante au champignon nécrotrophe *B. cinerea* (Fagard *et al*, 2014). D'autres facteurs entrent en jeu concernant le rôle de l'azote sur les maladies et pourraient expliquer en partie les résultats contradictoires observés dans la littérature. Lecompte *et al*, (2010) ont montré que l'impact de la disponibilité en azote sur la sensibilité de la plante à *B. cinerea* était dépendant de la virulence de la souche utilisée. Les effets positifs ou négatifs de l'azote sur le développement des maladies sont également observés au niveau intraspécifique comme chez le riz. Dans ce cas, les différences observées de susceptibilité au champignon pathogène *Magnaporthe oryzae* pourraient être en partie expliquées par la variabilité de l'efficacité d'utilisation de l'azote (Ballini *et al*, 2013). Tous ces résultats indiquent que l'impact de la fertilisation azotée sur la maladie des plantes est complexe et nécessite une étude plus poussée des mécanismes impliqués dans la modulation de la résistance par l'azote.

b. Effet de l'azote sur les réponses de défense des plantes

La fertilisation azotée peut affecter les interactions plante-agent pathogène en perturbant les réponses de défense de la plante. Suite à l'attaque de la plante par un microorganisme, celle-ci diminue temporairement l'investissement énergétique alloué à la croissance au profit de la défense (Vos *et al*, 2013). Ce changement dans le métabolisme est appelé compromis entre la croissance et la défense (Walters & Heil, 2007) et serait lié à la limitation des ressources de la plante entraînant une priorisation de leur utilisation soit pour les défenses soit pour la croissance

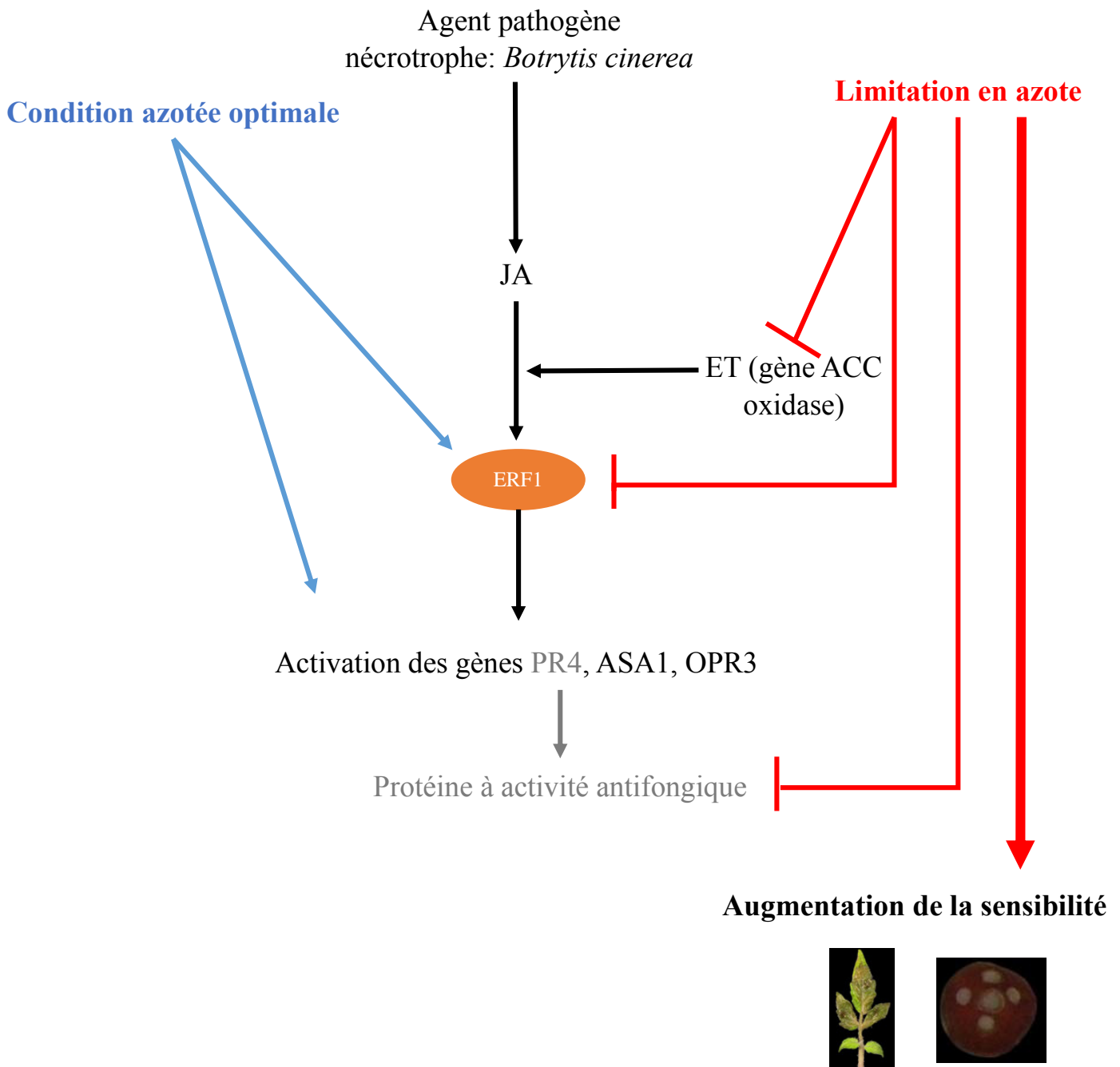


Figure I.14 : La carence azotée entraîne une augmentation de la sensibilité de la tomate à l'agent pathogène nécrotrophe *Botrytis cinerea*

En condition limitante en azote:

- le gène ACC oxidase, impliqué dans la synthèse de l'éthylène, ainsi que le facteur de transcription ERF1 (Ethylene Response Factor), sont réprimés,
- les gènes anthranilate synthase 1 (ASA1), 2-oxophytodienoate réductase 3 (OPR3), et pathogenesis-related 4 (PR4) sont également réprimés,
- la plante devient plus sensible à *B. cinerea*.

Adapté de Vega et al, 2015

selon les circonstances. Il peut être illustré, par exemple, par l'inhibition de la croissance lorsque les plantes sont traitées avec le PAMP Flg22, un peptide de la flagelline (Chinchilla *et al.*, 2007). Un lien important existe donc entre nutrition et défense. En effet, des études utilisant des traceurs de carbone et d'azote ont montré que les flux métaboliques étaient altérés lors de la réponse immunitaire pour permettre la synthèse de composés de défense, suggérant ainsi une redirection du métabolisme (Engelsdorf *et al.*, 2013; Ullmann-Zeunert *et al.*, 2013). Une carence azotée chez le tabac entraîne une augmentation des phénylpropanoïdes liée à l'induction d'un grand nombre de gènes impliqués dans les étapes précoces de la biosynthèse de ces composés (Fritz *et al.*, 2006). Cependant, la balance croissance/défense n'est pas une règle générale et la synthèse de certains composés de défense peut être, au contraire, stimulée dans des conditions où la croissance de la plante est favorisée (Massad *et al.*, 2012).

Les mécanismes régissant l'équilibre entre croissance et développement sont fortement dépendants des phytohormones (Huot *et al.*, 2014). En effet, comme décrit précédemment, les phytohormones représentent des molécules de signalisation essentielles pour les réponses immunitaires (*voir I.1 b*, Pieterse *et al.*, 2012) et la croissance. Une influence réciproque existe entre le SA et le JA, phytohormones jouant un rôle essentiel dans les réponses de défense, et l'auxine, les brassinostéroïdes et les gibbérellines, phytohormones impliquées dans la croissance. Par exemple, le SA provoque une répression globale des gènes liés à l'auxine (Wang *et al.*, 2007a). Réciproquement, il a été montré qu'un fort signal auxine affectait les défenses médiées par le SA (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). De façon intéressante, une carence azotée (Yaeno & Iba, 2008) ou une baisse d'activité nitrate réductase liée à des défauts d'activation de la NR par sumoylation (Park *et al.*, 2011) augmente les teneurs en SA des plantes ainsi que la résistance à des agents pathogènes bactériens. Les effets de l'azote sur les teneurs en SA semblent être régulés en partie par le gène BAH1/NLA, codant pour ubiquitine ligase E3, qui contrôlerait la production de SA en réprimant les niveaux basaux et induits de cette hormone (Yaeno & Iba, 2008). D'autres études ont montré que la synthèse d'ET peut être influencée par la disponibilité en azote (Khan *et al.*, 2015 pour revue). Récemment, une étude transcriptomique chez la tomate infectée par *B. cinerea* en limitation azotée, conduisant à une augmentation de la sensibilité de la plante, a mis en évidence le rôle de l'ET et du JA. En effet, le facteur de transcription ERF1, associé à la réponse JA/ET, est induit en réponse à *B. cinerea* en condition azotée suffisante alors qu'il est réprimé en limitation en azote (Vega *et al.*, 2015). Ces phytohormones semblent donc jouer un rôle clé dans le métabolisme azoté et dans la défense contre *B. cinerea* chez la tomate (Figure I.14).

c. Effet de l'azote sur la virulence de l'agent pathogène

Plusieurs processus importants pour l'infection sont activés lorsque certains agents pathogènes sont cultivés sous limitation en azote *in vitro* ou sur des sources d'azote peu favorables. Par exemple, Horst *et al*, (2012) ont montré que le développement de la forme filamenteuse du basidiomycète *Ustilago maydis*, qui est nécessaire pour l'infection, est stimulé par une carence azotée. L'expression des effecteurs impliqués dans la virulence de certains champignons ou oomycètes peut être également augmentée sous limitation azotée (Bolton & Thomma, 2008). La source d'azote utilisée dans le milieu va avoir un impact sur la virulence de l'agent pathogène. En effet, lorsque la source azotée est de l'ammonium, les espèces fongiques *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum* et *Magnaporthe oryzae* n'arrivent pas à pénétrer la membrane, ce qui s'expliquerait par la répression de facteur de virulence provoquée par l'ammonium (López-Berges *et al*, 2010). Toutefois, l'effet de la source azotée sur la virulence dépend de l'agent pathogène. En effet, en condition pauvre en ammonium, la production de pectinases au cours de l'infection par *Erwinia chrysanthemi* est réprimée (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al*, 1992).

De façon intéressante, la régulation de la virulence de l'agent pathogène par l'azote semble faire intervenir dans certains cas des régulateurs généraux du métabolisme azoté qui sont bien connus chez les organismes modèles *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans* et *Neurospora crassa* (Marzluf, 1997). Différentes études ont montré que les sources d'azote préférentiellement assimilables sont l'ammonium, la glutamine et le glutamate. Mais les sources secondaires telles que le nitrate, les acides aminés et les protéines peuvent être utilisées lorsque les sources primaires ne sont pas disponibles. L'utilisation des sources azotées secondaires est alors hautement contrôlée par des régulateurs transcriptionnels qui induisent l'expression de gènes codant les enzymes nécessaires pour métaboliser ces sources d'azote. Par exemple, les facteurs de transcription *AreA/Nit2* appartenant à la famille des facteurs de transcription GATA (Caddick *et al*, 1986; Stewart & Vollmer, 1986), interviennent dans la régulation des gènes impliqués dans le transport et le catabolisme des sources azotées secondaires (Bolton & Thomma, 2008). Un mutant déficient *areA*, chez plusieurs espèces de champignons, montre une pathogénicité réduite, indiquant que la perception d'un environnement limité en azote par l'agent pathogène dans la plante peut contribuer à sa virulence et à son adaptation métabolique (Snoeiijers *et al*, 2000)

La protéine kinase TOR (target of rapamycin) est connue pour réguler la croissance cellulaire des eucaryotes en réponse à la disponibilité en nutriments et en particulier l'azote (De

Virgilio & Loewith, 2006; Rohde *et al*, 2008). Chez *Fusarium oxysporum*, il a été montré que des fonctions de virulence sont réprimées par des sources d'azote favorables (la glutamine) qui exerceraient leurs effets en activant TOR (López-Berges *et al*, 2010).

d. Rôle des transporteurs d'azote dans l'interaction plante-agent pathogène

Comme précisé précédemment (*partie 1.3 b*), certaines protéines de la famille des transporteurs NRT2 et NPF permettent l'absorption du nitrate. La perception du nitrate et son transport ont un impact sur les réactions de défense. Des gènes NRT2 ont été identifiés comme étant impliqués dans les réponses de défense des plantes. Camañes *et al*, (2012a) ont montré que l'altération d'un gène de la famille NRT2 diminue la sensibilité de la plante à la bactérie *Pseudomonas syringae*. Plusieurs approches ont permis de mieux comprendre les mécanismes responsables de ce phénomène. Tout d'abord, l'utilisation du double mutant *nrt2.1 sid2.1*, affecté dans la voie de biosynthèse du SA, a permis de montrer que le priming de la voie de signalisation du SA était nécessaire pour la réduction de sensibilité liée à la perte de fonction NRT2.1. De plus, le mutant *nrt2.1* montre une perturbation de la sensibilité induite par la coronatine, un effecteur de *P. syringae* (Camañes *et al*, 2012b). Cette modification de la résistance liée à une mutation dans NRT2.1 n'est donc pas seulement due au priming de la voie SA mais également à une sensibilité plus réduite à la coronatine, corrélée à une perte de la production d'H₂O₂ induite par cet effecteur. Enfin, le statut métabolique du mutant avant l'infection (accumulation de niveaux plus élevés d'acides aminés aromatiques et de phénylpropanoïdes) pourrait contribuer à la diminution de la sensibilité. Ces résultats sont confortés par l'analyse transcriptomique qui montre que les gènes impliqués dans la synthèse de SA et des acides aminés aromatiques sont différenciellement exprimés entre le mutant *nrt2.1* et la plante sauvage (Camañes *et al*, 2012b). Ce mutant est également plus résistant au champignon nécrotrophe *Plectosphaerella cucumerina*, ce qui pourrait suggérer que ce mécanisme est commun aux interactions plantes agents pathogènes (Gamir *et al*, 2014).

Le gène *NRT2.6* joue un rôle dans la résistance d'*A. thaliana* à la bactérie *Erwinia amylovora*. En effet, le mutant invalidé *nrt2.6* devient plus sensible à cette bactérie. Cette augmentation de sensibilité est corrélée avec la diminution de l'accumulation d'H₂O₂ (Dechornat *et al*, 2012). Mais les défauts d'accumulation d'H₂O₂ chez ce mutant ne sont pas seulement mis en évidence lors de l'attaque de l'agent pathogène mais également révélés lorsque les plantes sont traitées avec un herbicide suggérant un rôle de *NRT2.6* dans la production d'H₂O₂, en réponse à des stress biotiques et abiotiques.

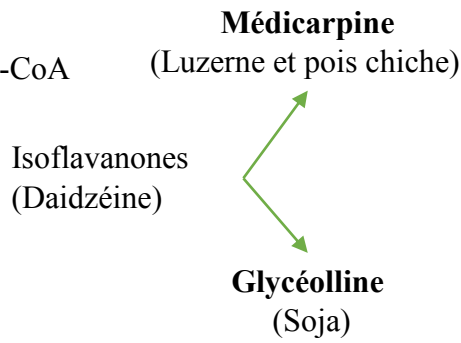
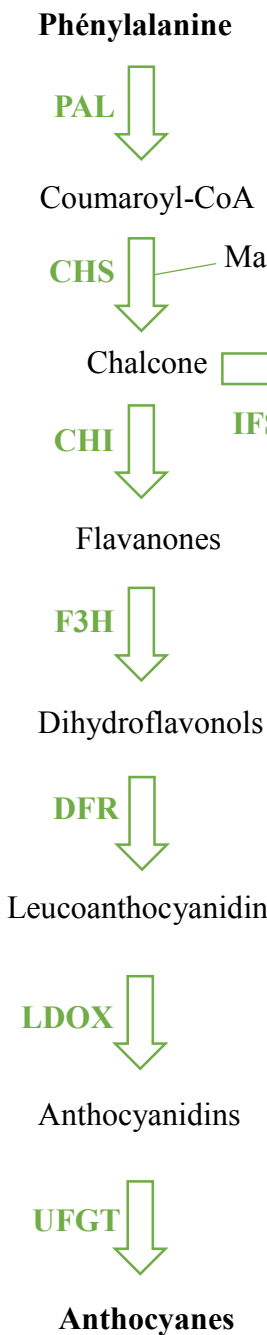


Figure I.15: Biosynthèse des anthocyanes et des phytoalexines issues de la phénylalanine

La phénylalanine ammonia lyase (PAL) est une enzyme clé de la voie des phénylpropanoïdes qui peut conduire à de nombreuses classes de composés. Les enzymes nécessaires à la synthèse des flavonoïdes sont: CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomérase; F3H, flavanone-3β-hydroxylase; DFR, dihydroflavonol-4-réductase; LDOX, leucoanthocyanidine dioxygénase. Les enzymes spécifiques des différents composés flavonoïdes sont: UFGT, UDP-glycolyse:flavonoïde-3-O-glycosyl transférase pour la synthèse des anthocyanes. L'isoflavone synthase (IFS) permet la synthèse d'isoflavones précurseurs des phytoalexines.

Adapté de Yu et al, 2000;

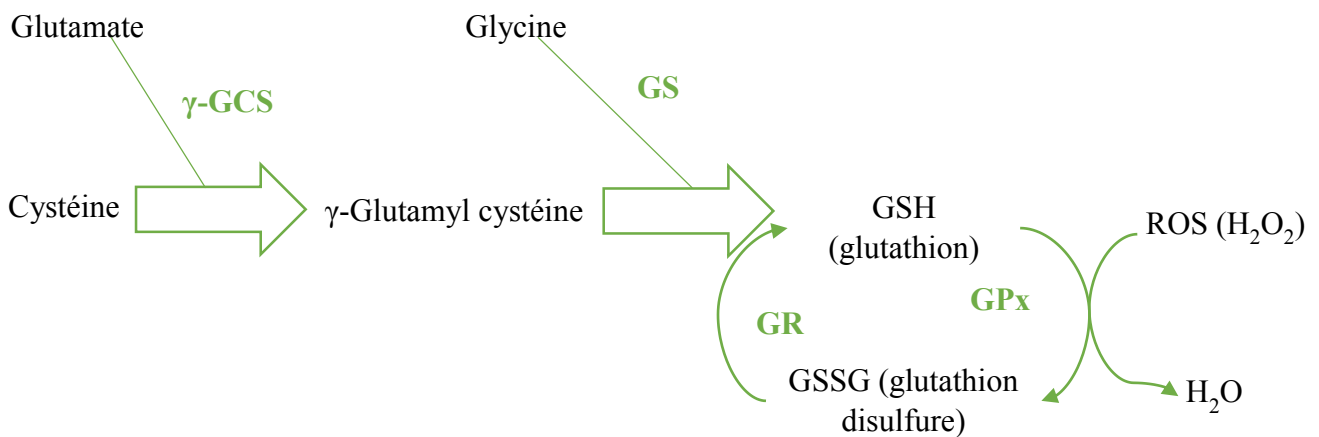


Figure I.16 : Synthèse du glutathion, un antioxydant lors de la formation de ROS

γ-GCS, γ-Glutamyl cystéine synthétase; **GS**, glutathion synthétase; **GR**, glutathion réductase; **GPx**, glutathion peroxidase; **DHAR**, déhydroascorbate réductase.

Adapté de Liu et al, 2015

Le lien moléculaire entre *NRT2.6* et la production de ROS n'a pas encore été mis en évidence.

D'autre part, le mutant perte de fonction de *amt1.1*, transporteur d'ammonium à haute affinité, entraîne une réduction de sensibilité à *P. syringae* et à *Plectosphaerella cucumerina*. Les mécanismes aboutissant à la résistance de ce mutant aux agents pathogènes semblent être dépendants du mode de vie de ces derniers. En effet, une carence azotée provoque une augmentation de la sensibilité d'*amt1.1* à *P. syringae* alors qu'aucun effet de la carence n'est observé pour *P. cucumerina*. Les modifications métaboliques d'*amt1.1* observées lors de l'infection par *P. syringae*, et qui sont corrélées avec la diminution de la sensibilité de la plante hôte, sont limitées à la voie des phénylpropanoïdes, alors que la diversité des réponses métaboliques de ce mutant contre *P. cucumerina* est beaucoup plus large, mettant en jeu des niveaux plus élevés de callose et de camalexine. Ces résultats indiquent que AMT1.1 pourrait jouer un double rôle, étant impliqué à la fois dans l'absorption de l'azote et comme régulateur négatif des réponses immunitaires des plantes (Pastor *et al*, 2014).

e. Stress biotique et métabolisme des acides aminés

De nombreuses études démontrent la modification des concentrations de certains acides aminés suite à l'infection par un microorganisme, mais aucune d'entre elles ne permet de donner une règle claire de l'effet de cette modification lors de l'interaction. Par exemple, la proline est accumulée dans les feuilles d'*A. thaliana* en réponse à *P. syringae* (Fabro *et al*, 2004). L'accumulation de lysine et d'asparagine est observée dans les feuilles malades d'aubergine suite à l'infection par la bactérie *Candidatus Phytoplasma asteris* alors que les niveaux d'histidine et d'arginine sont diminués (Das & Mitra, 1993).

- Les acides aminés, des précurseurs des molécules de défense:

Les molécules impliquées dans la défense des plantes sont dépendantes du métabolisme des acides aminés. Les phytoalexines et les anthocyanes, par exemple, sont issues de la phénylalanine (Figure I.15). L'arginine peut servir de précurseur pour former du NO et des polyamines (Winter *et al*, 2015, pour revue). Les antioxydants, comme le glutathion, dérivent des acides aminés tels que la cystéine, le glutamate et la glycine (Figure I.16). Dans les nodosités, l'inhibition de la GS par le NO permettrait au glutamate d'être utilisé pour la synthèse de glutathion, permettant ainsi de neutraliser les effets délétères des espèces réactives de l'azote (Melo *et al*, 2011).

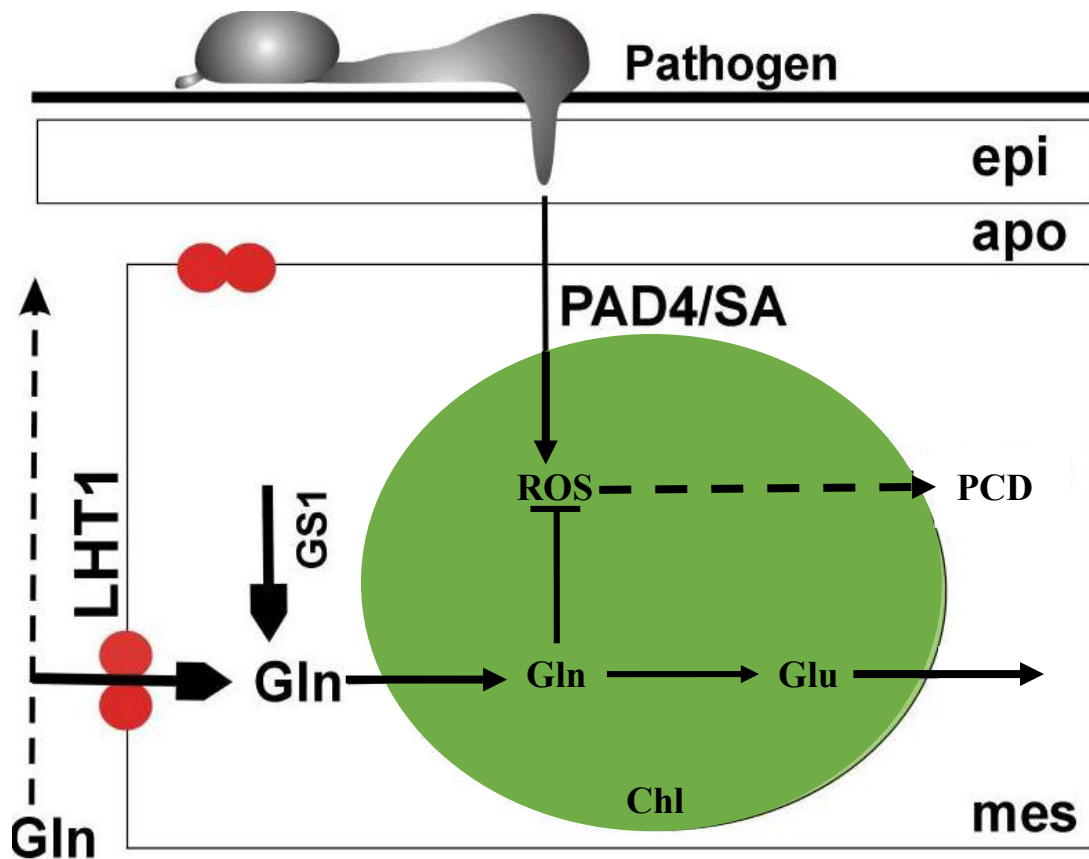


Figure I.17: Interconnexions entre le métabolisme glutamine, redox et SA

Les cercles rouges correspondent au rôle dynamique de LHT1 et de son substrat, la glutamine (Gln) qui supprime la mort cellulaire au cours de l'infection par un agent pathogène. Dans le chloroplaste, la glutamine inhibe la production de ROS qui induit la mort cellulaire dépendante de la voie SA (par l'activation de PAD4). **epi**, épiderme de la cellule; **apo**, apoplaste; **mes**, mésophylle; **chl**, chloroplaste.

Adapté de Liu et al, 2011

Récemment, des liens entre l'accumulation d'acides aminés et le statut redox ont été mis en évidence. Liu *et al.*, (2010) ont montré le rôle du transporteur LHT1 (lysine histidine transporteur 1) dans la résistance d'*A. thaliana* à de nombreux agents pathogènes. En effet, un mutant perte de fonction *lht1* améliore la résistance à *Pseudomonas syringae*, *Colletotrichum higginsianum* et *Erysiphe cichoracearum* liée à une activation de la voie de signalisation du SA et une augmentation de production de NO/H₂O₂ dans les feuilles. Une diminution des concentrations de tous les acides aminés, en particulier de la glutamine, alanine et proline, est observée dans les feuilles de ce mutant. Cet effet métabolique est corrélé avec le fait que LHT1 serait impliqué dans le transport de l'alanine et de la glutamine (Svennerstam *et al.*, 2007). L'utilisation d'un inhibiteur de la GS et d'un mutant hyper-sécréteur de glutamine a permis de montrer une corrélation entre la diminution des quantités de glutamine et l'activation des réponses de défense (Liu *et al.*, 2010). En particulier, la glutamine, qui est l'un des principaux substrats de LHT1, a un effet inhibiteur sur l'accumulation d'H₂O₂. Les auteurs ont alors suggéré que le métabolisme azoté, et en particulier le métabolisme de la glutamine, pouvait moduler les réponses de défense des plantes en jouant sur le statut redox (Figure I.17).

- Adaptation de l'agent pathogène et manipulation du métabolisme de l'hôte:

Les acides aminés préférentiellement utilisés par les agents pathogènes sont souvent ceux accumulés spécifiquement dans la plante lors de la maladie. Plusieurs explications à cela sont possibles. Les microorganismes pourraient s'être adaptés pour utiliser les acides aminés synthétisés par la plante. La coévolution entre la plante et l'agent pathogène aurait conduit, dans le cas d'une interaction compatible, à l'adaptation de l'agent pathogène aux ressources nutritionnelles de l'hôte. Le GABA, accumulé lors de l'interaction et participant à la réponse de défense de la plante, est la source préférentielle d'azote de *Cladosporium fulvum* (Solomon & Oliver, 2001, 2002). De même, la bactérie *P. syringae pv. tomato* semble avoir une préférence nutritionnelle pour le GABA, l'aspartate, le glutamate et la glutamine, formes majeures d'acides aminés présentes chez la plante hôte, ce qui suggère une adaptation de l'agent pathogène aux ressources azotées de l'hôte (Rico & Preston, 2008). Le mode de vie de l'agent pathogène peut influencer sa préférence nutritionnelle. En effet, les mutants d'*A. thaliana* *rsp1* et *rsp2*, dont l'homéostasie des acides aminés est perturbée puisqu'ils montrent une sur-accumulation des acides aminés dérivés de l'acide aspartique (méthionine, thréonine et isoleucine), sont moins sensibles à *Hyaloperonospora arabidopsidis*. Cependant, ces deux mutants restent sensibles à un autre agent pathogène biotrophe *Golovinomyces orontii*. De plus, les auteurs ont montré que la thréonine permettait de supprimer la colonisation de *H.*

arabidopsidis mais pas de *G. orontii* (Stuttman *et al*, 2011) suggérant que le statut métabolique de la plante hôte peut influencer la gamme d'agents pathogènes biotrophes. Il est également possible que les agents pathogènes puissent manipuler le métabolisme de l'hôte. Le métabolisme des acides aminés et les interactions plante-agent pathogène semblent donc avoir une connexion plus complexe qu'une simple relation trophique.

- Remobilisation de l'azote dans la plante:

Les modifications des teneurs en acides aminés observée lors de l'infection par un agent pathogène peuvent être liées à un phénomène de remobilisation de l'azote induite lors de l'interaction. En effet, les acides aminés tels que le GABA, la proline, l'arginine, la glutamine et l'asparagine sont impliqués dans le recyclage, la remobilisation et la translocation de l'azote dans les plantes. Des études ont montré, une diminution de l'activité de la GS totale liée à une diminution de la protéine GS2 et une augmentation de la GS1 impliquée dans la remobilisation de l'azote (Pérez-Garcia *et al*, 1998) et l'induction de l'asparagine synthétase chez la tomate infectée par *P. syringae* (Olea *et al*, 2004) suggérant l'activation du transfert de l'ammonium issu du catabolisme des protéines vers la production d'asparagine, forme de mobilisation de l'azote. Les enzymes du métabolisme azoté semblent participer à la signalisation des défenses chez la plante. En effet, certaines données suggèrent que l'induction des gènes de remobilisation de l'azote en réponse à l'infection est modulée en parallèle à des gènes de défense. Tavernier *et al*, (2007) ont montré que l'expression de GS1, induite au cours de l'infection du haricot par *C. lindemuthianum*, est corrélée aux expressions des gènes de défense PAL3 et CHS, suggérant alors le rôle de GS1 dans la défense des plantes. Chez un mutant de tomate, il a été montré de même qu'une sur-activation au temps opportun, du cycle GS/GOGAT et du shunt GABA maintient la viabilité cellulaire et le ralentissement de la sénescence dans le site d'invasion primaire (Seifi *et al*, 2013) permettant ainsi d'augmenter la résistance de la plante à *B. cinerea*.

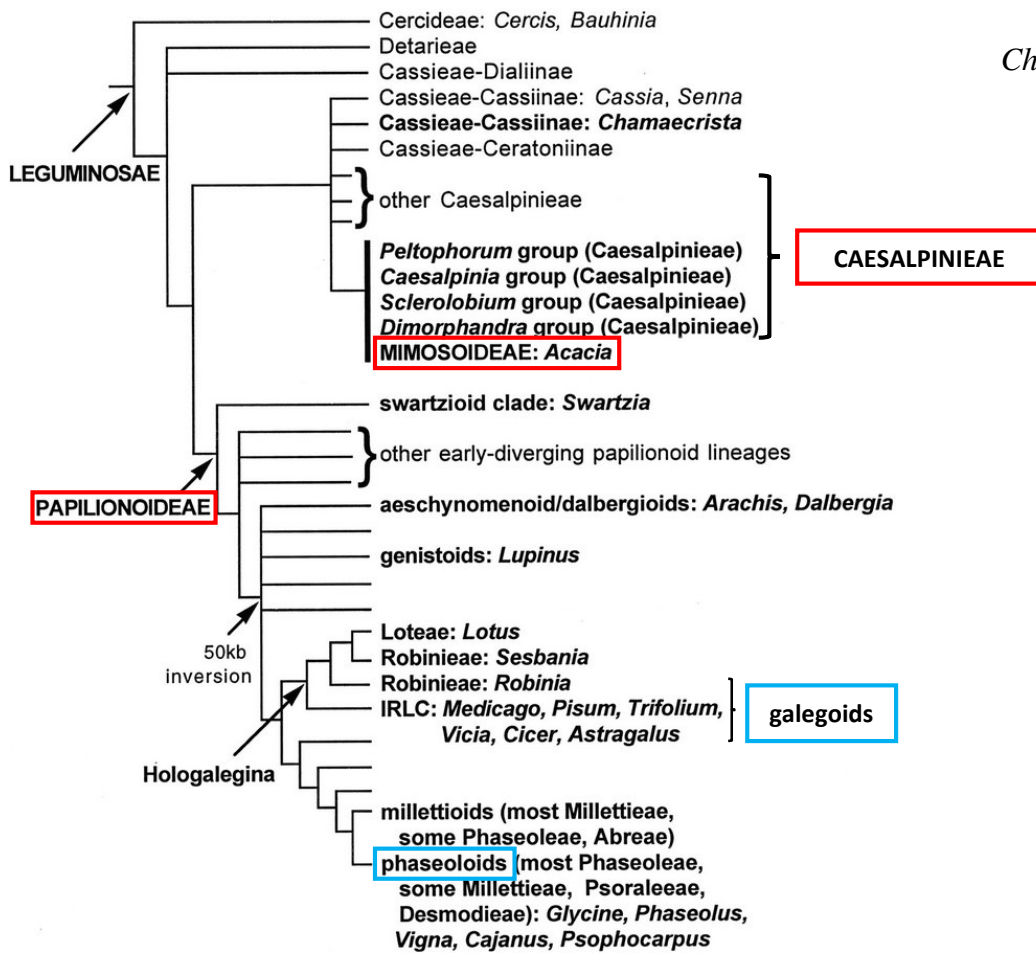


Figure I.18: Relation phylogénétique chez les Fabacées (légumineuses)

Les légumineuses ont été divisées en trois grands groupes de taille inégale sur la base des principaux caractères morphologiques, en particulier les fleurs. Les encadrés rouges correspondent aux trois sous familles: Césalpiniées, Mimosacées et Papilionacées. Les encadrés bleus correspondent aux deux clades majoritaires des Papilionacées: Phaséolides et Galégoïdes.

Adapté de Doyle & Luckow, 2003

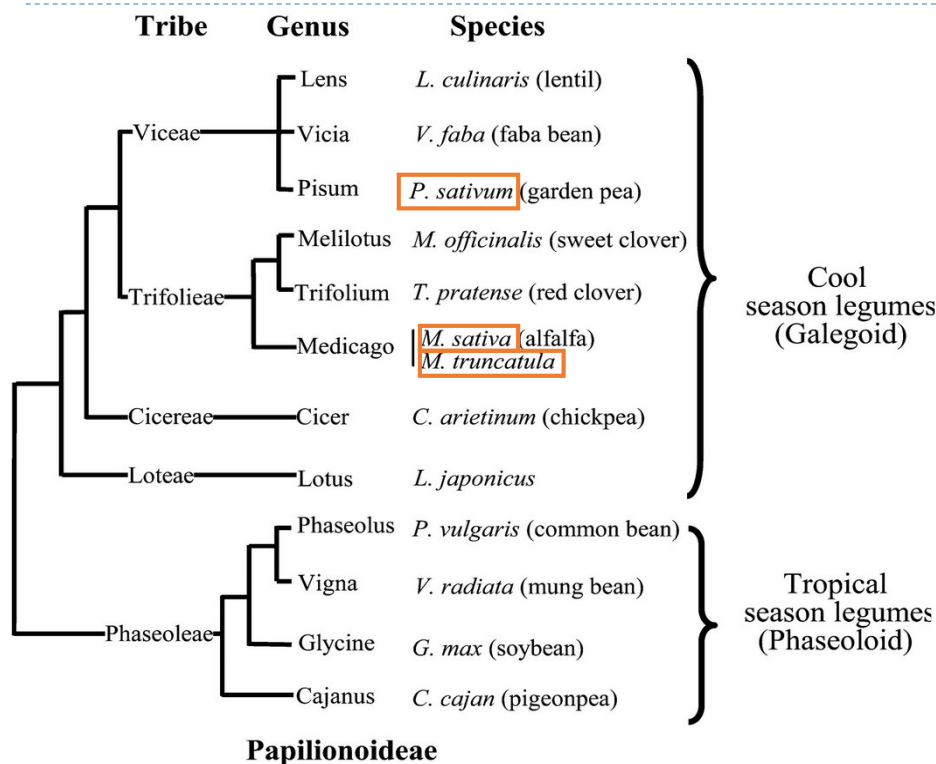


Figure I.19: Relation phylogénétique chez les Papilionacées

Les encadrés orange mettent en évidence la proximité génétique existant entre *M. truncatula* et les espèces cultivées *M. sativa* et *P. sativum*.

Adapté de Zhu et al, 2005

1.6 Pathosystème: *Medicago truncatula*/*Aphanomyces euteiches*

a. La légumineuse *Medicago truncatula*

Les légumineuses sont définies par leur structure florale spécifique, la cosse de leur fruit et surtout leur aptitude (88 % des espèces examinées) à former des symbioses fixatrices d'azote avec les bactéries de la famille des Rhizobiacées (De Faria *et al*, 1989). Les fabacées comptent environ 20 000 espèces (Gepts *et al*, 2005), réparties en 3 sous-familles : les Césalpiniées, les Mimosacées et les Papilionacées (Doyle & Luckow, 2003) (Figure I.18). Elles ont colonisé des milieux variés sur tous les continents. Les légumineuses cultivées appartiennent aux Papilionacées et se répartissent majoritairement en deux clades : les Phaséolides, d'origine tropicale (comme le soja *Glycine max* et le haricot commun *Phaseolus vulgaris* par exemple) et les Galégoïdes d'origine tempérée (comme le pois *Pisum sativum*, la lentille *Lens culinaris*, la luzerne pérenne *Medicago sativa* et la luzerne sauvage, non cultivée, *Medicago truncatula*) (Figure I.18).

Nous avons choisi pour nos travaux *M. truncatula*, l'espèce modèle des légumineuses. D'un point de vue phylogénétique, *M. truncatula* est proche des principales légumineuses cultivées, notamment de *M. sativa* et du pois (Figure I.19) (Zhu *et al*, 2005; Aubert *et al*, 2001) et plusieurs agents pathogènes (champignons, oomycètes, bactéries et virus), qui attaquent les légumineuses cultivées, ont *M. truncatula* comme plante hôte (Tivoli *et al*, 2006; Rose, 2008). Cette légumineuse modèle présente des caractéristiques permettant et facilitant les analyses génétiques et moléculaires. *M. truncatula* est une espèce diploïde ($2n = 16$) et autogame. Son génome, séquencé (Young *et al*, 2011), est considéré comme de petite taille, 550 Mpb soit environ 4 fois celui d'*A. thaliana* (Blondon *et al*, 1994). Des outils génétiques tels que des cartes génétiques et RILs, le développement de ressources pour des études de génétique d'association par séquençage d'environ 200 accessions de *M. truncatula* (projet hapman <http://www.medicagohapmap.org/>) ont été générés par plusieurs laboratoires (Thoquet *et al*, 2002; Choi *et al*, 2004; Julier *et al*, 2007) ainsi que des outils génomiques tels que des bases de données compilant les données d'expression de gènes (<https://genevestigator.com>; <http://mtgea.noble.org/v3/>), des banques de mutants sont disponibles (ex: les mutants d'insertion Tnt1, <http://bioinfo4.noble.org/mutant/database.php>) et *M. truncatula* présente l'avantage d'être transformable par *Agrobacterium rhizogenes* et *tumefaciens* (Boisson-Dernier *et al*, 2001). En particulier les systèmes de culture de racines transformées et de plantes composites générées par transformation avec *A. rhizogenes* permettent d'étudier les interactions

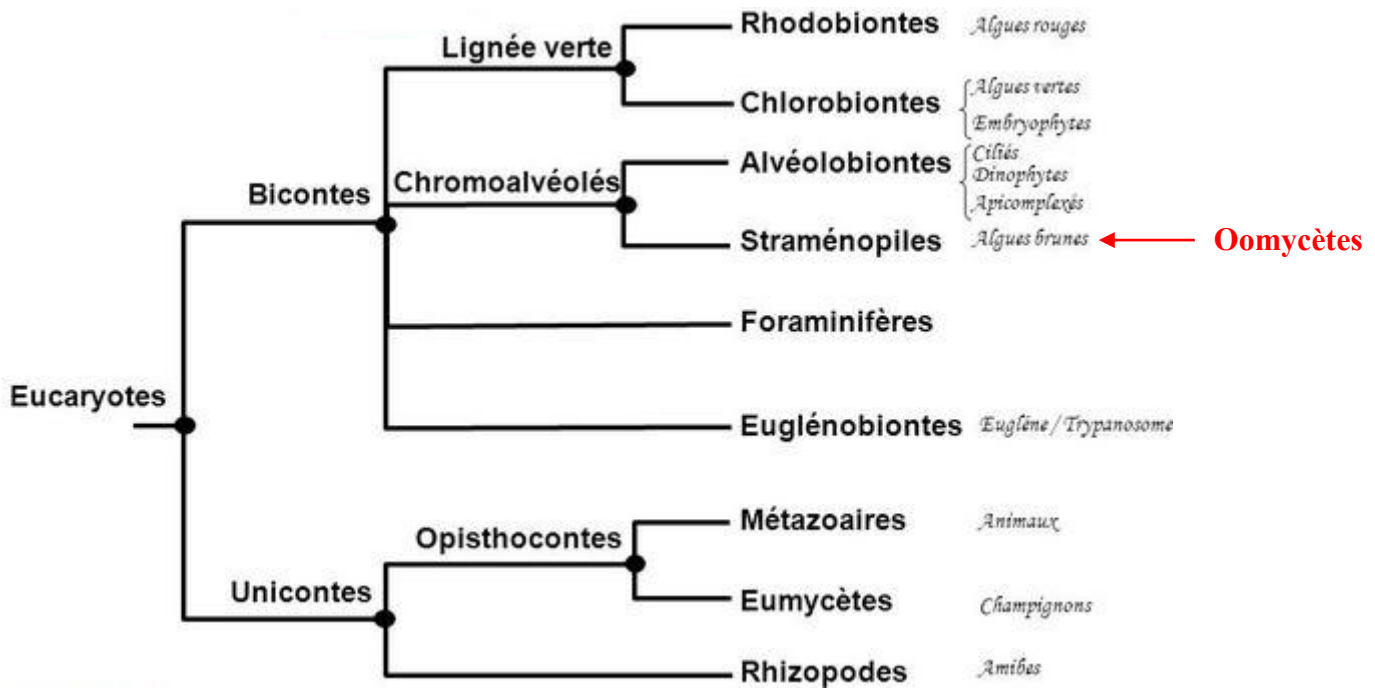


Figure I.20: Arbre phylogénétique des eucaryotes

Adapté de Lecointre & Le Guyader, 2006

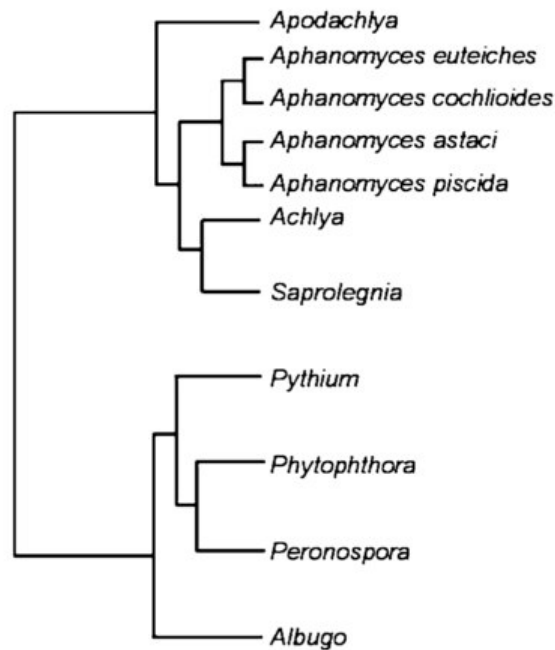


Figure I.21: Arbre phylogénétique des oomycètes

Extrait de Gaulin et al, 2007

symbiotiques mycorhiziennes et agents pathogènes.

b. L'oomycète *Aphanomyces euteiches*

Les oomycètes sont un groupe taxonomique d'organismes eucaryotes filamenteux (Figure I.20) et regroupent plusieurs centaines d'espèces parasites d'animaux ou de plantes. Les espèces d'oomycètes dont l'impact est le plus important au niveau économique sont les espèces phytopathogènes telles que *Phytophthora infestans*, responsable de la grande famine de 1845 à 1846 en Irlande, détruisant la production de pomme de terre; *Plasmopara viticola*, d'origine nord-américaine, qui a fait son apparition en France en 1878 et qui dévasta le vignoble européen; ou encore *Phytophthora citrophthora* qui ravagea les plantations d'agrumes dans tout le bassin Méditerranéen à la même époque. Le genre *Aphanomyces* est pour sa part, selon les espèces, responsable de maladies affectant soit des animaux, comme *Aphanomyces astaci* responsable de la peste de l'écrevisse (Alderman, 1996), soit des végétaux comme *Aphanomyces cochlioides* qui est l'une des causes de pourriture racinaire chez la betterave, ou encore *Aphanomyces euteiches*, responsable de la fonte des semis et de la pourriture racinaire chez différentes légumineuses (Papavizas & Ayers, 1974; Gaulin *et al*, 2007) (Figure I.21). Parmi les espèces susceptibles d'être infectées par *A. euteiches*, on retrouve le pois, la lentille, la luzerne pérenne, la fève (*Vicia faba*), le pois chiche (*Cicer arietinum*) et le lupin (*Lupinus vulgaris*) (Hughes & Grau, 2007; Moussart *et al*, 2008).

• Moyens de lutte contre *A. euteiches* :

A. euteiches est considéré comme l'agent pathogène entraînant le plus de dégâts chez le pois dans de nombreux pays, provoquant une perte pouvant atteindre plus de 80 % des récoltes chaque année. Décrite pour la première fois par Jones & Drechsler, (1925) dans la région du Midwest aux Etats-Unis, la pourriture racinaire du pois s'est ensuite étendue à toutes les régions américaines productrices de pois (Papavizas & Ayers, 1974). En France, la zone majeure où se localise la maladie coïncide avec les zones de production intensive du pois, comme le Bassin Parisien et la partie Ouest de la Bretagne. A ce jour, aucun traitement efficace contre *A. euteiches* n'est disponible. Cependant, il existe des moyens préventifs basés sur l'évaluation du risque infectieux comme le test *Aphanomyces* (Moussart *et al*, 2006). Ce test consiste en l'analyse du « Potentiel infectieux » (PI) d'un ensemble d'échantillons de terre issu d'une parcelle. Il est exprimé par une note d'Indice de Nécrose Racinaire (INR) observé sur les racines d'une plantule de pois dans des conditions de température et d'humidité optimales pour le développement de la maladie, sur une échelle de 0 (Absence d'*A. euteiches*) à 5 (échantillon

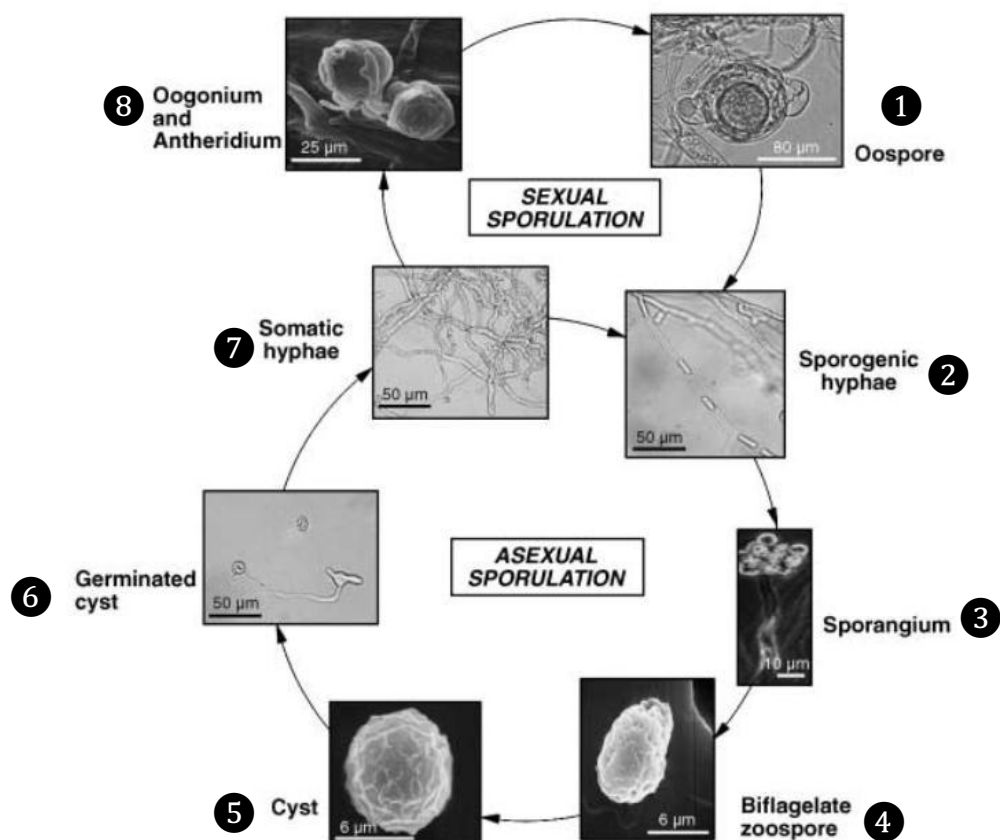


Figure I.22: Diagramme illustrant le cycle de vie d'*Aphanomyces euteiches*

Lors de la reproduction sexuée, la fécondation d'une oogone par une anthéridie, mène à la production d'oospores **1**. Ces structures, constituant la forme principale de conservation du parasite hors de la plante hôte, peuvent persister jusqu'à 10 ans dans le sol (Papavizas & Ayers, 1974). Lorsqu'une plante hôte est présente, les oospores peuvent germer et le cycle de vie de l'agent pathogène peut être complété. La reproduction asexuée commence par la germination de l'oospore qui va former un hyphe sporogène **2**, produisant le sporange **3** qui peut libérer plus de 300 zoospores biflagellées **4** (Scott, 1961). Celles-ci sont mobiles dans l'eau du sol et représentent la forme principale de dissémination à court terme de l'agent pathogène. Les zoospores sont attirées par chimiotactisme par la punetine, un flavonoïde présent dans les exsudats racinaires du pois (Sekizaki et al, 1993). Une fois au contact de l'hôte, les zoospores perdent leurs flagelles puis s'entourent d'une paroi en formant un kyste **5**. Les kystes germent **6** en produisant un hyphe infectieux **7** qui pénètre dans la racine. Dans les tissus racinaires, les hyphes coenocytiques se développent de façon majoritairement intercellulaire (Badreddine et al, 2008; Djébali et al, 2009) et formeront, après quelques jours, les appareils reproducteurs: l'anthéridie et l'oogone **8**. L'anthéridie pénètre l'oogone avec les tubes de fertilisation, qui fournissent les noyaux mâles à l'oogone, ayant pour résultat la formation des oospores diploïdes **1**.

fortement infesté). Lorsque l'agent pathogène est présent mais en très faible quantité ($PI < 1$), la culture du pois (hiver ou printemps) est possible en sécurisant les rendements (semer si possible en sol ressuyé, ne pas irriguer avant floraison). Si les parcelles sont infestées ($PI < 2,5$), une culture de pois d'hiver peut être envisagée. Dans les parcelles très infestées ($PI > 2,5$), il est conseillé de cultiver des espèces comme la féverole, le lupin et le soja, qui sont très résistants à la maladie (<http://www.unip.fr/pois/maladies/aphanomyces-euteiches.html>).

- Cycle de développement d'*A. euteiches* :

Le cycle de développement se déroule dans le système racinaire de la plante hôte, mais le mycélium peut aussi coloniser les parties aériennes (Levenfors, 2003). Il inclut deux phases de reproduction, sexuée et asexuée (Figure I.22). Les détails du mode d'infection par ce parasite restent encore mal connus. En effet, aucune structure similaire aux structures de pénétration (appressorium) ou d'invasion (haustorium) connues chez les champignons, n'a été mise en évidence à ce jour (Kjøller & Rosendahl, 1998). *A. euteiches* est considéré comme un hémibiotrophe (Franken *et al*, 2007), commençant par une phase biotrophe avant de devenir nécrotrophe.

- Symptômes provoqués par *A. euteiches* :

Les symptômes de la maladie se déclarent dans les 10 jours après inoculation (Hughes & Grau, 2007) (Figure I.23). A l'échelle de la parcelle pour les cultures de pois, les symptômes de cette maladie se manifestent par un jaunissement des plantes. La dissémination d'*A. euteiches* se fait horizontalement par l'eau à partir des foyers d'infestation. Les plantes infectées qui arrivent au terme de leur cycle végétatif produisent un nombre faible de gousses avec des petites graines. Cet agent pathogène peut également entraîner la mort de la plante avant la production de gousses, dans le cas où le sol est fortement infesté et lorsque les conditions climatiques sont favorables (Gilbert *et al*, 2003). Les symptômes les plus accentués ont été observés sur les parcelles avec un faible drainage d'eau résultant d'une texture du sol très argileuse et/ou d'une irrigation excessive. *A. euteiches* se développe entre 14 °C et 18 °C, il est cependant plus destructeur si la température atteint 28 °C avec un temps humide ou pluvieux.

- Impact des sources d'azote sur *A. euteiches*:

Le nitrate, en règle générale, n'est pas utilisé par *A. euteiches* (Papavizas & Davey, 1960). Dans les sols non stériles, le nitrate réprime l'infection alors que l'ammonium (NH_4^+)



Figure I.23: Symptômes provoqués par *Aphanomyces euteiches* (15 jours après infection) sur le génotype tolérant A17 et le génotype sensible F83005.5 de *Medicago truncatula*

Les premiers symptômes commencent à apparaître sur les racines qui deviennent de couleur jaunâtre puis prennent une teinte brune. La maladie progresse ensuite vers la partie aérienne provoquant la chlorose des cotylédons et la nécrose de l'épicotyle.

Extrait de Gaulin et al, 2007

l'augmente (Carley, 1969). L'augmentation de l'infection dans les sols contenant du NH_4^+ résulterait d'un effet sur l'agent pathogène plutôt qu'un effet sur l'augmentation de la sensibilité de la plante hôte. En effet, dans un sol stérile, quelle que soit la forme d'azote, il n'y a pas de différence observée sur la sévérité de la maladie, alors que dans un sol non stérile, le NO_3^- supprime la pourriture racinaire. Ceci indique que des mécanismes biologiques antagonistes suppriment l'activité de l'agent pathogène dans un sol naturel. Cela pourrait être une compétition directe pour l'azote entre les différents microorganismes (Carley, 1969). *In vitro*, les acides aminés peuvent être utilisés comme source d'azote pour *A. euteiches*. En effet, l'asparagine ou le glutamate (Papavizas & Davey, 1960), ainsi que la glutamine et l'aspartate peuvent servir de source azotée pour *A. euteiches* (Lumsden *et al*, 1970). Cependant, la croissance est généralement moins rapide avec ces acides aminés seuls qu'avec un mélange d'acides aminés ou avec de la peptone (Papavizas & Davey, 1960).

c. L'interaction *Medicago truncatula*/*Aphanomyces euteiches*

Le pathosystème constitué de la légumineuse modèle *M. truncatula* et l'oomycète *A. euteiches* a été mis au point il y a une dizaine d'années (Nyamsuren *et al*, 2003) et a été sujet à de nombreuses études depuis.

Les travaux de Colditz *et al*, (2004, 2005, 2007) ont permis entre autres d'identifier l'induction de la protéine PR-10 dans les racines de *M. truncatula* suite à l'infection par *A. euteiches*. Cette protéine semblerait jouer un rôle dans la sensibilité de *M. truncatula* à *A. euteiches*. En effet, elle réprime d'autres protéines PR, telle que PR-5 qui est supposée augmenter la résistance de *M. truncatula*. Plus récemment, Djébali *et al*, (2009) ont montré que la plus grande résistance du génotype A17, tolérant à *A. euteiches* était corrélée à des divisions plus fréquentes des cellules du péri-cycle, un dépôt de lignine au niveau des cellules du péri-cycle et une accumulation des composés phénoliques solubles. Par ailleurs, lors de l'infection, il est observé une diminution des niveaux d' H_2O_2 dans les racines du génotype A17 plus précoce que celle observée dans les racines du génotype F83005.5. Il semblerait que ce composé n'ait pas un effet anti-microbien direct sur la résistance de *M. truncatula* à *A. euteiches*, mais qu'il serait impliqué dans le renforcement de la paroi cellulaire autour de la stèle de la racine afin de prévenir de l'invasion de l'agent pathogène dans les tissus vasculaires (Djébali *et al*, 2011). Des analyses transcriptomiques ont permis d'avoir une vue plus globale des réponses du génotype A17 à *A. euteiches* et montrent l'induction de plus de 1000 gènes, comme par exemple des gènes impliqués dans la signalisation JA (*LOX*, *OPR*), des gènes liés aux ROS (peroxidase, glutathion sulfotransférase...), des gènes codant une protéine PR, etc... La répression de 875

gènes est également observée tels que des gènes impliqués dans la dégradation ou le renforcement de la paroi cellulaire (polygalacturonase, pectine méthyltestérase), des gènes impliqués dans l'organisation cellulaire (annexine) et dans le cycle cellulaire (cycline), un récepteur (*NFP*) (Rey *et al*, 2013). Récemment, une analyse comparative des transcriptomes du pois infectés par deux oomycètes, *A. euteiches* ou *Phytophthora pisi* (Hosseini *et al*, 2015), a mis en évidence des réponse transcriptionnelles communes à ces deux agents pathogènes, impliquant l'activation de modifications pariétales, la régulation de la biosynthèse du JA et l'induction de la voie de signalisation de l'ET. Par contre l'induction de gènes codant pour les chalcones synthases, impliquées dans les étapes précoces de la biosynthèse de flavonoïdes et de gènes de la voie des auxines est spécifique à l'interaction avec *A. euteiches*, suggérant l'importance du métabolisme secondaire et des auxines dans la réponse immunitaire de la plante à cet agent pathogène.

Des données récentes montrent que la protéine NFP (Nod Factor Perception), qui est impliquée dans la perception de lipochitoolisaccharides (LCO) des facteurs Nod lors de la symbiose rhizobienne, peut jouer un rôle dans la résistance de *M. truncatula* à *A. euteiches*. Le mutant *nfp*, affecté dans le stade précoce de nodulation, devient plus sensible à *A. euteiches* tandis que le surexprimeur NFP entraîne une augmentation de la résistance. La mutation de NFP conduit à une modification de l'expression de 500 gènes, notamment des gènes associés à la résistance de la pénétration de l'agent pathogène (Rey *et al*, 2013). Ces études mettent en évidence un rôle potentiel de ce récepteur dans la perception, non seulement, des signaux symbiotiques (LCO) mais également des résidus N-acétylglucosamines des PAMPs pour la réponse immunitaire des plantes.

L'analyse génétique de la résistance de *M. truncatula* à *A. euteiches* a permis d'identifier un locus majeur associé à la résistance, *AERI* (Pilet-Nayel *et al*, 2009). Ce QTL a été identifié dans une région riche en gènes de résistance. En parallèle à cette étude, Djébali *et al*, (2009) ont confirmé que ce QTL était impliqué dans l'expression de la résistance. Plus récemment, une étude par génétique d'association (GWAS) de *M. truncatula* a confirmé l'identification d'un gène codant pour une protéine F-box comme étant potentiellement impliqué dans la résistance de *M. truncatula* à *A. euteiches* (Bonhomme *et al*, 2014). L'analyse transcriptomique de deux lignées quasi-isogéniques, différant par l'état allélique du locus de résistance quantitative *prAe1* (partially resistant to *A. euteiches* 1), a montré que *prAe1*, à lui seul, conférait la résistance quantitative à *A. euteiches*. De plus, les auteurs ont montré que *prAe1* est associé à l'expression

constitutive de gènes de défense et de signalisation, et qu'il régule les voies du métabolisme secondaire (Badis *et al*, 2015).

Du côté de l'agent pathogène, des études transcriptomiques ont été réalisées sur *A. euteiches* à partir d'ADNc obtenus à partir d'ARN extraits du mycélium issu d'un milieu artificiel (liquide) ou en contact avec des racines (Gaulin *et al*, 2008). Ces études ont montré de grandes différences concernant le contenu en gènes avec ceux des espèces de *Phytophthora*, conduisant à l'identification de voies de biosynthèse absentes chez *Phytophthora*. De nouveaux gènes de pathogénicité ont été identifiés et une expansion de la famille des gènes codant pour des protéines extracellulaires, notamment les différentes classes de protéases, a été mise en évidence. Parmi ces gènes, certains seraient impliqués dans l'adhésion et contiendraient des domaines semblables aux domaines de liaison de cellulose fongique. Une classe distincte d'effecteurs cytoplasmiques appartenant à la famille CRN (*Crinkling and Necrosis*), préalablement décrite chez *P. infestans* (Torto *et al*, 2003), a été détectée chez *A. euteiches* et montre une forte similarité avec les CRN5 et CRN13 de *P. infestans*. C'est la première fois que des gènes CRN ont été trouvés dans des organismes distincts des Péronosporales (*A. euteiches* appartient à l'ordre des Saprolegniales) suggérant ainsi que cette classe d'effecteurs joue un rôle important dans la pathogénicité des oomycètes. La comparaison des séquences avec les protéomes d'agents pathogènes eucaryotes entièrement séquencés, incluant les champignons, les sporozoaires et les trypanosomatidés, a permis l'identification de gènes orthologues proches de ces microorganismes, mais pas chez les autres oomycètes séquencés à ce jour, et suggère la présence d'un mécanisme de défense contre les stress oxydatifs qui a été initialement caractérisée chez les trypanosomatidés (Gaulin *et al*, 2008).

1.7 Objectifs

Mon projet de thèse s'inscrit dans la compréhension des effets de la nutrition de la plante sur son immunité. Nous nous sommes focalisés sur l'analyse de l'impact de la nutrition azotée de *M. truncatula* sur la résistance à *A. euteiches*, tout en prenant en compte la variabilité génotypique de la plante. Les résultats de cette étude ont permis de mettre en évidence une interaction entre le génotype et la nutrition azotée de la plante pour la résistance contre *A. euteiches*.

Croissance et développement de la plante	Infection et sensibilité à <i>A. euteiches</i>
Biomasse racinaire	Nombre de plantes mortes
Biomasse des parties aériennes	% de cotylédons jaunes
Taille de la racine I	% de brunissement de la tige
Nombre et taille des racines II	% de brunissement de la racine
	Quantification de l'agent pathogène (ELISA et qPCR)

Tableau I.2: Mesure des symptômes

Les biomasses racinaires et des parties aériennes sont mesurées lors de la récolte, soit 21 jours après infection. Les mesures des paramètres racinaires (taille et nombre) et le % de brunissement racinaire sont réalisés à 10 jours après infection. L'annotation des symptômes (nombre de plantes mortes, % de cotylédons jaunes et % de brunissement de la tige) et la quantification de l'agent pathogène sont réalisées à 21 jours après infection.

2. Résultats

2.1 Effets des éléments nutritifs sur l'interaction *M. truncatula*/*A. euteiches*

Pour évaluer les effets de la nutrition sur l'interaction *M. truncatula*/*A. euteiches*, les plantes ont été cultivées sur différents milieux nutritifs. Les expériences ont été initiées avec le génotype A17, sur cinq milieux nutritifs différents : milieu complet (NPS) ; trois milieux carencés, un en nitrate (NØ), un second en soufre (SØ) et un dernier en phosphate (PØ); et un milieu où la source de nitrate est remplacée par une autre source d'azote, la glutamine (Gln). Après germination, les plantules sont repiquées sur ces différents milieux et infectées par *A. euteiches*. Celles-ci sont alors prélevées 21 jours après inoculation. Différents paramètres ont été mesurés (Tableau I.2).

La figure I.24 montre les résultats obtenus pour le génotype A17 cultivé sur les cinq milieux nutritifs différents. Les graphiques A et B montrent respectivement les pourcentages de brunissement de la tige et de la racine primaire mesurés, 10 jours après infection. Le graphique C représente le niveau d'agent pathogène détecté 21 jours après infection, dans les racines du génotype A17, par test ELISA, grâce au sérum polyclonal de lapin dirigé contre *A. euteiches* (Slezack *et al*, 1999). Dans l'ensemble, une corrélation entre ces différents paramètres mesurés est observée. Ainsi, par exemple, un fort pourcentage de brunissement de la tige est souvent corrélé à un fort pourcentage de brunissement de la racine primaire et une plus grande quantité d'agent pathogène présent dans les racines. De ces analyses il ressort que la résistance à *A. euteiches* du génotype A17 est augmentée significativement en milieu NØ (d'après l'ensemble des symptômes mesurés) par rapport au milieu contrôle complet NPS. Ces expériences ont été répétées trois fois et ont permis de confirmer l'augmentation de la résistance à *A. euteiches* du génotype A17 sur milieu NØ.

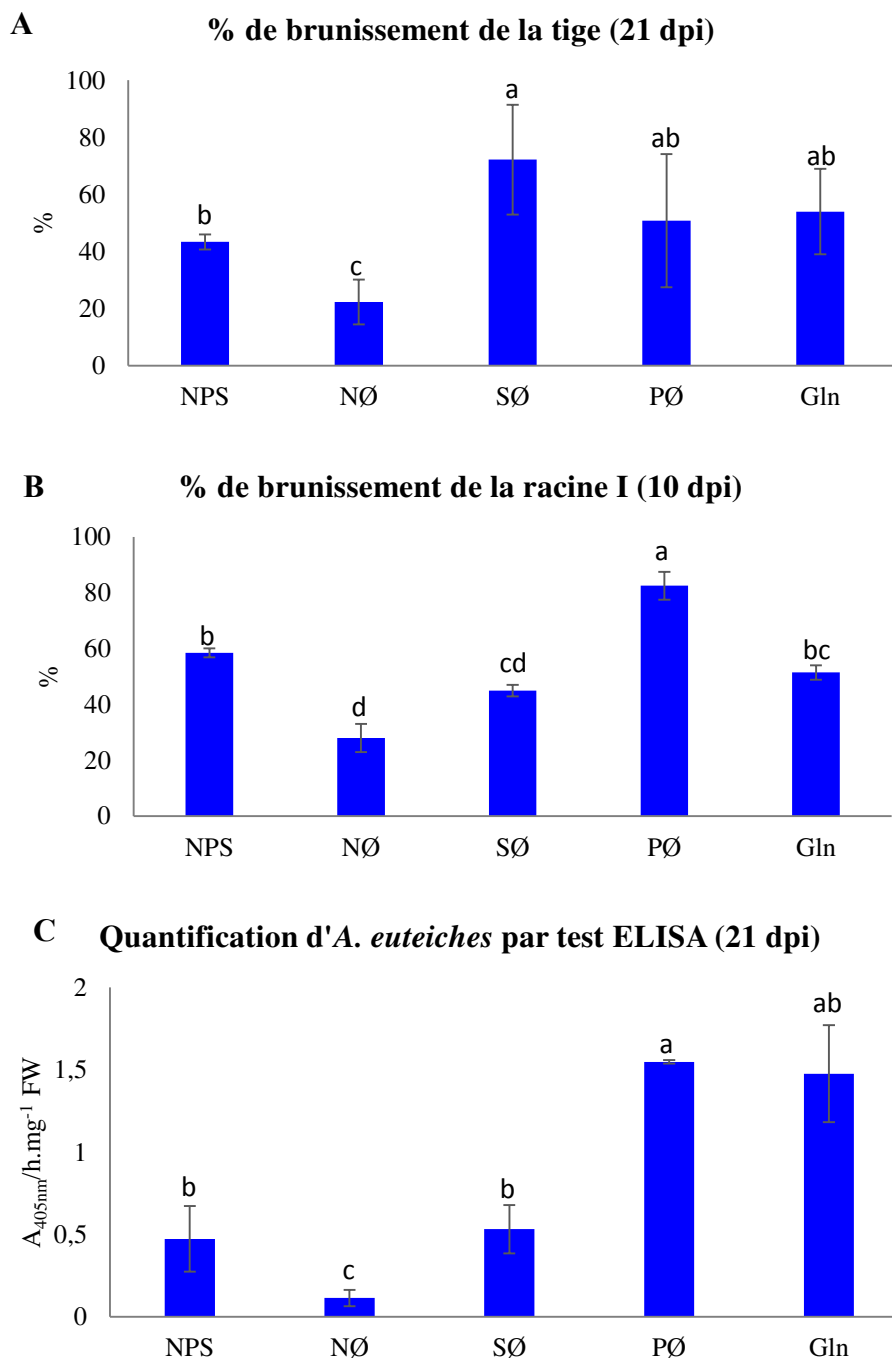


Figure I.24: Mesure des symptômes d'infection sur le génotype A17

Mesure du pourcentage de brunissement de la tige (A) et de la racine I (B) à 10 jours post-inoculation. (C) Détection de la quantité d'*A. euteiches* par test ELISA à 21 jours post-inoculation. Les graphiques représentés correspondent à une expérience représentative de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard ($n = 4$ pour (A) & (C), $n = 20$ (B)) et les lettres indiquent les différences significatives (ANOVA suivie d'un test de Fisher $p < 0,05$).

NPS = milieu complet; NØ = milieu carencé en N; SØ = milieu carencé en S; PØ = milieu carencé en P, Gln = milieu où la source d'azote est de la glutamine.

2.2 Article scientifique: Genotypic variability of nitrogen modulation of *Medicago truncatula* resistance to *Aphanomyces euteiches*

a. Introduction

Les expériences sur les différents milieux nutritifs ont permis de montrer une augmentation de la résistance du génotype A17 sur milieu NØ. Nous avons donc décidé de poursuivre nos expériences sur milieu complet et milieu carencé en nitrate (NØ) et ceci sur la core collection CC8, composée de huit accessions représentatives de la variabilité existante chez *M. truncatula* (Ronfort *et al*, 2006). Cette core collection CC8 est issue de l'INRA de Montpellier (<http://www1.montpellier.inra.fr/BRC-MTR/>). Les différents génotypes qui la composent sont SA022322, SA028064, DZA012, F83005.5, ESP105, SALSES71, DZA315 et DZA045-6. Les génotypes A17 (génotype séquencé) et R108 (génotype utilisé dans les études fonctionnelles) ont également été ajoutés à l'étude. Il a déjà été montré des différences de sensibilité entre les différents génotypes, cultivés *in vitro* ou en chambre climatique (Djébali *et al*, 2011; Pilet-Nayel *et al*, 2009; Bonhomme *et al*, 2014; Badis *et al*, 2015). DZA045-6 et A17 sont plus résistants à *A. euteiches* que F83005.5 et ESP105 qui paraissent plus sensibles (Moussart *et al*, 2007; Djébali *et al*, 2009, 2011; Bonhomme *et al*, 2014).

Les expériences ont été réalisées sur ces dix génotypes afin d'observer leur comportement face à l'agent pathogène après culture sur deux milieux nutritifs différents (milieu complet et milieu NØ). L'analyse de cette expérience est présentée dans l'article ci-après. Une analyse en composante principale (ACP) est réalisée à partir des paramètres mesurés suivants :

- Des paramètres développementaux et de croissance des plantes : taille de la racine primaire, nombre et taille des racines secondaires, densité de celles-ci, biomasses aériennes et racinaires. Pour chacun de ces paramètres, le rapport des valeurs obtenues dans les plantes contrôles non infectées sur celles des plantes infectées est calculé comme mesure de la sensibilité de la plante à *A. euteiches*.
- Des paramètres mesurant les symptômes d'infection : pourcentage de brunissement de la tige, pourcentage de brunissement de la racine primaire et quantité d'agent pathogène détectée par test ELISA.

L'ACP permet de prendre en compte toutes les variables mesurées pour chacune des conditions et de construire de nouvelles variables synthétiques, appelées composantes principales, qui captureront la plus grande part de la variabilité des données. Ainsi dans le cadre de l'étude de la sensibilité à *A. euteiches*, l'ACP permet de déterminer de façon beaucoup plus intégrative la sensibilité d'un génotype à cet agent pathogène (Bonhomme *et al*, 2014).

Cette ACP nous a permis de mettre en évidence quatre génotypes aux comportements contrastés qui, de façon reproductible, deviennent soit plus sensibles soit plus résistants en carence en nitrate. Une étude plus poussée a alors été réalisée sur ces quatre génotypes afin de comprendre les mécanismes qui permettraient d'expliquer la différence de comportement de la résistance observée entre ces génotypes en milieu NØ.

b. Article: Genotypic variability of nitrogen modulation of *Medicago truncatula* resistance to *Aphanomyces euteiches*

Title

- **Nitrogen modulation of *Medicago truncatula* resistance to *Aphanomyces euteiches* depends on plant genotype**

Authors

E. Thalineau¹, C. Fournier¹, A. Gravot², D. Wendehenne¹, S. Jeandroz¹ & HN. Truong¹

¹Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France, ²Université Rennes 1, UMR 1349 IGEPP, Rennes, France

Running title

- **N modulates *Medicago* resistance to *Aphanomyces***

Key words (6 to 10): plant defence, nitrogen, amino acids, glutamine, *Medicago truncatula*, *Aphanomyces euteiches*, nitrate

Abbreviations: N, nitrogen; NØ-IR, NØ-induced resistance; NØ-IS, NØ-induced susceptibility; NØ medium, N-deficient medium; NIS, Nitrogen-induced susceptibility; NUE, nitrogen use efficiency.

Summary

Nitrogen (N) availability can impact plant resistance to pathogens by regulating plant immunity. To better understand the links between N nutrition and plant defence, we analysed the impact of N availability on *Medicago truncatula* resistance to the root pathogen, *Aphanomyces euteiches*. This oomycete is considered as the most limiting factor for legume production. Ten plant genotypes were tested *in vitro* for their resistance to *A. euteiches* in either complete or N-deficient medium. N-deficiency led to enhanced or reduced susceptibility depending on plant genotype. Focusing on four genotypes displaying contrasted responses we determined the impact of N-deficiency on plant growth and shoot N concentration and performed expression analyses on N- and defence-related genes as well as quantification of soluble phenolics and of root contents in different amino-acids. Our analyses suggest that N modulation of plant resistance is not linked to plant response to N deprivation nor to mechanisms previously identified to be involved in plant resistance. Furthermore our studies highlight a role of glutamine in mediating susceptibility to *A. euteiches* in *M. truncatula*.

INTRODUCTION

Nutrients are essential for growth and development of plants and microorganisms and are also recognized as important factors in the fate of plant pathogen interactions (Dordas, 2008; Fagard *et al.*, 2014; Mur *et al.*, 2016). Among the different nutrients, nitrogen (N) plays a particularly important role. Indeed, N constitutes approximately 2-5% of dry matter, making it quantitatively the most important element in plants. Agronomical data indicate that, in addition to their impact on yields, the quantity and quality of N supply can impact the plant's ability to cope with pathogen attacks, leading to enhanced or decreased resistance. There is, however, no general rule on the outcome of N fertilization on disease severity. For example, in potato, N supply leads to opposite results depending on the pathogen models (Mittelstrass, 2006). These differences could be correlated, in part, with the pathogenic lifestyle (biotrophic or necrotrophic). Other factors could be involved in the modulation by N of plant resistance to pathogens such as plant capacity to mobilize N and/or synthesize defence compounds (Ballini *et al.*, 2013; Dietrich *et al.*, 2004). Moreover, a recent study indicated that the form of N (nitrate or ammonium) affected defence responses and resistance to bacterial infection in tobacco (Gupta *et al.*, 2013). Finally, N can quantitatively and qualitatively affect pathogen virulence and pathogen nutrition *in planta* (Snoeiijers *et al.*, 2000). Taken together, these data indicate that N supply can affect plant resistance. However, the underlying mechanisms remain in general unclear.

The different steps involved in N metabolism have long been studied and many of the corresponding proteins have been characterized (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Interestingly, the contribution of several of these proteins to plant defence has been highlighted recently. *Arabidopsis* mutants affected in different steps of N transport and assimilation, such as the nitrate reductase (NR) double mutant (*nia1 nia2*) (Modolo *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2009), the high affinity nitrate transporter NRT2.1 (Camañes *et al.*, 2012) and the putative nitrate transporter NRT2.6 (Dechorgnat *et al.*, 2012) mutants, were all found to display an altered sensitivity to pathogens. Conversely, pathogens modulate the expression of genes or the activity of enzymes involved in N transport (specific members of the NRT2 or AMT1/2 families), N assimilation (NR or GS2), N remobilization (GS1), and in amino acid metabolism (Fagard *et al.*, 2014).

Amino acid contents and their relative concentrations are modified during plant-pathogen interactions (Fagard *et al.*, 2014; Zeier, 2013). Different explanations can be proposed to interpret these modifications. Amino acids (*per se* or as precursors of defence molecules)

represent an important resource for setting up induced resistance in plants. Amino acids constitute also a nutrient source that is crucial for pathogens survival and propagation and studies showed that pathogens prefer specific amino acids to inorganic N (Pellier *et al.*, 2003; Solomon *et al.*, 2003). Modification of plant amino acid composition could therefore represent a plant defence strategy which could lead to N deprivation for pathogens through for instance N remobilization from diseased tissues to healthy parts (Olea *et al.*, 2004; Tavernier *et al.*, 2007). Alternatively pathogens, through co-evolution, could adapt their preference to amino acids accumulated in infected plants or could manipulate plant N metabolism, inducing the accumulation of favorable amino acids at the infection site (Solomon and Oliver, 2002). The links between amino acid metabolism and plant resistance were reinforced by results showing that *A. thaliana* lines impaired in the LHT1 amino acid transporter (Liu *et al.*, 2010) or over expressing the pepper *ASPARAGINE SYNTHETASE1* gene (*CaAS1*) (Hwang *et al.*, 2011) exhibited enhanced resistance to *P. syringae*.

Finally, modulation of N metabolism could impact molecular defence responses. For instance nitric oxide and reactive oxygen species levels are altered in response to N deprivation (Schachtman and Shin, 2007; Thalineau *et al.*, 2016). Salicylic acid (SA) levels and SA-mediated defences, mainly linked with redox state, are also dependent on N nutrition (Gupta *et al.*, 2013; Yaeno and Iba, 2008). Transcriptome analyses have further highlighted that the expression of genes involved in the response to biotic stress (such as MPK3, MPK7, peroxidase- and R protein- encoding genes) is affected by N limitation in *Arabidopsis* (Peng *et al.*, 2007).

Parasitic oomycetes cause severe diseases on many crop plants. *Aphanomyces euteiches* is a pathogenic oomycete responsible of root rot in pea and a number of other legumes (Gaulin *et al.*, 2007) and is considered as the most limiting factor for legume production. Resistance to *A. euteiches* has been investigated in legumes and particularly in the model plant, *Medicago truncatula*. The reaction of *M. truncatula* lines to *A. euteiches* infection varied from susceptibility to resistance (Djébali *et al.*, 2012; Vandemark and Grünwald, 2004). Comparative analyses of susceptible (F83005.5) and tolerant (A17) genotypes indicated that resistance mechanisms include protection of the central cylinder against pathogen invasion, associated with frequent pericycle cell divisions, lignin deposition, and accumulation of soluble phenolic compounds (Djébali *et al.*, 2009; Djébali *et al.*, 2011). These results were corroborated by genetic studies. A major locus associated with resistance to *A. euteiches*, namely *AERI*, was identified (Pilet-Nayel *et al.*, 2009) and confirmed by a genome-wide association study, which identified two major independent loci on top of chromosome 3, one of which co-localized with *prAe1* (formerly named *AER1*) (Bonhomme *et al.*, 2014). The functional role of the *prAe1*

locus was investigated recently by (Badis *et al.*, 2015) using two near-isogenic lines, NR and NS, partially resistant and susceptible, respectively, differing in the allelic state of prAe1. Transcriptomic and biochemical analyses demonstrated the significant role of secondary metabolites, particularly of flavonoids in resistance and identified a chalcone-derived compound as a potent inhibitor of *A. euteiches*.

The aim of this work was to study the effect of N nutrition on *M. truncatula* resistance to *A. euteiches*. Ten genotypes of *M. truncatula*, including the core collection CC8, were grown *in vitro* on complete or on nitrate-deficient medium (NØ). Parameters related to plant growth and root development as well as relevant indicators of *M. truncatula* resistance to *A. euteiches* were scored. N-deficiency led to contrasted responses of the different genotypes to *A. euteiches*, resulting either in enhanced or lowered resistance of plants to the pathogen. To understand how NØ leads to contrasted behaviors between *M. truncatula* genotypes, we focused our investigations on four genotypes to perform biochemical (soluble phenolics and amino acid quantification) and molecular analyses (genes expression related to N metabolism or involved in defence responses). Our analyses suggest that N modulation of plant resistance is not linked to plant response to N deprivation nor to mechanisms previously identified to be involved in plant resistance. Furthermore our studies highlight the importance of Gln in enhancing plant susceptibility to *A. euteiches*.

MATERIALS AND METHODS

Plant growth and inoculation by A. euteiches

Ten *M. truncatula* genotypes belonging to the core collection CC8 (INRA, Montpellier) (Jemalong-A17, F83005.5, DZA045-6, SA022322, SA028064, SALSES71B, ESP105.L, DZA315-16 and DZA012-J) and R108, were used in this study. The seeds of *M. truncatula* were scarified according to (Djéballi *et al.*, 2009). After overnight at 4°C, seeds were germinated in phytochambers with 16 h light 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 23°C /8 h night cycle at 21°C. One day after germination, seedlings were transferred to square plates (12 cm x 12 cm) containing a modified M medium (Bécard and Fortin, 1988). This modified medium was enriched in phosphate (1.3 mM final concentration) without sugar and contained either 3.2 mM nitrate (complete medium) or no nitrate (NØ medium). After sealing with parafilm and protecting roots from light with aluminum foil, plates were placed vertically in the culture chamber (16 h light 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 23°C/8 h night cycle at 21°C) for 7 days. The strain *Aphanomyces euteiches* Drechs. ATCC 201684 was used to inoculate seeds one day after germination. Zoospores were produced as described in Rey *et al.*, (2013) and roots were inoculated with 500 zoospores.

Symptoms annotations and root architecture analyses

Effects of inoculation and N deficiency were scored after 10 d or 21 d of culture by determining plant growth and development parameters (root and shoot biomass, primary root length, secondary root number and length) and disease symptoms (dead plants, % yellow cotyledons, stem necrosis, % primary root browning and ELISA test).

Root system architecture was analyzed on scans of plates containing seedlings grown for 10 d on complete medium or NØ medium in the presence or not of *A. euteiches*, using the ImageJ software (Schneider *et al.*, 2012) to measure the primary root (RI) length, lateral root (LR) length and density (which is the average number of LRs per cm RI). For each experiment, about 20 seedlings per genotype and per condition were analyzed.

Assessing infection by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Assessment of *A. euteiches* development in roots was performed by ELISA using a rabbit polyclonal serum raised against *A. euteiches* and a mouse anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate as described by Slezack *et al.*, (1999) on protein extracts obtained from roots from pooled plants. Alkaline phosphatase activity was monitored by following the

increase in absorbance at 405 nm during 2–3 h and is expressed as the slope of the obtained curve per mg root fresh weight.

RNA extraction, reverse transcription and quantitative PCR on transformed roots

Total RNA was extracted from transformed roots using TRIzol[®] Reagent (Life technologies) according to the recommendations of the manufacturer. For qPCR, RNAs (0.5-1 µg) were reverse transcribed in a final volume of 20 µL in the presence of RNasin (Promega, Charbonnières, France), and oligo(dT)₁₅, with MMLV reverse transcriptase (Promega, Charbonnières, France) as recommended by the manufacturer.

Quantitative PCR was performed on reverse-transcribed RNAs on four independent biological replicates per condition for two independent plant cultures. Quantitative PCR reactions were performed in the ABI PRISM 7900 apparatus (Applied Biosystems[®], Saint-Aubin, France) in a final volume of 15 µL using Absolute SYBR green ROX Mix (Thermo Scientific, Surrey, UK), 0.3 µM of gene-specific primers and 5 µL of cDNA template diluted 60-fold. Reference gene used for normalization was *MtEF1α*. Expression levels were calculated by determining the ΔC_t between test and reference gene ($\Delta C_{t_{\text{test gene-reference gene}}}$). For *MtEF1α*, average C_t in all experiments was equal to 15 cycles. As a total of 40 cycles were performed for qPCR analysis, a gene was considered as not expressed if $\Delta C_{t_{\text{test gene-reference gene}}} \geq 25$. Therefore, gene expression was quantified by the parameter $25 - \Delta C_{t_{\text{test gene-reference gene}}}$, which is higher when test gene is more highly expressed. Primers used for qPCR all displayed a high amplification efficiency (90-100%) and their sequences are listed in Supplementary Table 1. Results were displayed using the MeV software (v4.6, TIGR).

Soluble phenolics and amino acid quantification

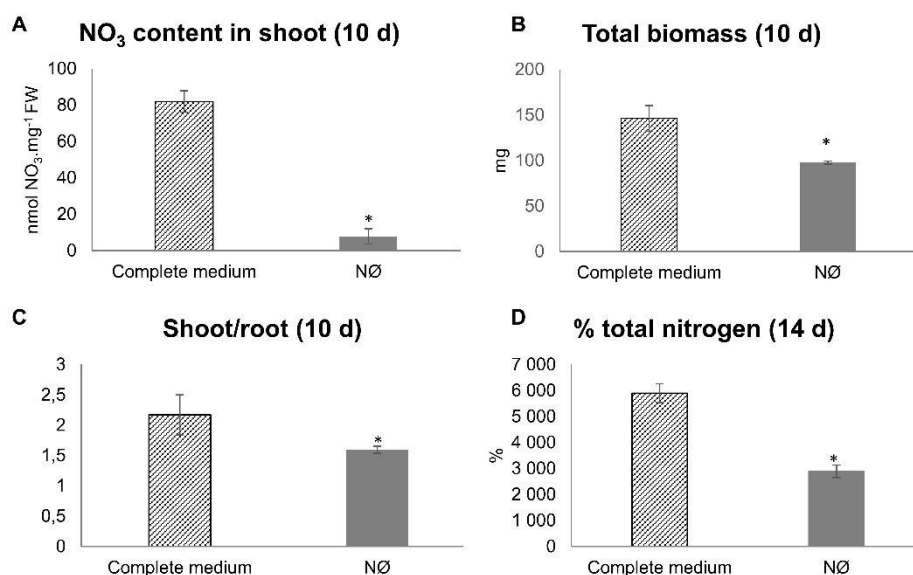
Soluble phenolics quantification was performed on 100 mg root fresh weight according to (Singleton *et al.*, 1965) using the Folin-Ciocalteu reagent and ferulic acid as a reference standard.

Amino acid quantification was performed according to (Jubault *et al.*, 2008) by extracting 10 mg freeze-dried roots in 400 µl of a 100 µM DL-3-aminobutyric acid solution in methanol.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using one or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's test. Data were considered as significantly different for $p <$

0.05. The principal component analysis (PCA) and Monte Carlo test were performed, using the statistical ade4TkGUI software, to integrate the different measurements of plant development and susceptibility to *A. euteiches*.



Supplementary Fig. S1: Plants experience N-deficiency on NØ medium

NO₃⁻ content in shoot at 10 days (A), total biomass at 10 days (B), shoot on root ratio at 10 days (C) and percentage of total nitrogen at 14 days (D) in A17 genotype cultivated on complete medium (black bars) or NØ medium (grey bars). Data from a representative experiment are shown. Error bars indicate standard error (n = 4 for NO₃⁻ content and total biomass, n = 16-20 for shoot on root ratio; n = 4-6 for % total nitrogen). Asterisks denote significant differences (p < 0.05).

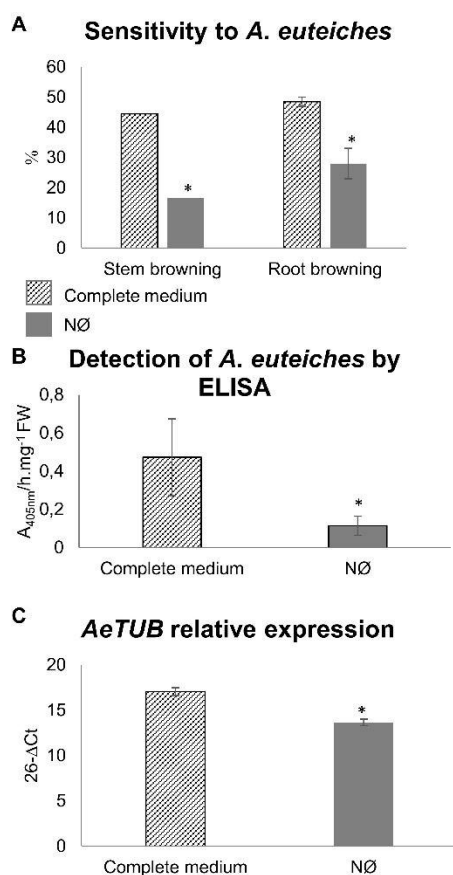


Fig. 1: Susceptibility of the A17 genotype to *A. euteiches* decreased on N-deficient medium

(A) Sensitivity to *A. euteiches* as scored by the percentage of symptomatic tissues (stem and root browning). (B) Quantification by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of *A. euteiches* in root extracts. (C) AeTUB relative expression. Plants were cultivated in vitro for three weeks on complete medium (black bars) or NØ medium (gray bars) and inoculated with *A. euteiches*. For ELISA tests, background signal from control non-inoculated roots was subtracted from the signal detected in inoculated roots. Error bars indicate standard errors (n = 16-20 for symptoms; n = 4-6 for ELISA tests and AeTUB expression) and asterisks indicate significant differences (p < 0.05). Data from a representative experiment out of four independent experiments are shown.

RESULTS

N-deficiency enhances the resistance of the A17 genotype to *A. euteiches*

To assess the effects of N nutrition on the interaction between *M. truncatula* and *A. euteiches*, the A17 genotype was grown *in vitro* for 10 to 21 days on two media: a complete medium (containing 3.3 mM nitrate as sole N source) and a nitrate-deficient medium (NØ). On NØ medium, the first symptoms of N-deficiency (plant growth parameters) were observed after 10 days culture compared to plants cultivated on complete medium. Significant differences in plant N content appeared later after 14 days of culture (Supplementary Fig. S1).

On NØ medium, the A17 genotype was less affected by *A. euteiches* compared to complete medium, as it displayed a lower percentage of symptomatic tissues (stem and root browning) (Fig. 1A). Moreover, a significantly lower level of pathogen was detected in roots by ELISA (Fig. 1B) using a polyclonal antibody raised against *A. euteiches* (Slezack *et al.*, 1999). This was correlated with a decrease in the expression of *A. euteiches* Tubulin (*AeTUB*) gene (Fig. 1C). Thus, A17 was more resistant to *A. euteiches* on NØ medium compared to complete medium.

We verified whether this NØ-induced resistance (NØ-IR) was due to the fact that *A. euteiches* virulence was affected by N-deficiency. For this purpose, we measured *AeCRN13* and *AeCRN5* expressions, two CRN candidate effectors identified through a transcriptomic approach on *A. euteiches* (Gaulin *et al.*, 2008; Ramirez-Garcés *et al.*, 2016). When normalized to *MtEF1* expression, a significantly lower expression of these effectors in inoculated roots was evidenced in NØ than in complete medium (Fig. 2A), due possibly to the lower infection of roots by *A. euteiches* on NØ medium. Indeed, no difference in CRN expression between complete medium and NØ medium was observed when *AeCRN13* and *AeCRN5* gene expression levels were normalized with *AeTUB* gene (Fig. 2B). Thus, these results indicate that N-deficiency does not affect the expression of the CRN13 and CRN5 effectors and *A. euteiches* virulence.

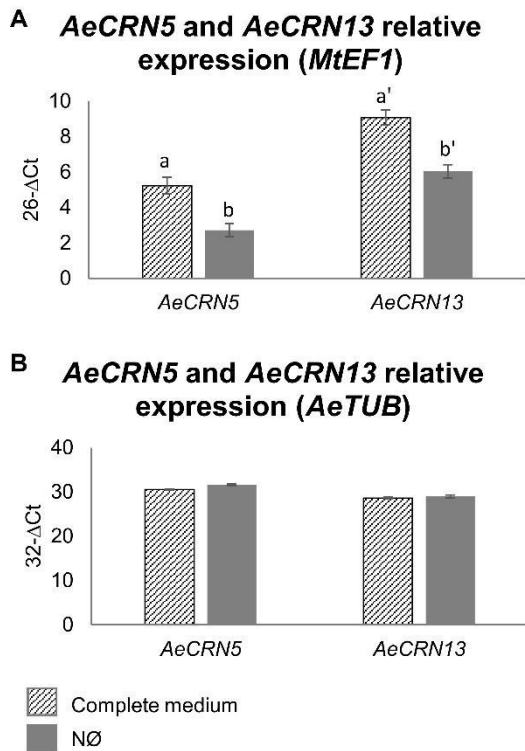


Fig. 2: Increased resistance of A17 on NØ is not related to changes in *AeCRN5* and *AeCRN13* expression

(A) Transcripts levels of *AeCRN5* and *AeCRN13* normalized to *MtEF1* expression. (B) Transcripts levels of *AeCRN5* and *AeCRN13* normalized to *AeTUB* expression. Plants were cultivated *in vitro* for ten days on complete medium (black bars) or NØ medium (gray bars) and inoculated with *A. euteiches*. No expression of *AeCRN5* and *AeCRN13* was detected in control non-inoculated plants. Error bars indicate standard errors ($n = 4$) and letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

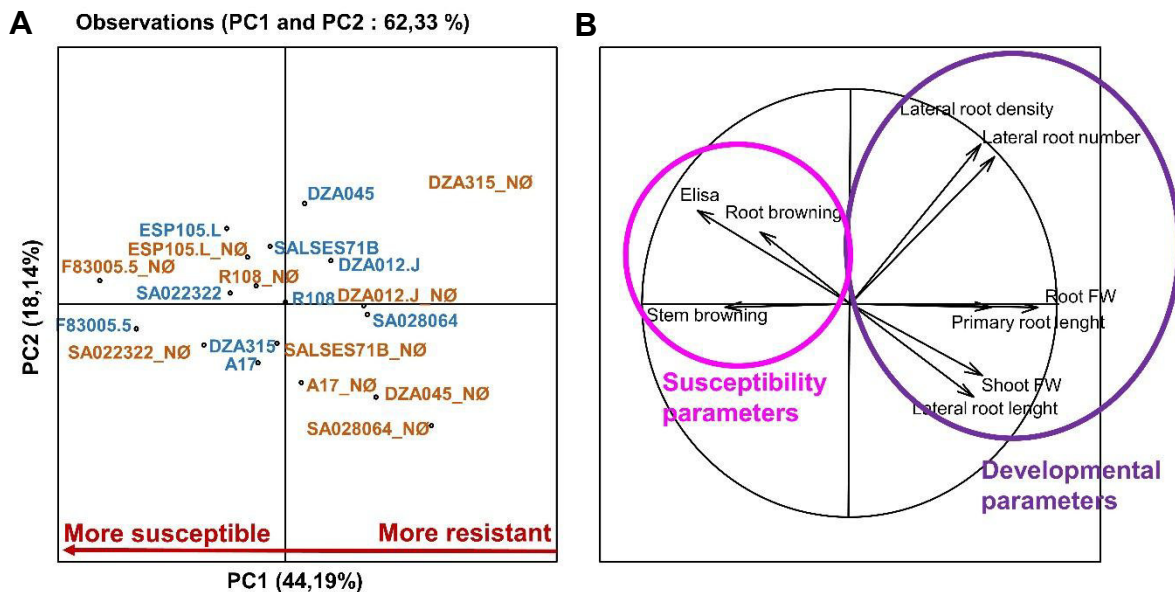


Fig. 3: Nutrition and genotype effect on plant susceptibility to *A. euteiches*

(A) Susceptibility of different genotypes of *M. truncatula* (A17, F83005.5, DZA045-6, SA022322, SA028064, SALSES71B, ESP105.L, R108, DZA315.16 and DZA012.J) under contrasted N availability (complete medium in blue and N-deficient medium NØ, in orange) was compared by principal component analysis (PC1 explains 44% of variance). (B) Circle of correlations showing that the negative side of axis PC1 is highly correlated with genotype susceptibility to *A. euteiches* (ELISA, root and stem browning). Data from a representative experiment out of three independent experiments are shown. The four genotypes selected for their contrasted responses are highlighted in bold.

NØ effects on M. truncatula-A. euteiches interaction are dependent on plant genotype

To study whether N-deficiency impacted similarly the behavior of other genotypes of *M. truncatula* to *A. euteiches*, we extended our initial experiments to nine other genotypes.

As for A17, stem and root browning were assessed and root infection was measured by ELISA test. Plant growth and root architecture parameters were also determined as relevant indicators of *M. truncatula* resistance to *A. euteiches*. Principal component analysis (PCA) was performed using these different parameters (Bonhomme *et al.*, 2014).

The figure 3 corresponds to a representative PCA of three independent experiments. ELISA, root and stem browning were positively correlated with each other and negatively correlated to growth parameters such as shoot biomass. PC1, which captured 44% of the variance, represents a “synthetic” measurement of plant resistance to *A. euteiches*. So, more a genotype is on the negative side of this axis, more it is susceptible to the pathogen. First, the results show that on complete medium the different genotypes display different behaviors: F83005.5 and SA028064 represent respectively the most susceptible and the most resistant genotypes while the other genotypes display intermediate levels of resistance. Secondly, interestingly, N-deficiency affects plant susceptibility to *A. euteiches* differently according to genotype. Genotypes could be classified into three groups: genotypes more resistant on NØ (NØ-IR for NØ-induced resistance) including A17, genotypes more susceptible on NØ (NØ-IS for NØ-induced susceptibility) and genotypes whose resistance was not affected on NØ (Fig. 3).

We focused on four genotypes which showed reproducibly a significantly different response to N-deficiency, the NØ-IS genotypes F83005.5 and SA022322 on the one hand, and the NØ-IR genotypes A17 and DZA045-6 on the other hand (Table 1). The DZA315-16 genotype which displayed a very strong increase in resistance on NØ medium (Fig. 3) was not chosen as its response to N-deficiency was too marked compared to the other genotypes and could therefore not represent adequately the processes involved in N modulation of plant immunity in the majority of the other genotypes. To understand why NØ medium impacted differently the four genotypes' resistance to *A. euteiches*, we quantified soluble phenolics as well as amino acids and analysed the expression of genes involved in N metabolism and defence in roots. These analyses were performed at 10 days of culture, a timepoint when N-deficiency is already effective (Supplementary Fig. S1).

Genotypes	PCI _{NØ} - PCI _{complete} *	Behavior
DZA045-6	1.7 ^a	NØ-IR
A17	1.0 ^a	
SA022322	-0.71 ^b	NØ-IS
F83005.5	-0.76 ^b	

Table 1: Classification of the 4 selected genotypes according to the modulation of their resistance to *A. euteiches* by N-deficiency.

*Statistical analyses were performed on the difference between the PC1 value obtained on NØ and the PC1 value obtained on complete medium in three independent experiments. Letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

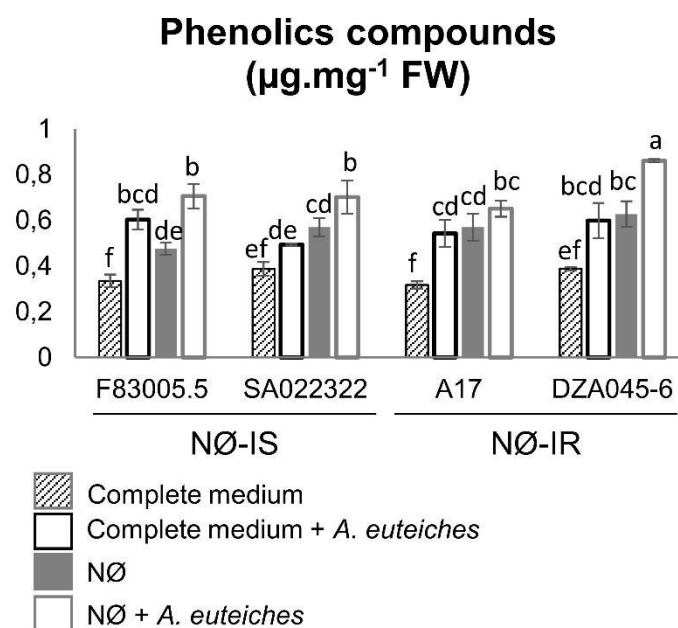


Fig. 4: Infection by *A. euteiches* and N-deficiency increase phenolic compounds in *M. truncatula* roots

Concentrations of soluble phenolics in roots of the four *M. truncatula* genotypes F83005.5, SA022322, A17 and DZA045-6, at ten days of culture. Plants were cultivated *in vitro* for ten days on complete medium or NØ medium and inoculated or not with *A. euteiches*. FW = fresh weight. Error bars indicate standard errors ($n = 4$) and letters indicate significant differences ($p < 0.05$). Data from a representative experiment out of three independent experiments are shown.

N-deficiency lead to changes in secondary metabolism and defence gene expression

We firstly determined the concentrations of soluble phenolic compounds in roots (Fig. 4). Inoculation by *A. euteiches* led to a significant increase in soluble phenolic concentrations for all genotypes. Similarly, N-deficiency increased the basal concentration of soluble phenolics and the combination of both N-deficiency and inoculation by *A. euteiches* led to the highest concentrations of these compounds (Fig. 4).

To study further the contribution of secondary metabolism to plant resistance we analysed by qRT-PCR the expression of genes encoding phenylalanine ammonia-lyases (*PAL1* and *PAL2*), chalcone synthases (*CHS1*, *CHS2*) and a caffeate-O-methyltransferase (*COMT1*). In addition we studied the expression of defence-related genes *MtPR10*, *MtCCNBS*, *MtLOX* encoding respectively a protein of the pathogenesis-related 10 family, a disease resistance protein and a lipoxygenase (Badis *et al.*, 2015; Nars *et al.*, 2013). Some of these secondary metabolism and defence genes were identified as higher expressed in partially resistant (NR) than in partially susceptible (NS) near-isogenic lines and could contribute to plant resistance (Badis *et al.*, 2015). Figure 5A displays the average expression levels of these genes using the MultiExperiment Viewer (MeV) software (v4.6, TIGR). A general trend was highlighted for the *MtPAL1*, *MtPAL2*, *MtCOMT1* and the defence-related genes. On complete medium, their basal expression levels (e.g. in the absence of pathogen) were in general correlated with plant resistance to *A. euteiches* : the most sensitive genotype (F83005.5, Fig. 3) displayed the lowest and the most resistant genotype (DZA045-6, Fig. 3) displayed the highest expression levels of these genes (Fig. 5A, Supplementary Fig. S2). Inoculation by *A. euteiches* increased the expression levels of these genes in most genotypes leading to the highest levels in the most resistant genotype DZA045-6. On NØ medium, the NØ-IS genotypes displayed a significantly increased basal expression of these genes, though they were more susceptible to *A. euteiches* in these conditions (Fig. 5A, Supplementary Fig. S2). Conversely the NØ-IR genotypes displayed in general no significant change or even a decrease in the basal expression of these genes on NØ despite their being more resistant when experiencing N limitation (Fig. 5A, Supplementary Fig. S2). Thus, though for most of these genes a good correlation between their basal expression levels and plant resistance could be made on complete medium, this correlation was lost on NØ medium. Therefore genes contributing possibly to resistance to *A. euteiches* in complete medium appear not to determine resistance under N-deficiency.

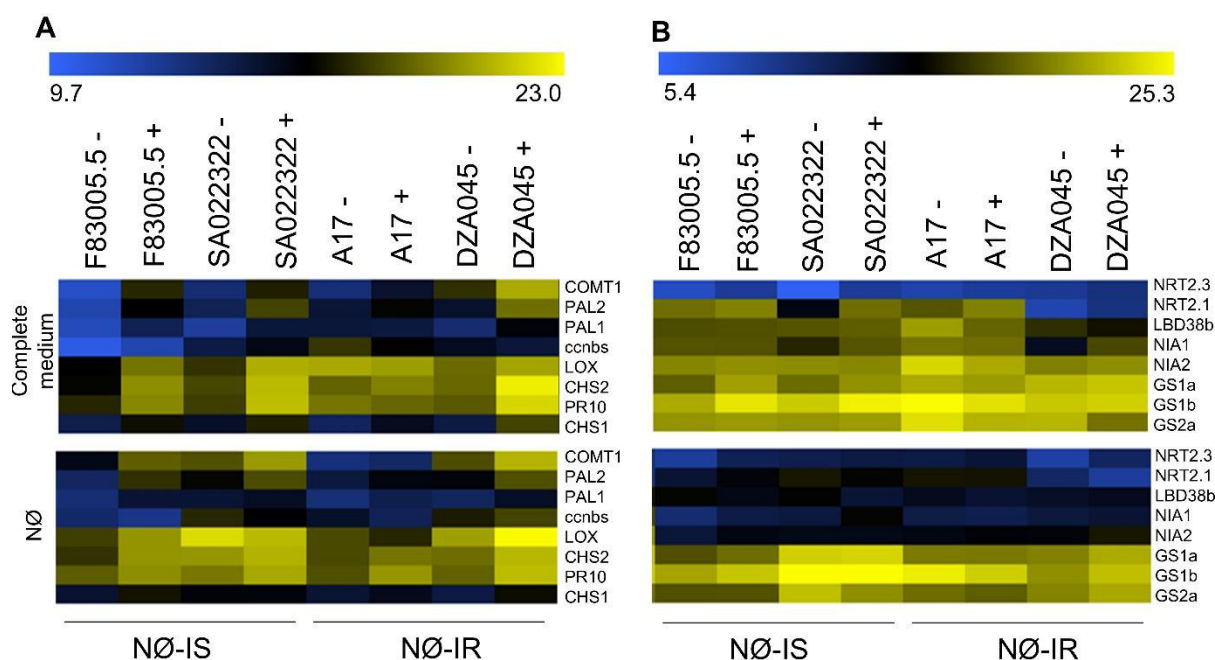
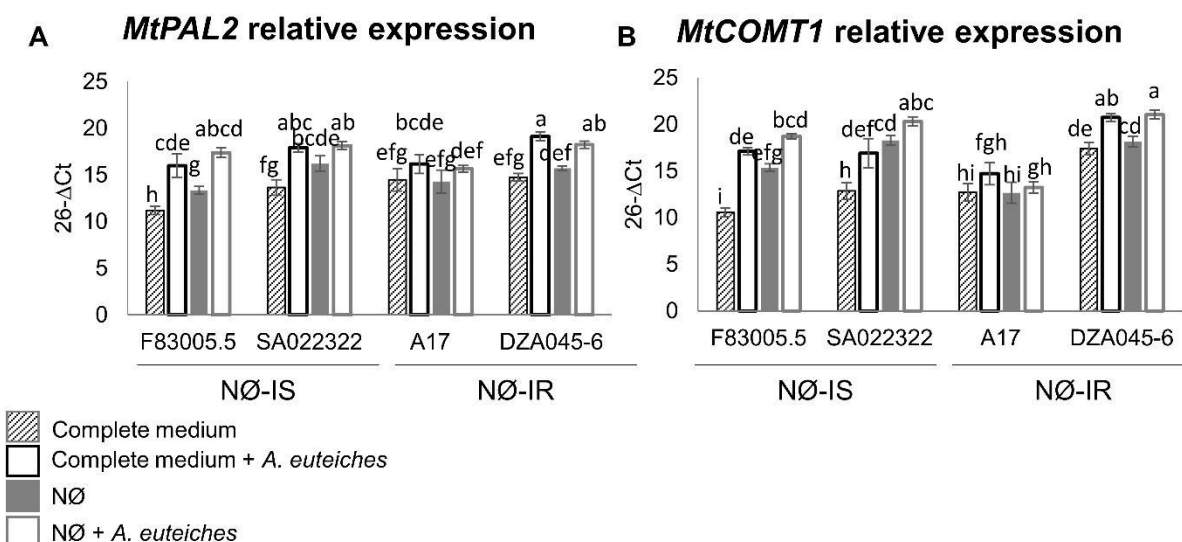


Fig. 5: Expression analysis of secondary metabolism and defense genes (A) and N-related genes (B) in the four selected genotypes

Gene expression levels were determined using *MtEF1* as reference gene in the four *M. truncatula* genotypes, F83005.5, SA022322, A17 and DZA045-6, roots after ten days of culture on complete medium or NØ medium and inoculated (+) or not (-) with *A. euteiches*. Expression data were visualized using the MultiExperiment Viewer (MEV) software. Color scale limits were the lowest (blue) and highest (yellow) expression levels for either all the secondary metabolism/defense genes or for all the N-related genes.



Supplementary Fig. S2. Secondary metabolism and defense related-genes are differentially expressed between NØ-IS and NØ-IR genotypes

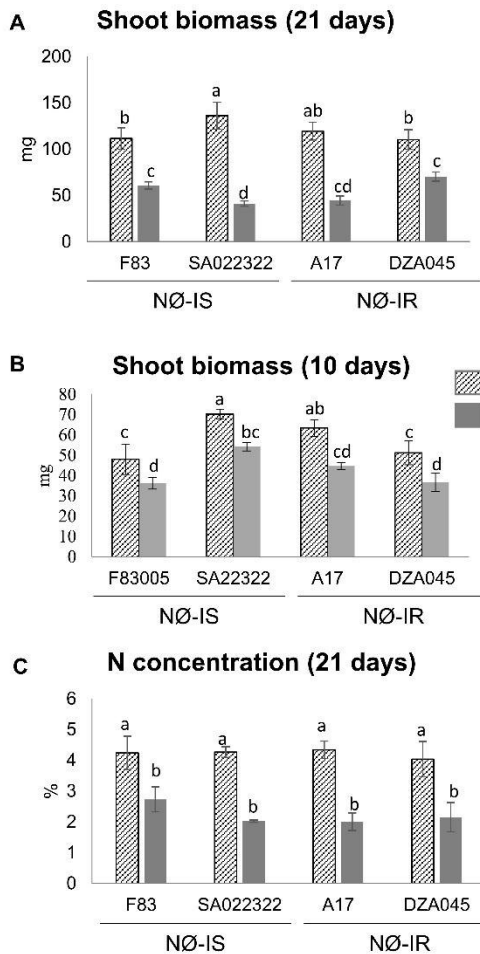
Relative expression levels of *MtPAL2* (A) and *MtCOMT1* (B). Plants were cultivated *in vitro* for ten days on complete medium or NØ medium and inoculated by *A. euteiches*. The experiment was performed on four genotypes (F83005.5, SA022322, A17 and DZA045-6). Error bars indicate standard error (n = 4) and letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

***N*-deficiency leads to genotype-specific responses and highlights the low *N*-responsiveness of DZA045-6**

To assess whether NØ-IR could be linked to an induction of plant defences due to N stress, we analysed the response of the four genotypes to N-deficiency at the growth and gene expression levels. As shown in Supplementary Fig. S3, N-deficiency affected all genotypes resulting in lower shoot biomass compared to complete medium at 10 and 21 days of culture (Supplementary Fig. S3A and B) and lower shoot N concentrations at 21 days (Supplementary Fig. S3C). No effect of genotype could be evidenced on N concentration. Shoot biomass, however, responded to N-deficiency differently depending on plant genotype (Supplementary Fig. S3). At 21 days of culture, the highest decrease in shoot biomass upon N-deficiency was observed for SA022322 and the lowest decrease for F83005.5, highlighting thereby that these two genotypes responded differently to N-deficiency despite displaying both NØ-IS.

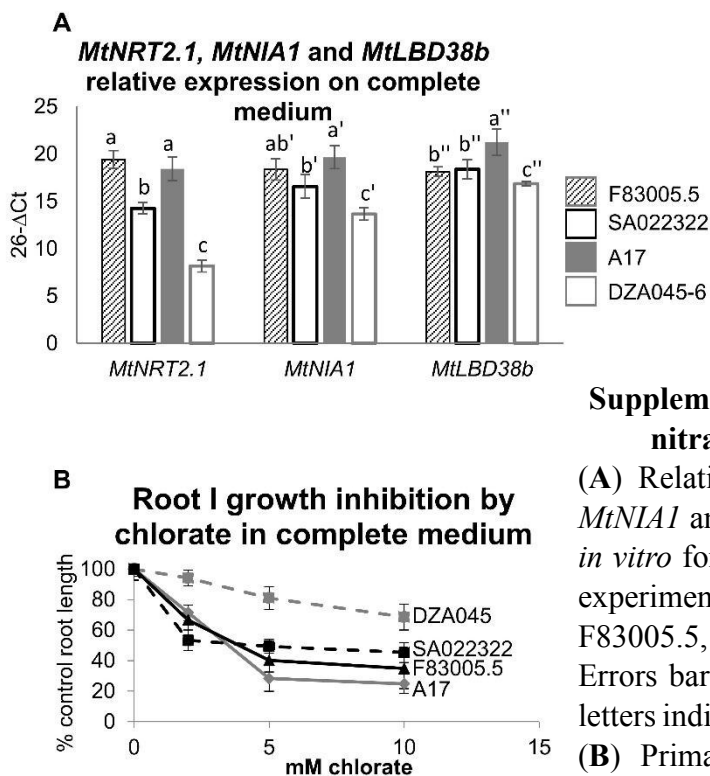
We analysed the expression of genes involved in N metabolism: *MtNIA1* and *MtNIA2* which encode two isoforms of nitrate reductase, *MtNRT2.1* and *MtNRT2.3* which encode nitrate transporters (Pellizzaro *et al.*, 2015), *MtGS1a*, *MtGS1b* and *MtGS2a* genes which encode respectively the two cytosolic, and the major plastid-located glutamine synthetase enzymes (Seabra *et al.*, 2013). We also studied the mRNA levels of the *MtLBD38* gene, a putative homolog of the Arabidopsis nitrate-induced *AtLBD38/37* genes which affect N responses in *Arabidopsis* (Rubin *et al.*, 2009).

Quantitative RT-qPCR analyses were performed in *M. truncatula* roots after 10 days of culture to assess whether the four genotypes expressed differentially these genes. Two main conclusions can be drawn from the data displayed in Fig. 5B. Firstly, the F83005.5, SA022322 and A17 genotypes can be discriminated in complete medium from the DZA045-6 genotype based on the expression profiles of several nitrate-regulated genes (*MtNRT2.1*, *MtNIA1* and *MtLBD38*). These nitrate-regulated genes display a strongly reduced basal expression level (at least 4 fold lower) in DZA045-6 (Fig. 5B, Supplementary Fig. S4A). This altered response to nitrate of DZA045-6 was confirmed by its reduced sensitivity to chlorate, a toxic analog of nitrate, compared to the three other genotypes (Supplementary Fig. S4B). Secondly, on complete medium for the NØ-IS genotypes, inoculation led to a significant increase of *MtGS1a* and *MtGS1b* (but not of *GS2a*) mRNA levels which was not observed in NØ-IR genotypes in complete medium. Therefore our developmental and gene analyses did not highlight N responses specific to NØ-IS or NØ-IR genotypes apart from *GS1* induction in inoculated roots of NØ-IS genotypes on complete medium.



Supplementary Fig. S3. Analysis of the response to N-deficiency of the four selected genotypes

(A) N concentration in shoots and (B) shoot biomass at 21 days. (C) Shoot biomass at 10 days. Error bars indicate standard errors ($n = 4-6$) and letters indicate significant differences ($p < 0.05$).



Supplementary Fig. S4. Altered response to nitrate of the DZA045-6 genotype.

(A) Relative expression levels of *MtNRT2.1*, *MtNIA1* and *MtLBD38b*. Plants were cultivated *in vitro* for ten days on complete medium. The experiment was performed on four genotypes: F83005.5, SA022322, A17 and DZA045-6. Errors bars indicate standard error ($n = 4$) and letters indicate significant differences ($p < 0.05$). (B) Primary root length based on different concentrations of chlorate. Errors bars indicate standard error ($n = 4$).

***A. euteiches* infection induces higher concentrations of specific amino acids in NØ-IS genotypes than in NØ-IR genotypes.**

To analyse more precisely whether the four selected genotypes differed in their N economy, the concentrations of different amino acids in roots were determined in the different genotypes after 10 days culture on complete medium or on NØ in the presence or not of *A. euteiches* (Supplementary Table S2). In non-inoculated roots, cultivation on NØ medium led to marked changes in amino acids concentrations. We observed a significant decrease in the concentration of total amino acids on NØ medium in A17 and DZA045-6, the two genotypes showing NØ-IR (Supplementary Fig. S5A). Six amino acids (Gln, Arg, Lys, Tyr, Met, Trp) showed interesting profiles as they responded to *A. euteiches*, differently according to genotypes (Fig. 6). In complete medium, upon inoculation, a significant increase of these six amino acids was observed in F83005.5 and SA022322 (NØ-IS genotypes) whereas a lower increase or no significant change was observed in the NØ-IR genotypes (A17 and DZA045-6), resulting in about 2-3 fold lower contents of these amino acids in the latter genotypes when inoculated (Fig. 6A, Supplementary Table S2). In NØ medium the profiles of these amino acids changed due in particular to an enhanced basal level of the minor amino acids Lys, Tyr, Met and Trp in F83005.5, SA022322 and A17 but not in DZA045-6, stressing again the altered N-response of the latter genotype (Fig. 6B). The enhanced basal levels of these amino acids in NØ medium in the former genotypes represent more generally a change in minor amino acid homeostasis (Supplementary Fig. S5B) already highlighted during N starvation in *Arabidopsis* roots (Krapp *et al.*, 2011). On NØ compared to complete medium, induced levels of all six amino-acids increased in A17 genotype whereas they remained stable or decreased in NØ-IS genotypes except for Gln and Lys which increased significantly in the SA022322 genotype. Therefore on NØ, only Gln and marginally Met levels remained strongly reduced (1.5 to 2 fold lower) in inoculated NØ-IR genotypes compared to inoculated NØ-IS genotypes (Fig. 6B). Thus only Gln (and possibly Met) levels discriminated inoculated NØ-IR and NØ-IS genotypes on both complete and N-deficient media with high levels of Gln correlated with lower levels of resistance. Based on these results and literature reporting a specific role of Gln in plant pathogen interactions (Liu *et al.*, 2010; Tavernier *et al.*, 2007), we decided to investigate the involvement of this amino acid in *A. euteiches* infection and plant resistance.

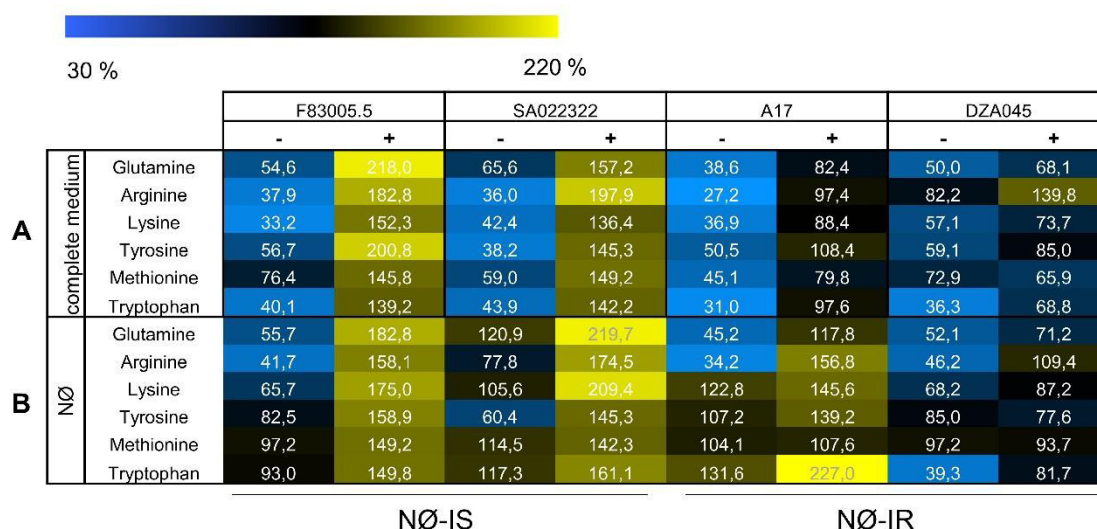
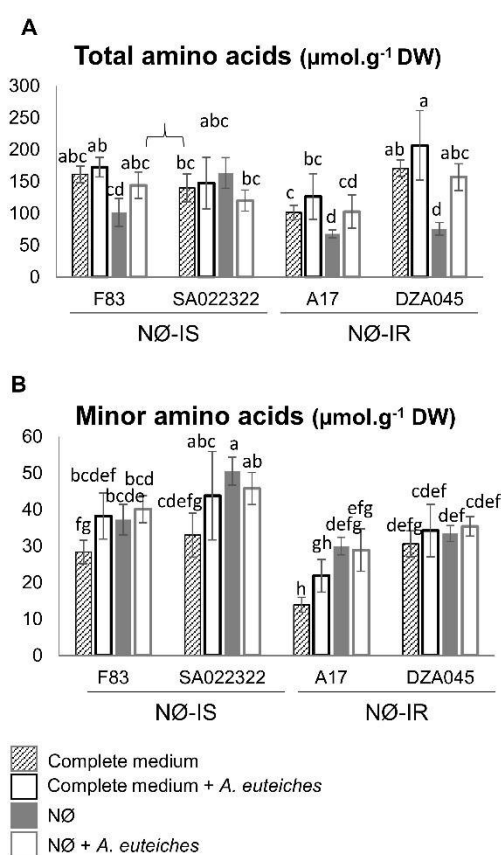


Figure 6: Root contents on complete medium (A) and NØ medium (B) in the six specific amino acids that are induced by *A. euteiches* in NØ-IS genotypes on complete medium

Amino acid quantification was performed on four genotypes (F83005.5, SA022322, A17 and DZA045-6). Plants were cultivated *in vitro* for ten days on complete medium or NØ medium and inoculated (+) or not (-) by *A. euteiches*. Amino acids were measured on three biological replicates. The percentage of the average level of each amino acid is displayed for the four selected genotypes in each condition. The color scale limits were 30% (blue) and 220% (yellow) of the root amino acid average content.



Supplementary Fig. S5. Quantification of total and minor amino acids levels in roots of the four selected genotypes.

(A) Total amino acids levels. (B) Minor amino acids levels. DW = dry weight. Amino acid quantification was performed on four genotypes (F83005.5, SA022322, A17 and DZA045-6). Plants were cultivated *in vitro* for ten days on complete medium or NØ medium and inoculated or not with *A. euteiches*. Amino acid levels were measured on three biological replicates. Error bars indicate standard errors (n = 3) and letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

Gln is a mediator of *M. truncatula* /*A. euteiches* interaction

To test the effect of Gln on plant susceptibility to *A. euteiches* we tested whether adding Gln to plant culture medium would induce susceptibility in a condition where normally plant is resistant. For this we cultivated the NØ-IR genotype A17 on the NØ medium supplemented with Gln as sole N source. We observed an increase of root infection of A17 in this case compared to NØ medium, but also compared to complete medium containing nitrate (Fig. **7A**).

Conversely we tested whether reducing *M. truncatula* susceptibility to *A. euteiches* was correlated with a decrease in Gln levels. For this we treated the NØ-IS genotype (F83005.5) with β amino-butyric acid (BABA), a non-protein amino acid known to prime plant response to biotic stress (Conrath *et al.*, 2002). We observed that BABA treatment decreased susceptibility to *A. euteiches* (Fig. **7B**) concomitantly with a significant decrease in endogenous Gln content (- 50 %) in plant infected by *A. euteiches*. Interestingly, as previously reported in another biological model (Wu *et al.*, 2010), the addition of Gln reversed partially the protection effect of BABA (Fig. **7B**). Therefore these experiments highlight a role of Gln in *M. truncatula*/*A. euteiches* interaction.

	F83005.5				SA022322				A17				DZA045			
	complete medium	complete medium + A. euteiches	NØ	NØ + A. euteiches	complete medium	complete medium + A. euteiches	NØ	NØ + A. euteiches	complete medium	complete medium + A. euteiches	NØ	NØ + A. euteiches	complete medium	complete medium + A. euteiches	NØ	NØ + A. euteiches
Histidine	2,6 ^{ef}	6,5 ^{de}	4,3 ^{ef}	7,0 ^{cd}	6,1 ^{bode}	11,3 ^a	9,5 ^{bco}	9,9 ^{bc}	1,7 ^f	3,7 ^{def}	6,7 ^{bcd}	7,1 ^{bcd}	5,2 ^{def}	6,7 ^{bcd}	6,1 ^{cdde}	6,2 ^{bode}
Asparagine	110 ^{ab}	100,2 ^{abc}	47,1 ^{def}	75,6 ^{bcdef}	86 ^{bode}	76,6 ^{bcddef}	90,7 ^{abcd}	37,8 ^{efg}	69,3 ^{bcddefg}	79,3 ^{bcddef}	21 ^g	50 ^{cddefg}	117,6 ^{ab}	149,5 ^a	28 ^{fg}	103,9 ^{ab}
Serine	8,7 ^{bc}	6,7 ^{bcde}	7,9 ^{abc}	5,1 ^{de}	8,3 ^{bc}	6,4 ^{bcddef}	9,5 ^{bc}	6,6 ^{bode}	4,6 ^e	6,2 ^{bc}	7,1 ^{bcde}	5,4 ^{de}	9,6 ^{bc}	9,6 ^{bc}	7,3 ^{bcde}	8,1 ^{bc}
Glutamine	4,3 ^a	16,1 ^a	4,1 ^a	13,5 ^{ab}	4,8 ^{bc}	11,6 ^{bc}	8,9 ^{cd}	16,2 ^a	2,9 ^f	6,1 ^{de}	3,3 ^e	8,7 ^{cd}	3,7 ^e	5 ^{de}	3,8 ^e	5,3 ^{de}
Arginine	0,6 ^{cd}	2,9 ^{ab}	0,7 ^{cd}	2,5 ^{ab}	0,6 ^{cd}	3,1 ^a	1,2 ^{bcd}	2,8 ^{bc}	0,4 ^e	1,5 ^{bcd}	0,5 ^{cd}	2,5 ^{ab}	1,3 ^{bcd}	2,2 ^{abc}	0,7 ^{cd}	1,7 ^{abcd}
Glycine	1,4 ^{abc}	1,3 ^{abcd}	0,8 ^{cd}	0,9 ^{bcd}	1,4 ^{bc}	1 ^{bcde}	1,1 ^{bcdef}	0,6 ^{cd}	0,7 ^e	0,9 ^{bcde}	0,8 ^{cd}	1 ^{bcde}	1,6 ^{bc}	1,3 ^{abcd}	0,9 ^{cd}	0,9 ^{cd}
Aspartate	3,4 ^{bc}	3,3 ^{ab}	2 ^{de}	2,3 ^{bcde}	2,5 ^{bcde}	3 ^{bcde}	1,9 ^{de}	3,2 ^{abc}	2,9 ^{abcde}	3,8 ^a	1,9 ^{de}	1,78 ^e	3,1 ^{abcde}	3,7 ^a	2,1 ^{bcde}	2 ^e
Glutamate	6,7 ^{abc}	7 ^{ab}	4,4 ^{ef}	5,6 ^{bcddef}	5,5 ^{bcddef}	5,8 ^{abcde}	4,4 ^{ef}	6,4 ^{abcd}	5,1 ^{cddef}	7,5 ^a	4,1 ^f	4,9 ^{cddef}	6,1 ^{abcde}	7 ^{ab}	4,8 ^{def}	4,7 ^{def}
Threonine	11,4 ^e	11 ^c	16,2 ^{ab}	12,8 ^{bc}	12,8 ^{bc}	11,5 ^c	19,3 ^a	11,7 ^c	1,9 ^f	2,1 ^d	2,5 ^d	1,6 ^d	9 ^e	9,3 ^e	9,7 ^e	12,4 ^c
Alpha-Alanine	2,9 ^{bc}	3 ^{ab}	2,7 ^{bc}	2,5 ^{ab}	2,8 ^{bc}	2,5 ^{ab}	2,7 ^{bc}	3,9 ^a	2,6 ^{bc}	3,3 ^{bc}	3,5 ^{ab}	3,5 ^{ab}	3,6 ^{bc}	2,8 ^{ab}	2,6 ^{bc}	2,2 ^{bc}
GABA	2,8 ^{abcd}	1,8 ^{cd}	2,1 ^{abcd}	1,9 ^{bcd}	3,1 ^{abc}	1,8 ^{bcd}	2,2 ^{abcd}	3 ^{abc}	3,3 ^a	2,5 ^{abcd}	2,1 ^{abcd}	2,4 ^{abcd}	3,1 ^{abc}	1,9 ^{abcd}	1,6 ^{cd}	1,4 ^d
Proline	1,8 ^{bc}	1,7 ^{bc}	1 ^{de}	1,7 ^{bc}	0,6 ^{de}	1,4 ^{bcd}	1 ^e	2,9 ^a	0,8 ^e	1,2 ^{bcde}	1 ^{de}	1,6 ^{bcd}	1,3 ^{bcde}	1,3 ^{bcde}	1,3 ^{bcde}	1,1 ^{de}
Lysine	0,5 ^f	2,5 ^{bc}	1,1 ^{efg}	2,5 ^{ab}	0,7 ^{fg}	2,2 ^{bc}	1,7 ^{gh}	3,4 ^a	0,6 ^f	1,4 ^{def}	2 ^{cd}	2,4 ^{bc}	0,9 ^{fg}	1,2 ^{def}	1,1 ^{efg}	1,4 ^{def}
Tyrosine	0,6 ^f	1,6 ^a	0,7 ^{def}	1,3 ^{ab}	0,3 ^g	1,2 ^{bc}	0,5 ^{ef}	1,2 ^{bc}	0,4 ^f	0,9 ^{cd}	0,9 ^{cd}	1,1 ^{bc}	0,5 ^f	0,7 ^{def}	0,7 ^{def}	0,6 ^{def}
Methionine	0,2 ^{defg}	0,4 ^a	0,3 ^{def}	0,4 ^a	0,2 ^{fg}	0,4 ^a	0,3 ^{def}	0,4 ^{ab}	0,1 ^g	0,2 ^{defg}	0,3 ^{de}	0,3 ^{bcde}	0,2 ^{efg}	0,2 ^{efg}	0,3 ^{bcde}	0,3 ^{bcde}
Valine	1,7 ^{abc}	2,3 ^{bc}	2,3 ^{bc}	2,5 ^{bc}	1,7 ^{bcde}	2,8 ^{ab}	3 ^{ab}	3,3 ^a	1,3 ^g	1,8 ^{abc}	2,4 ^{abcd}	1,8 ^{bcde}	1,5 ^{efg}	1,5 ^{efg}	1,5 ^{efg}	1,4 ^{fg}
Isoleucine	0,8 ^f	1,1 ^{bcdef}	1,9 ^b	1,7 ^{bcd}	0,7 ^f	1,2 ^{bcd}	1,8 ^{bc}	1,6 ^{bc}	1 ^{def}	1,2 ^{bcd}	3,3 ^a	1,7 ^{bcde}	0,9 ^{fg}	1 ^{def}	1,1 ^{bcdef}	1,1 ^{bcdef}
Leucine	0,7 ^{fg}	1,3 ^{def}	1,6 ^{cd}	1,4 ^{bcd}	0,8 ^{fg}	1,3 ^{de}	1,4 ^{bcd}	2,3 ^a	0,5 ^f	0,8 ^{efg}	1,9 ^{ab}	1,3 ^{cd}	0,7 ^{fg}	0,7 ^{fg}	1 ^{efg}	0,8 ^{fg}
Phenylalanine	0,5 ^{gh}	0,6 ^{abcde}	0,8 ^a	0,6 ^{bc}	0,4 ^h	0,6 ^{abc}	0,7 ^{bc}	0,6 ^{bcde}	0,5 ^{gh}	0,7 ^{bc}	0,7 ^{abc}	0,8 ^{ab}	0,4 ^{gh}	0,4 ^h	0,4 ^{gh}	0,4 ^h
Tryptophane	0,5 ^{gh}	1,8 ^{cd}	1,2 ^{defg}	2 ^{bc}	0,6 ^h	1,9 ^{cd}	1,6 ^{bcde}	2,1 ^b	0,4 ^h	1,3 ^{bcdef}	1,7 ^{bcde}	3 ^a	0,5 ^{gh}	0,9 ^{efg}	0,5 ^{gh}	1,1 ^{defg}

Supplementary Table 2. Modification of root amino acid concentrations in response to *A. euteiches* and to N-deficiency.

Amino acid quantification was performed on four genotypes (F83005.5, SA022322, A17 and DZA045-6). Plants were cultivated *in vitro* for ten days on complete medium or NØ medium and inoculated or not with *A. euteiches*. Amino acids were measured on three biological replicates. Values are expressed in µmol per gram dry weight. Letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

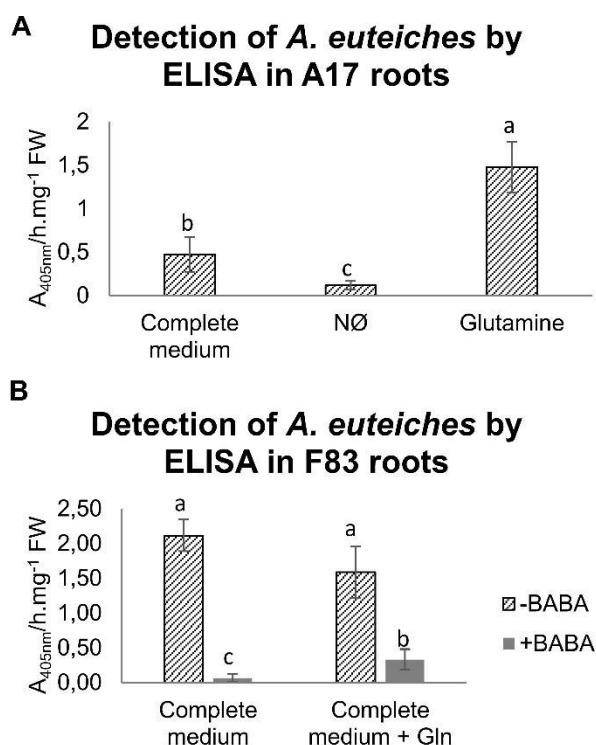


Fig. 7: Glutamine effect on susceptibility to *A. euteiches*

Quantification by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of *A. euteiches* in root extracts. (A) A17 genotype was cultivated *in vitro* for three weeks on complete medium, NØ medium or glutamine medium and inoculated with *A. euteiches*. (B) F83 genotype was cultivated *in vitro* for three weeks on complete medium with 200 µM of BABA or not, or complete medium + 200 µM of Gln and 200 µM of BABA or not. Background signal from control non-inoculated roots was subtracted from the signal detected in inoculated roots. Error bars indicate standard error (n = 6 for ELISA tests) and letters indicate significant differences ($p < 0.05$). Data from a representative experiment out of three (A) and two (B) independent experiments are shown.

DISCUSSION

Many studies indicate the role of N (N) on the interaction between a plant and a pathogen but its effects are not clear and conflicting results were reported. In our study we observed that N availability affects *M. truncatula* susceptibility to the hemibiotrophic oomycete *A. euteiches*. This result was not linked, however, to the pathogen lifestyle but to plant genotype. For instance, we observed (1) genotypes that become more susceptible to *A. euteiches* on NØ (e.g. F83005.5 and SA022322, referred to as NØ-IS genotypes) and (2) genotypes that become more resistant to *A. euteiches* on NØ medium (e.g. A17 and DZA045-6) compared to complete medium, referred to as NØ-IR genotypes.

On complete medium SA02864 displayed the highest resistance and F83005.5 the lowest while A17 displayed intermediate resistance but lower than DZA045-6 (Fig. 3). Though the exact classification of the different genotypes can differ depending on the experimental conditions, this classification is similar to that found by others (Bonhomme *et al.*, 2014), confirming thereby the relevance of our assessment of resistance to *A. euteiches*. No correlation could be made, however, between genotype resistance on complete medium and its behavior on NØ medium (NØ-IS or NØ-IR). For example R108 and DZA045-6 showed a similar resistance to *A. euteiches* in complete medium (Fig. 3), yet the former genotype displayed NØ-IS while the latter displayed NØ-IR.

We proposed different hypotheses to explain the genotypic variability of N modulation of *Medicago truncatula* resistance to *A. euteiches*.

First, we tested whether N modulation of plant resistance could be linked to a genetic variability of the regulation by N of plant defence response. We analysed the contribution of soluble phenolic compounds which play an important role in resistance to *A. euteiches*. Indeed, (Djébali *et al.*, 2011) showed that the difference in resistance between A17 and F83005.5 genotypes could be explained, in part, by an increase in soluble phenolics at 3 dpi in infected A17 roots which does not occur in the sensitive F83005.5 genotype. Furthermore secondary metabolites, in particular phenylpropanoids and flavonoids, accumulate during low N nutrition (Fritz *et al.* 2006) and could thus play a role in NØ-IR. Quantification of soluble phenolics did not highlight significant differences between genotypes. It is possible that at this stage where N-deficiency occurs (10 d of culture), the differences in levels of soluble phenolics occurring at an earlier stage (3-6 dpi, (Djébali *et al.*, 2011)) between tolerant and susceptible genotypes are overridden by developmentally- and N-deficiency-induced increases in soluble phenolics. However, analysis of the expression of genes involved in secondary metabolism or in defence

(Figure 5A) highlighted that their expression levels were correlated in many cases with plant resistance level on complete medium and confirmed the potential importance of these genes as stressed in the analysis of NR and NS near isogenic lines (Badis *et al.*, 2015). Our data show in addition that the expression of these genes is modulated by N-deficiency, but no correlation was observed between gene expression and genotype resistance on NØ medium, suggesting also that mechanisms leading to NØ-IR and NØ-IS do not involve the same genes.

Second, these contrasted behaviors in response to *A. euteiches* in NØ medium could be due to differences in plant capacity to use efficiently N from the culture medium and/or to mobilize its N resources upon N-deficiency. To our knowledge, only a few studies have reported the effect of plant genetic diversity on the modulation of resistance by N. In rice, (Ballini *et al.*, 2013) have shown that high N input increases susceptibility against *Magnaporthe oryzae*. They addressed the question of N induced susceptibility (NIS) polymorphism across rice diversity and suggested a possible link between N Use Efficiency (NUE) and NIS such that genotypes with high NUE displayed high NIS levels and vice-versa. In order to assess this link, we measured parameters associated with NUE (Shoot biomass and shoot N concentration) and monitored the expression of genes involved in nitrate transport and assimilation/regulation (*NRT2.1*, *NIA* and *LBD38*) as well as chlorate resistance in the four *M. truncatula* contrasted genotypes and determined amino acid levels and composition in the different genotypes cultivated in different conditions. Though all genotypes responded to N starvation, the modalities of plant adaptation to this nutritional stress varied. Indeed, these different analyses set clearly the DZA045-6 genotype apart from the other genotypes as it displayed lower expression of nitrate-related genes on complete medium and strongly reduced amino acid changes in response to N-deficiency, suggesting an altered response to nitrate and N deprivation compared to the other genotypes. A more thorough characterization of the DZA045-6 genotype would be of interest to assess the importance of altered N response in different processes including the setting up and regulation of symbioses.

NØ medium affected the different N-related parameters but no significant differences discriminating between NØ-IR and NØ-IS genotypes were observed. In particular, as mentioned, above though the DZA045-6 was NØ-IR like the A17 genotype it displayed an altered response to nitrate compared to A17 (Fig. 5B and Supplementary Fig. S4). Likewise the two NØ-IS genotypes F83005.5 and SA022322 displayed respectively the lowest and highest decrease in shoot biomass upon N-deficiency (Supplementary Fig. S3). These results suggest that N modulation of plant resistance to *A. euteiches* is not correlated with plant response to N availability. This is further supported by the fact that genotypes such as F83005.5 and

SA028064 displaying a similar response to N availability from ecophysiological studies (Zancarini *et al.*, 2012) showed a contrasted behavior (NØ-IS and NØ-IR, respectively) in response to *A. euteiches* under N-deficiency (Fig. 3). Taken together, these results indicate that the genotype-dependent modulation of resistance by N-deficiency could not be explained by different nutritional strategies of the different genotypes during N-deficiency.

The analysis of amino acid composition highlighted six amino acids (Gln, Arg, Lys, Tyr, Met, Trp) which were highly induced by infection in NØ-IS genotypes but much less or not at all in NØ-IR genotypes in complete medium. Several of these amino acids are involved in plant defence through the production of nitric oxide and polyamines (Arg, Met), ethylene (Met), or as substrate (Lys) for the production of pipercolic acid which plays a key role in plant immunity or as precursors of secondary metabolites (Trp, Tyr). The increase in the latter amino acids was partly correlated with the increase in root phenolic content in response to *A. euteiches*. The enhanced content of Trp/Tyr in infected roots could therefore reflect a metabolic shift towards both synthesis and metabolism of aromatic amino acids as already reported during plant-pathogen interactions (Ward *et al.*, 2010). In NØ medium, the differences in these amino acid levels between inoculated NØ-IS genotypes and the inoculated NØ-IR genotype A17 were attenuated for most minor amino acids. Only Gln levels discriminated between NØ-IS and NØ-IR genotypes in both N replete and deficient conditions, with high Gln levels associated with enhanced plant susceptibility.

This positive correlation was further sustained by two other experiments. (1) Gln provision prevented NØ-IR and led even to enhanced susceptibility compared to complete medium (containing nitrate as sole N source), stressing the specific role of Gln in favoring *A. euteiches* infection. (2) Conversely a treatment (BABA) inducing resistance in a NØ-IS genotype was correlated with lower levels of Gln and was partially reverted by adding Gln.

Gln is known to play a role in plant-pathogen interaction. On the pathogen side, glutamine is well known to be a favorable N source for fungal development *in vitro* (Tudzynski, 2014) and high levels of Gln *in planta* could therefore favor pathogen growth. N limitation, however, was proposed to be a key cue in activating virulence and the switch from biotrophy to necrotrophy in hemibiotrophic fungi (Pellier *et al.*, 2003; Snoeijsers *et al.*, 2000). Gln was indeed shown to repress fungal virulence in the hemibiotrophic fungus *Fusarium oxysporum* and the formation of appressoria, highly specialized infection structures, in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* (López-Berges *et al.*, 2010; Marroquin-Guzman and Wilson, 2015). On the plant side reports show that the plant metabolic pathways activated during necrotrophic stage are similar to those induced during senescence (Swartzberg *et al.*, 2007; Tavernier *et al.*,

2007). Accumulation of glutamine linked to N remobilization by cytosolic GS in plant host was proposed to be involved in plant defence in response to *Colletotrichum lindemuthianum* (Tavernier *et al.*, 2007) and was correlated with the onset of the necrotrophic phase of the pathogen. Gln accumulation was proposed to signal to the pathogenic fungus that plant was translocating N and possibly trigger the onset of the necrotrophic stage. In complete medium, we did indeed observe a higher accumulation of transcripts of the GS1a and GS1b genes upon root inoculation in the lines displaying NØ-IS, suggestive of the induction of N remobilization during pathogen infection, but this was not observed on NØ medium for the SA022322 genotype (Fig. 5B). It would be interesting therefore to test whether other types of regulation affect GS since tyrosine-nitration of GS1a has been proposed to control plant-microbe interactions in *M. truncatula* (Melo *et al.*, 2011). More recent studies have identified Gln as an important mediator of plant-pathogens interactions through redox modulation. (Liu *et al.*, 2010) showed that knocking out a single amino acid transporter gene (*LHT1*), that uses Gln as a main substrate, is sufficient to confer resistance of *Arabidopsis* against a large spectrum of pathogens. These studies highlighted the specific role of Gln rather than plant N status in plant defence with Gln-deficiency leading to the activation of plant defence responses by enhancing cellular redox stress. Our data are consistent with this role of Gln in plant immunity as more susceptible genotypes displayed higher Gln contents upon infection and conditions favoring Gln accumulation increase *A. euteiches* infection.

The effect of Gln on plant immunity appears to be broad because it decreased also the protection against *A. euteiches* conferred by BABA on the susceptible F83005.5 genotype. Gln was reported to revert a wide range of phenotypes induced by BABA including reduced plant growth, anthocyanin accumulation, resistance to heat stress and resistance to a bacterial pathogen (Wu *et al.*, 2010). This reversal was attributed to the alleviation of an amino acid stress induced by BABA as it is a non proteinogenic amino acid which cannot be metabolized by plants. BABA was reported to alter amino acid balance (Luna *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2010), but whether BABA affected Gln levels was not reported.

In conclusion, in this work we show that N-deficiency affects *M. truncatula* resistance to *A. euteiches* and this is dependent on plant genotype. Mechanisms leading to NØ-IR or IS seem independent of those involved in quantitative resistance (Badis *et al.*, 2015; Djéballi *et al.*, 2011) and of plant perception of N-deficiency. Finally, we have identified Gln as a N source important for *A. euteiches* infection. This suggests the role of Gln in a cross-talk between plant and pathogen but the exact mechanisms involving Gln production and effects on *A. euteiches* infection remain unknown.

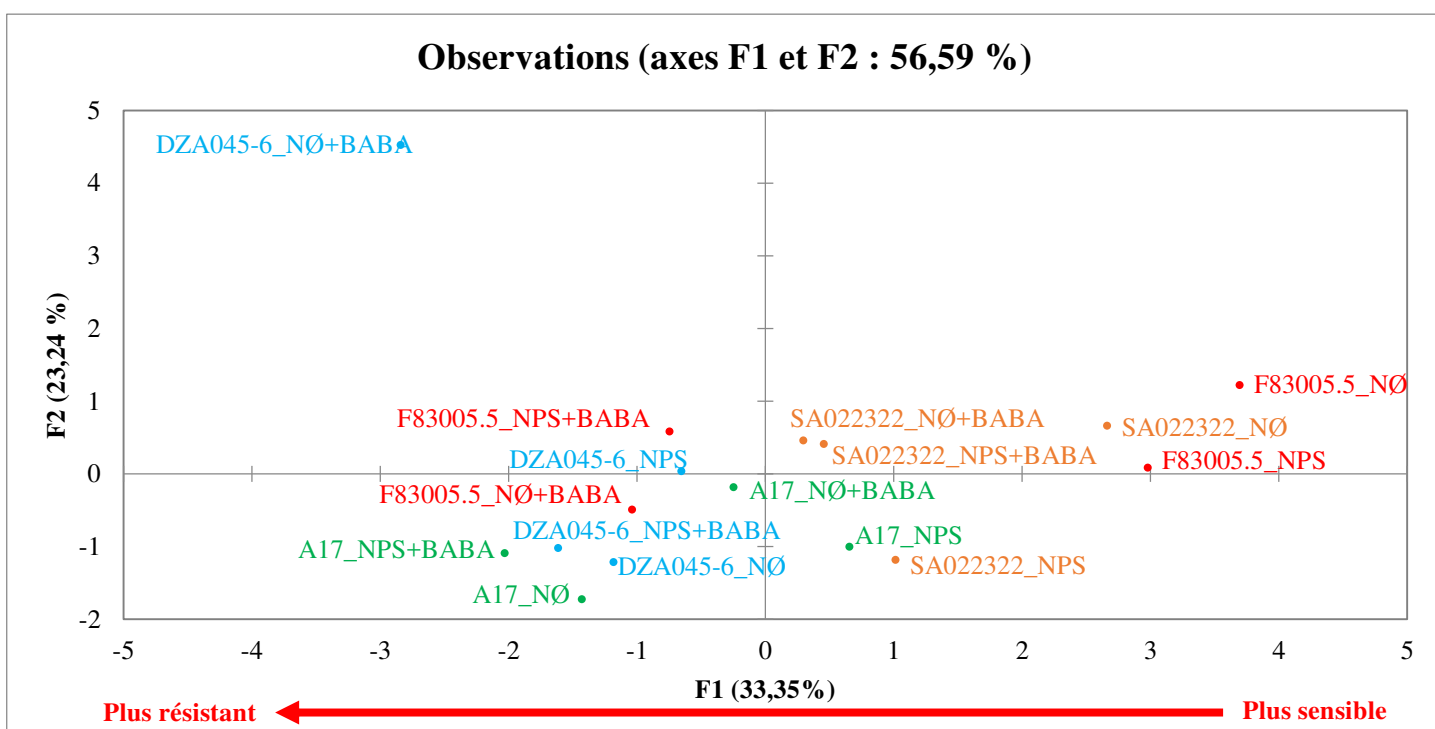
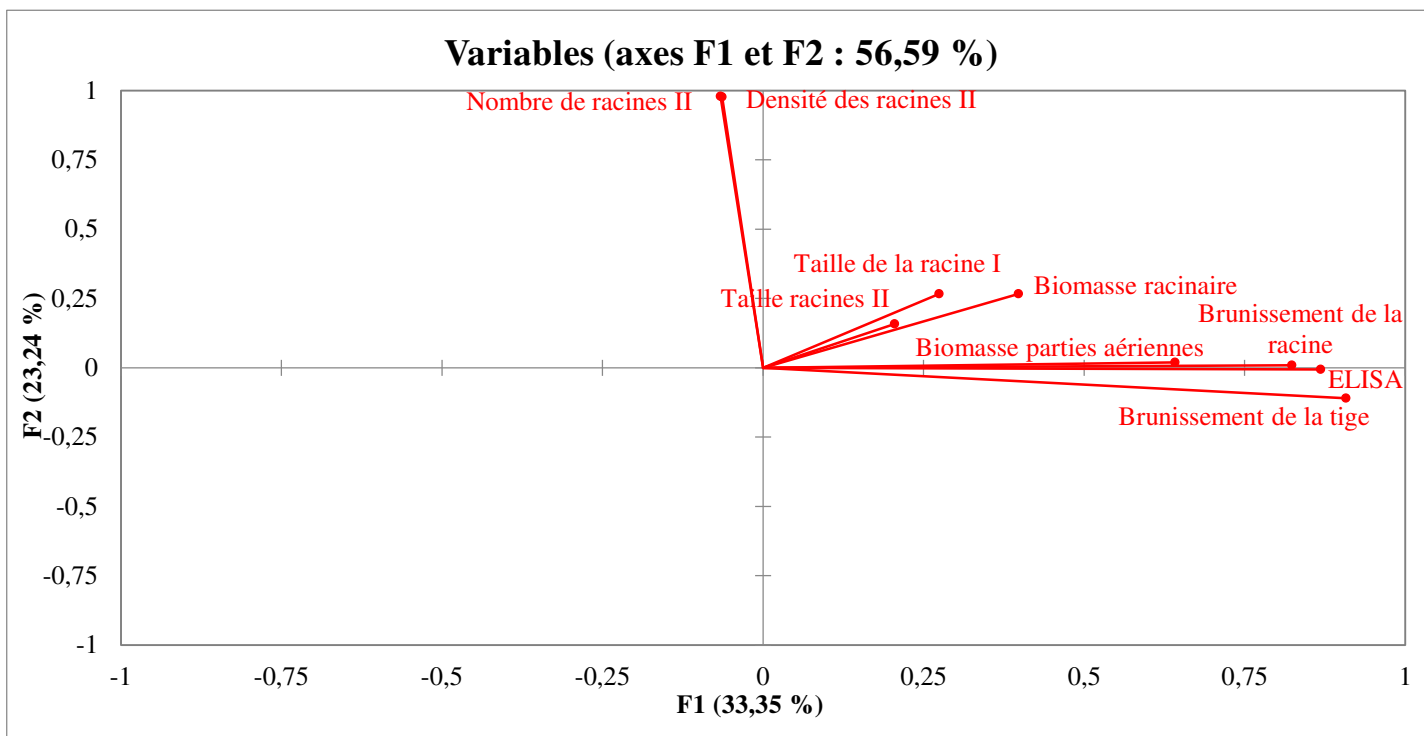


Figure I.25: Graphique représentatif d'une analyse en composante principale

Les génotypes suivants sont représentés sur ce graphique: A17 en vert, F83005.5 en rouge, DZA045-6 en bleu et SA022322 en orange. Chaque génotype est représenté dans 4 conditions différentes: en milieu complet (NPS), en milieu complet en présence de 200 μM de BABA (NPS+BABA), en milieu carencé en nitrate (NØ), en milieu carencé en nitrate avec 200 μM de BABA (NØ+BABA). Le graphique présenté correspond à une expérience représentative de deux expériences indépendantes. Les composantes principales représentées ici ont été obtenues à partir des variables suivantes : taille de la racine I, taille et nombre de racines II, biomasse aérienne et racinaire, pourcentages de brunissement de la tige et de la racine I et quantité d'agent pathogène (ELISA).

2.3 Résultats complémentaires: protection par le BABA de *M. truncatula* à *A. euteiches* sur milieu complet ou carencé (NØ)

Les premières expériences ont permis de montrer une diminution de la sensibilité d'A17 sur milieu NØ et un effet protecteur du BABA sur la sensibilité de F83005.5 à *A. euteiches*. Nous avons alors décidé de réaliser les expériences sur milieu complet (NPS) et carencé en nitrate (NØ), en présence ou non de BABA (200 µM).

L'ACP présentée ici (Figure I.25), montre les résultats pour les quatre génotypes dont les analyses ont été plus poussées (*cf. publication*). Le graphique rend compte de 56 % de la variabilité. L'axe F1 est fortement corrélé aux paramètres de sensibilité à *A. euteiches*, ce qui correspond au fait que plus un génotype sera situé du côté positif de l'axe F1, plus celui-ci sera sensible.

La présence du BABA dans le milieu induit, pour tous les milieux et pour tous les génotypes, une augmentation de la résistance à l'agent pathogène. La protection par le BABA est très importante pour F83005.5 et dans le cas du génotype DZA045-6 en milieu NØ, elle s'accompagne de changements dans l'architecture racinaire. En effet, en milieu NØ, une augmentation du nombre de racines secondaires est observée chez DZA045-6 et celle-ci est fortement réduite en présence de BABA. Ceci souligne à nouveau que DZA045-6 est à part pour la réponse à la carence. Nous mettons en évidence, ici, les effets du génotype et du milieu sur leur protection vis-à-vis d'*A. euteiches* par le BABA.

CHAPITRE II

RÔLE DU MONOXYDE D'AZOTE (NO) DANS LA MODULATION DE LA RÉSISTANCE PAR LA CARENCE AZOTÉE

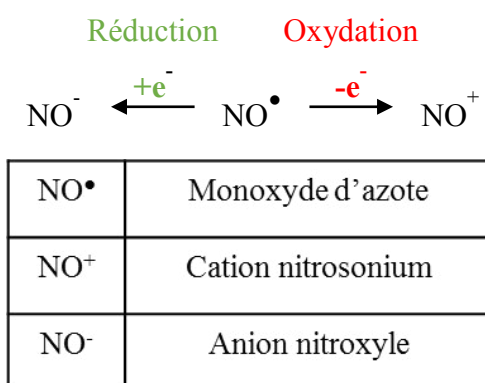


Figure II.1: Oxydation/réduction du monoxyde d'azote

1. Introduction : données bibliographiques

Nous proposons d'étudier dans ce chapitre, les événements moléculaires intervenant au cours de l'interaction *M. truncatula/A. euteiches* et leur modulation par la carence azotée. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à un médiateur important de l'immunité chez les plantes, le monoxyde d'azote (NO) et à certaines molécules qui participent à la régulation de sa concentration et de son activité comme les formes actives de l'azote (RNS) et aux formes actives de l'oxygène (ROS). Nous commencerons ce chapitre par une introduction bibliographique puis nous présenterons les résultats obtenus. Les travaux menés ont permis la publication d'un article scientifique en avril 2016.

1.1 Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) a été découvert en 1772 dans l'air par le théologien et chimiste anglais Joseph Priestley. C'est un gaz diatomique ubiquitaire, formé d'un atome d'azote et d'un atome d'oxygène. Le NO a d'abord été très étudié et décrit chez les animaux pour être impliqué dans divers processus biologiques. Les travaux menés depuis les années 1980 ont montré le rôle du NO dans la neurotransmission, la vasodilatation sanguine, la reproduction, l'embryogenèse, l'inflammation, l'apoptose ou encore l'immunité (Schmidt & Walter, 1994). Depuis sa découverte, il a été montré que le NO était impliqué dans de nombreuses réactions chez tous les règnes du vivant. L'étude de rôle physiologique du NO chez les plantes et les microorganismes suscite un vif intérêt depuis les vingt dernières années.

L'activité du NO est liée à ses caractéristiques chimiques. Sous sa forme radicalaire (NO[•]), le NO possède un électron orbital, lui conférant ses propriétés réactives. L'oxydation de ce radical formera le nitrosonium (NO⁺) ou le gain d'un électron formera le radical nitroxyle (NO⁻), chacun de ces composés présentant des propriétés et réactivités propres (Stamler *et al*, 1992) (Figure II.1). Pour être électroniquement plus stable, le NO interagit avec de nombreuses molécules diverses telles que les lipides, l'ADN et les protéines sur lesquelles il peut engendrer des dommages. Par exemple, il a été montré que le NO était capable d'entraîner la déamination de l'ADN *in vitro* et *in vivo* expliquant probablement l'effet mutagène du NO (Wink *et al*, 1991).

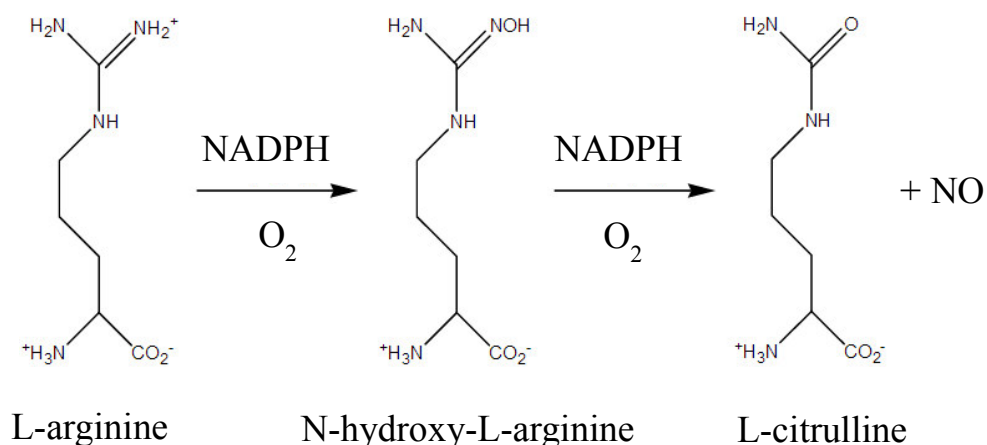


Figure II.2: Transformation de la L-arginine en L-citrulline avec libération de NO

Le NO est synthétisé grâce aux NO synthases qui consomment du NADPH et de l'O₂, pour oxyder la L-arginine en L-citrulline et NO.

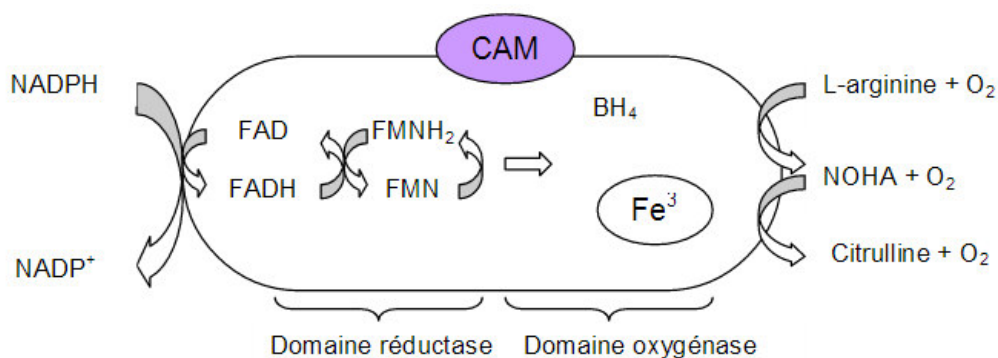


Figure II.3: Fonctionnement générale des NOS animales

Le NADPH est oxydé au niveau du domaine réductase. Les 2 électrons libérés transitent par le FAD, puis par le FMN, avant d'aboutir dans le domaine oxygénase, qui possède les sites de fixation de BH₄ et de l'hème. Ce flux d'électrons n'est possible qu'en présence de calmoduline (CAM).

La réactivité et la durée de vie du NO (1 à 5 s) peuvent être modulées en fonction de son environnement (pH, température, statut redox de la cellule...).

1.2 Biosynthèse du NO

La production et l'émission de NO dans l'atmosphère par les plantes ont été démontrées depuis de nombreuses années. Par exemple, Klepper, (1979) a mis en évidence une production de NO chez le soja traité avec des herbicides inhibiteurs de la photosynthèse. Les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette biosynthèse chez les plantes, ont été étudiés plus tard. Afin de mieux comprendre ces mécanismes, nous décrirons dans un premier temps les principaux systèmes de synthèse de NO chez les animaux.

a. La synthèse de NO chez les animaux

La synthèse de NO est assurée par voie enzymatique, via une famille de protéines appelées oxyde nitrique synthases (NOS). Ces enzymes catalysent la transformation de la L-arginine en L-citrulline et NO (Figure II.2). Chez l'homme, trois isoformes de NOS ont été caractérisées. Deux d'entre elles sont constitutives, les NOS endothéliale (eNOS) et neuronale (nNOS), et la troisième est inductible (iNOS). Ces enzymes nécessitent l'action de plusieurs cofacteurs, comme la flavine mononucléotide (FMN), la flavine adénine dinucléotide (FAD), la calmoduline (CaM) et la tétrahydrobioptérine (BH₄) (Figure II.3). L'activité des eNOS et nNOS est dépendante de la fixation d'une CaM chargée en Ca²⁺. Leur activation conduit à une libération rapide, de courte durée, et faible de NO (pmol/min/mg de NOS), classiquement associée à des processus cellulaires dans lesquels le NO intervient en tant que molécule signal. La iNOS peut quant à elle lier une CaM non chargée en Ca²⁺ et conduit à une formation plus importante et prolongée de NO (nmol/min/mg de NOS), plutôt impliquée dans la réponse immunitaire ou dans certaines pathologies, pour lesquelles le NO peut intervenir en tant qu'agent cytotoxique (Beck *et al*, 1999).

D'autre part, le NO peut être produit de façon non-enzymatique par réduction chimique des nitrates/nitrites (Lundberg *et al*, 2008). Cette voie de biosynthèse est moins décrite que celle impliquant les NOS et semble être mise en place dans un environnement acide et/ou réducteur et en conditions anoxiques, conditions où l'activité NO synthase arginine dépendante est limitée (Weitzberg & Lundberg, 1998). Récemment, des interactions ont pu être mises en évidence

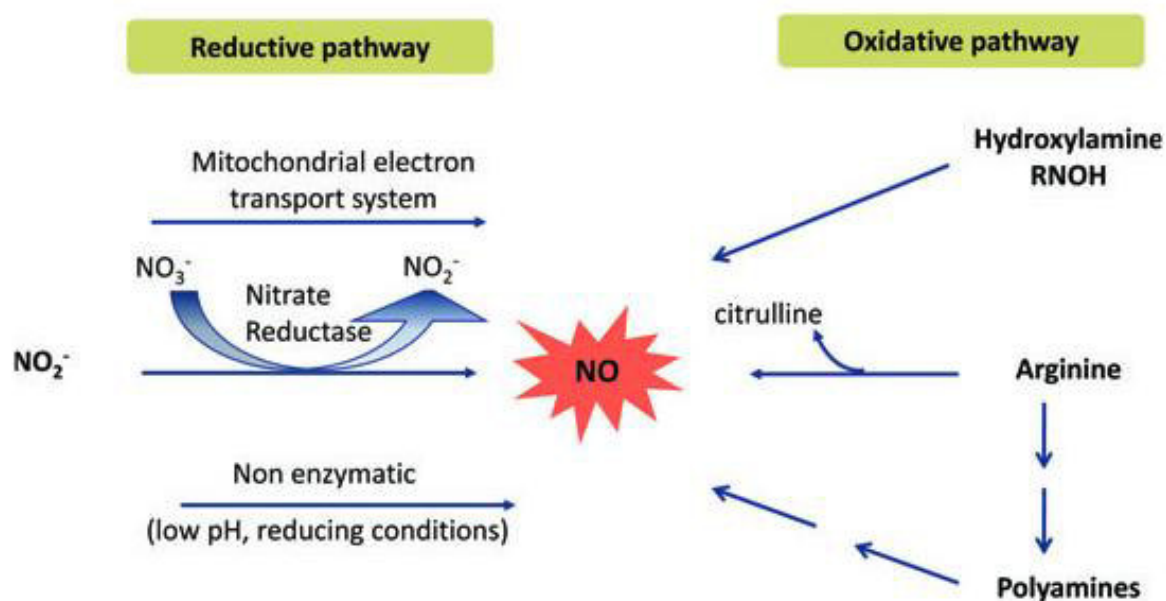


Figure II.4: Les voies majeures de production de NO chez les plantes

Deux voies principales, l'une réductrice et l'autre oxydative contribuent à la synthèse du NO. La voie réductrice correspond à la réduction du nitrite (NO_2^-) et implique la respiration mitochondriale, la nitrate réductase (NR), la nitrite:NO réductase (Ni:NOR) ou encore un environnement fortement acide ou réducteur (voie non enzymatique). La voie oxydative utilise comme substrat la L-arginine, des polyamines, ou des hydroxylamines.

Extrait de Moreau et al, 2010

entre la voie de biosynthèse de NO à partir des nitrates/nitrites et la voie eNOS (Carlström *et al.*, 2015).

b. La synthèse de NO chez les plantes

L'origine de la production de NO chez les plantes est établie de façon moins certaine que chez les mammifères. Les voies de biosynthèse semblent plus diversifiées et sont classiquement identifiées comme oxydatives ou réductrices (Figure II.4).

- Voies oxydatives:

De nombreuses études ont été réalisées afin d'identifier des enzymes de type NOS chez les plantes terrestres modèles et des arguments expérimentaux sont en faveur de l'existence de telles enzymes (classiquement nommée NOS-like) (Moreau *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2011a). En effet, des activités NOS-like, sensibles à des inhibiteurs de NOS de mammifères, ont été mesurées dans des extraits tissulaires ou cellulaires chez différentes espèces (Corpas *et al.*, 2009). Par ailleurs, ces inhibiteurs sont capables de bloquer l'accumulation de NO observée dans divers contextes physiologiques comme par exemple le développement (Corpas *et al.*, 2006), les réponses des plantes à des agents pathogènes (Delledonne *et al.*, 1998; Besson-Bard *et al.*, 2008a) ou à des stress abiotiques tels qu'une exposition au cadmium (Besson-Bard *et al.*, 2009). Cependant, les gènes codant pour les protéines NOS sont absents chez toutes les espèces modèles de plantes terrestres dont le génome a été entièrement séquencé et l'analyse récente du transcriptome de 1350 espèces de plantes a confirmé ce résultat (Jeandroz *et al.*, 2016). Néanmoins, une enzyme présentant une forte similarité à la NOS des mammifères a été identifiée et caractérisée chez les algues vertes *Ostreococcus tauri* et *Ostreococcus lucimarinus* (Foresi *et al.*, 2010). Les auteurs ont vérifié que la NOS d'*O. tauri* catalyse la formation de NO *in vitro* à partir de L-Arg et est impliquée dans la physiologie de l'algue, notamment dans les réponses adaptatives déclenchées par une forte irradiation lumineuse. Plus récemment, une quinzaine de protéines présentant une identité de séquence significative avec les NOS animales ont été identifiées chez différentes espèces d'algues, essentiellement des algues vertes (Jeandroz *et al.*, 2016). L'enzyme NOS semblerait avoir été perdue au cours de l'évolution des organismes photosynthétiques lors du passage à la vie terrestre. L'hypothèse alors avancée serait que d'autres systèmes enzymatiques plus adaptés au mode de vie terrestre interviendraient pour assurer la biosynthèse du NO.

Une autre voie oxydative de production de NO impliquant les polyamines, dérivées de la L-arginine, a été proposée. En effet, les polyamines, en particulier la spermine et la spermidine, déclenchent une production importante et rapide de NO chez *A. thaliana* (Tun *et al.*, 2006). Il est envisageable que cette synthèse de NO soit catalysée par les polyamines oxydases (Yamasaki & Cohen, 2006). Il a été montré qu'un mutant d'amine oxydase (*cuao1*, *copper amine oxidase*) est altéré dans la production de NO (Wimalasekera *et al.*, 2011). Toutefois, les acteurs moléculaires mis en jeu dans ces voies de synthèse de NO dépendantes de la L-arginine demeurent inconnus.

- Voies réductrices:

La nitrate réductase (NR), enzyme cytoplasmique, catalyse principalement la réduction du nitrate en nitrite (*cf chapitre I*). Cette enzyme peut également réduire le nitrite en NO (Yamasaki, 2000). Cette réaction nécessite des conditions particulières comme une concentration élevée en nitrite qui peuvent être rencontrées lors de stress hypoxiques (Rockel *et al.*, 2002). Toutefois, cette activité enzymatique est secondaire et ne représenterait que 1 % de l'activité totale de la NR. L'utilisation de plantes mutées sur les gènes codant pour la NR a permis de démontrer que le NO produit par cette voie est impliqué dans différents processus physiologiques tels que la fermeture des stomates, la réponse à des stress abiotiques (Neill *et al.*, 2008; Cantrel *et al.*, 2011), ou encore la réponse à des éliciteurs tels que le chitosane ou les OG (Srivastava *et al.*, 2009; Rasul *et al.*, 2012).

Une seconde voie enzymatique associée à la synthèse de NO à partir du nitrite a pu être détectée sur des fractions membranaires de cellules de racines de tabac et ferait intervenir une enzyme plasmalemmique, encore non identifiée génétiquement, la Ni:NOR (nitrite:NO réductase) (Stöhr *et al.*, 2001). Cette enzyme ne serait exprimée que dans les racines et produit du NO dans l'apoplasme à partir du nitrite, en utilisant la NADPH comme donneur d'électron. L'activité de la Ni:NOR est induite par l'hypoxie et fonctionnerait grâce à une NR apoplastique liée à la membrane catalysant la réduction du nitrate en nitrite (Stöhr & Ullrich, 2002). De plus, en condition d'hypoxie et lors de la symbiose racinaire rhizobienne, une formation de NO par la réduction du nitrite peut être également observée au niveau des mitochondries (Planchet *et al.*, 2005; Horchani *et al.*, 2011). Cette synthèse est associée à la chaîne de transport d'électrons qui utilise le nitrite comme accepteur final. La NR dans ce cas intervient de façon indirecte dans la production de NO par sa capacité à produire du nitrite nécessaire pour ces réactions. Ces deux voies de production semblent cependant être limitées aux racines des plantes, où la pression partielle en oxygène est faible (Gupta *et al.*, 2011a).

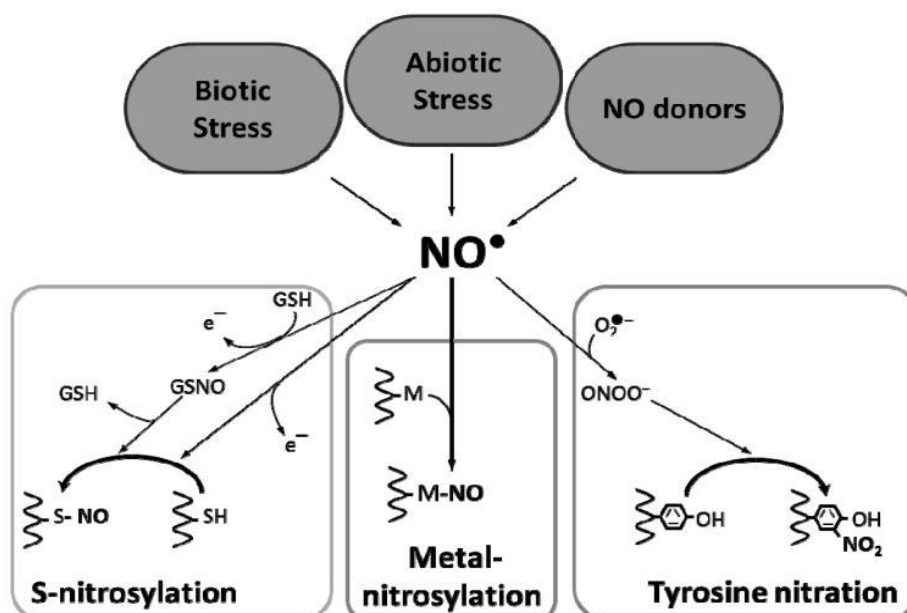


Figure II.5: Modifications post-traductionnelles induites par le NO

Le NO peut réagir avec les métaux de transition (M) des métalloprotéines. Ce procédé est appelé metal-nitrosylation et peut affecter notamment les hémoglobines (non)-symbiotiques (nsHbs et sHb). La tyrosine nitration dépend de la formation de dérivés de NO, comme le peroxynitrite (ONOO^-) formé en présence de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$). La nitration se produit sur un des deux carbones équivalents (C3) du résidu tyrosine pour former un 3-nitrotyrosine. Cette réaction a été démontrée pour la glutamine synthétase de *M. truncatula* (MtGS2) par exemple. La S-nitrosylation est une attaque électrophile du cation nitrosonium sur le groupe thiol d'un résidu cystéine de la protéine cible. Plusieurs dizaines de protéines S-nitrosylées dont certaines impliquées dans les réponses aux stress ont été répertoriées.

Extrait de Astier & Lindermayr, 2012

Par ailleurs, le nitrite peut être réduit en NO de façon non enzymatique, dans des conditions acides telles que celles rencontrées dans l'apoplasme des graines et des racines (Bethke *et al*, 2004).

1.3 Mécanismes d'action du NO

a. Modifications post-traductionnelles induites par le NO

Le NO peut interagir directement avec les protéines et dans certains cas modifier leurs structures et leurs activités. Il existe trois types de modifications post-traductionnelles (MPT) induites par le NO : la métal-nitrosylation, la tyrosine nitration et la S-nitrosylation (Figure II.5).

• Métal-nitrosylation:

La métal-nitrosylation est un mécanisme réversible désignant la formation d'une liaison covalente entre le NO• et un métal de transition présent dans une métalloprotéine. Plus précisément, le NO•, en tant que donneur d'électron, réagit avec le fer, le zinc et le cuivre localisés soit au sein d'un hème, soit libre dans la protéine et conduit à la formation de complexes métal-nitrosyles. Le changement de conformation, induit par cette MPT, peut impacter l'activité ou la réactivité de la protéine cible (Ford, 2010).

Chez les animaux, l'activation de la guanylate cyclase (GC) est un exemple de métal-nitrosylation bien connu dans la littérature. L'interaction du NO avec le fer de l'hème de la GC conduit à la production du messager secondaire, le cGMP aboutissant à la mise en place de diverses réponses (Besson-Bard *et al*, 2008b). Chez *A. thaliana*, il a été montré, *in vitro*, qu'une protéine capable de lier le NO possédait une activité GC (Mulaudzi *et al*, 2011). Le rôle de cette protéine reste cependant à déterminer.

• Tyrosine nitration:

La tyrosine nitration correspond à l'incorporation d'un groupement nitro (NO₂⁺) à un résidu tyrosine par action du peroxy-nitrite (ONOO⁻), conduisant à la formation de 3-nitrotyrosine. Le groupement NO₂⁺ provient du radical dioxyde d'azote (NO₂•), agent oxydant issu de la réaction entre le NO• et l'O₂•⁻, ou de la décomposition de ONOO⁻, oxydant puissant produit par la réaction du NO• et de l'O₂•⁻. Dans des conditions physiologiques, ONOO⁻ réagit

principalement avec le CO₂ pour être ensuite décomposé en radical carbonate (CO₃^{•-}) et NO₂[•] (Astier & Lindermayr, 2012). La tyrosine nitration est limitée à des résidus tyrosine spécifiques (Ischiropoulos, 2003; Bayden *et al*, 2011) et peut favoriser des changements conformationnels qui conduisent à l'activation, l'inhibition (Radi, 2004) ou à la dégradation par le protéasome (Castillo *et al*, 2015) de protéines cibles.

Due à sa grande stabilité *in vitro* (à pH acide et basique, à 100 °C) et à la méconnaissance des systèmes de dénitrification, la tyrosine nitration a d'abord été décrite comme étant une modification post-traductionnelle irréversible (Hanafy *et al*, 2001). Cependant, des travaux tendent à démontrer qu'il existerait un système de dénitrification (Abello *et al*, 2009). Deeb *et al*, (2013), ont caractérisé, dans les cellules endothéliales humaines et de souris, une activité dénitrifère capable de réverser la tyrosine nitration de la cyclooxygénase 1.

Des centaines de protéines tyrosine nitrées appartenant à des familles très variées (oxydase, réductase, synthétase, chaperonne, protéase, facteur de transcription, tubuline, catalase) et impliquées dans différentes voies métaboliques ont été identifiées en réponse aux agents pathogènes et également au cours du développement de la plante d'*A. thaliana* (Cecconi *et al*, 2009; Lozano-Juste *et al*, 2011). L'évolution au cours du temps du profil des protéines tyrosine nitrées en fonction du développement ou du stress suggèrent la réversibilité de ce mécanisme (Cecconi *et al*, 2009; Begara-Morales *et al*, 2013).

- S-nitrosylation:

La S-nitrosylation résulte de la liaison covalente d'une molécule de NO (forme nitrosonium) avec l'atome de soufre d'un résidu cystéine (Cys) de protéine entraînant la formation d'un S-nitrosothiol (SNO) (Hess *et al*, 2005). Chez les plantes, aucun motif de S-nitrosylation n'est décrit mais une cystéine entourée d'un acide aminé acide et basique, présente dans un environnement hydrophobe, serait une cible préférentielle de S-nitrosylation (Astier *et al*, 2012). Un autre mécanisme de S-nitrosylation existe, la transnitrosylation. Ce mécanisme correspond au transfert direct du groupement NO d'une protéine S-nitrosylée (ou d'un SNO) à une seconde protéine (Astier *et al*, 2012). Le S-nitrosoglutathion (GSNO), un nitrosothiol de faible poids moléculaire, est considéré comme un agent important de la transnitrosylation.

La S-nitrosylation peut induire un changement de conformation des protéines pouvant entraîner une modification de l'activité, de la localisation ou de la stabilité de la protéine. Chez les plantes, cette réaction participe à différents mécanismes tels que l'immunité, la régulation hormonale et le métabolisme carboné (Astier *et al*, 2012). La S-nitrosylation est une réaction réversible. En plus de la dénitrification spontanée, il existe des protéines capables de

dénitrosyler les cystéines modifiées : les thiorédoxines (Trx) et les GSNO réductases (GSNOR) (Benhar *et al.*, 2009).

b. La modulation de la transcription de gènes

L'étude des mécanismes sous-jacents aux effets physiologiques du NO chez les plantes ont également révélé la capacité de ce dernier à moduler l'accumulation de transcrits de gènes. Plusieurs études réalisées sur différentes plantes (*A. thaliana*, *M. truncatula*, le soja et le tabac) et dans divers organes végétaux (racine, feuille, suspensions cellulaires) ont permis d'identifier des gènes différentiellement exprimés suite à un traitement avec un donneur ou un piègeur de NO ou par l'utilisation de plantes transgéniques affectées dans l'homéostasie du NO (Grün *et al.*, 2006; Badri *et al.*, 2008; Palmieri *et al.*, 2008; Ahlfors *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2013). Le NO peut réguler l'expression de nombreux gènes via des modifications de la voie de signalisation SA (Kovacs *et al.*, 2015) et de structure de la chromatine (Ou *et al.*, 2015; Chaki *et al.*, 2015). Il peut également jouer un rôle sur les facteurs de transcription, comme par exemple être détecté par les facteurs de transcription ERFs du groupe VII, ce qui les déstabilise et permet de coordonner la régulation des processus médiés par le NO au cours de la croissance et du développement (Gibbs *et al.*, 2014). Les auteurs ont précisé le mécanisme moléculaire impliqué dans la germination des graines régulé par le NO. Ce mécanisme se réalise par la détection du signal par les ERFs du groupe VII jusqu'à la régulation d'un facteur de transcription clé, ABI5 (*abscisic acid insensitive 5*). Plus récemment, il a été montré que le NO jouait également un rôle direct sur ABI5. En effet, la S-nitrosylation de ce facteur de transcription provoque sa dégradation et permet la germination des graines (Albertos *et al.*, 2015).

1.4 Homéostasie du NO

L'homéostasie du NO peut être définie par la capacité de la cellule à assurer la régulation spatio-temporelle de la concentration du NO afin de garantir la spécificité d'action du signal. Celle-ci dépend donc de la coordination entre sa synthèse et sa dégradation. Ainsi, après avoir discuté des différents mécanismes à l'origine de la production de NO et de son mode d'action, nous verrons dans ce paragraphe les acteurs principaux impliqués dans son turn-over : les hémoglobines, le peroxyxynitrite, le GSNO et la GSNOR (Figure II.6).

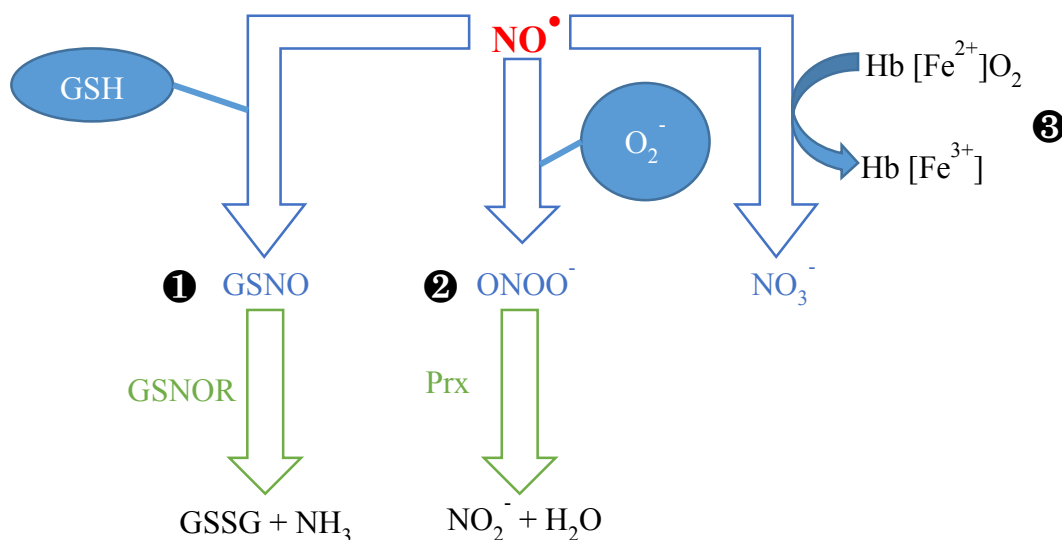


Figure II.6: Régulation de l'homéostasie du NO

- ❶ Les niveaux de GSNO sont hautement régulés par la GSNO réductase (GSNOR). Cette enzyme catalyse la transformation du GSNO en GSH disulfide (GSSG) et ammoniac (NH₃).
- ❷ Les plantes ont développé des mécanismes efficaces de détoxification du peroxy-nitrite (ONOO⁻) par des peroxydases (Prx) thiol-dépendantes qui catalysent la réduction du ONOO⁻ en dioxyde d'azote (NO₂⁻) et eau.
- ❸ L'homéostasie du NO peut être modulée par les hémoglobines. Les hémoglobines de classe-1 (Hb1) catalysent le turnover du NO en nitrate (NO₃⁻) et influencent ainsi la croissance, le développement et les réponses au stress.

Adapté de Groß et al, 2013

a. Les hémoglobines

Trois classes d'hémoglobines, basées sur leurs propriétés structurales et sur leur affinité de liaison à l'oxygène et au NO, existent chez les plantes. Les hémoglobines de classe 1 possèdent une forte affinité pour l'oxygène et leur fonction principale est de piéger le NO à de très faibles concentrations en oxygène. Les hémoglobines de classe 2 possèdent une plus faible affinité pour l'oxygène et permettent l'approvisionnement en oxygène des tissus en développement. Les hémoglobines symbiotiques de diverses légumineuses, appelées également leghémoglobines, se trouvant dans les nodosités symbiotiques, sont principalement issues des hémoglobines de classe 2. Les hémoglobines de classe 3 sont tronquées et représentent un clade avec très peu de similarité avec les classes 1 et 2 (Gupta *et al*, 2011b). Les deux premières classes d'hémoglobines peuvent être oxydées par le NO au niveau du fer de l'hème (Igamberdiev & Hill, 2004; Navascués *et al*, 2012). Cette réaction conduit à la formation de nitrate et met en évidence, qu'au-delà de transporter l'oxygène, les hémoglobines joueraient le rôle de piègeur de NO. Par ailleurs, les hémoglobines tronquées sont également impliquées dans le piégeage du NO chez les plantes supérieures et les algues vertes dont *Chlamydomonas reinhardtii* (Kim *et al*, 2014; Sanz-Luque *et al*, 2015). Ces protéines sont donc considérées comme des modulateurs des concentrations en NO (Gupta *et al*, 2011b).

b. Le peroxynitrite

Le peroxynitrite (ONOO⁻), qui est une RNS, est également considéré comme un des acteurs de l'homéostasie du NO (Vandelle & Delledonne, 2011). Il est formé par l'interaction entre le NO et l'anion superoxide (*voir chapitre II. 1.5*). La vitesse d'interaction entre le NO[•] et l'O₂^{•-} est plus rapide que la vitesse de transformation de l'O₂^{•-} par la superoxyde dismutase (SOD) (Salvemini *et al*, 2006). Par conséquent, en formant le ONOO⁻, le NO ne piège pas seulement l'O₂^{•-} mais réduit également sa dismutation par la SOD et donc la production d'H₂O₂ (Wendehenne *et al*, 2014). Le peroxynitrite peut provoquer la peroxydation des lipides, la nitration ou l'oxydation des protéines, et des dommages oxydatifs de l'ADN, faisant de lui un acteur cytotoxique. Cependant, dans certaines conditions, la modification des lipides et/ou protéines par ONOO⁻ participe à la régulation de la signalisation cellulaire médiée par le NO, en interférant par exemple, avec des cascades de phosphorylation (ex : les MAPKs) (Liaudet *et al*, 2009).

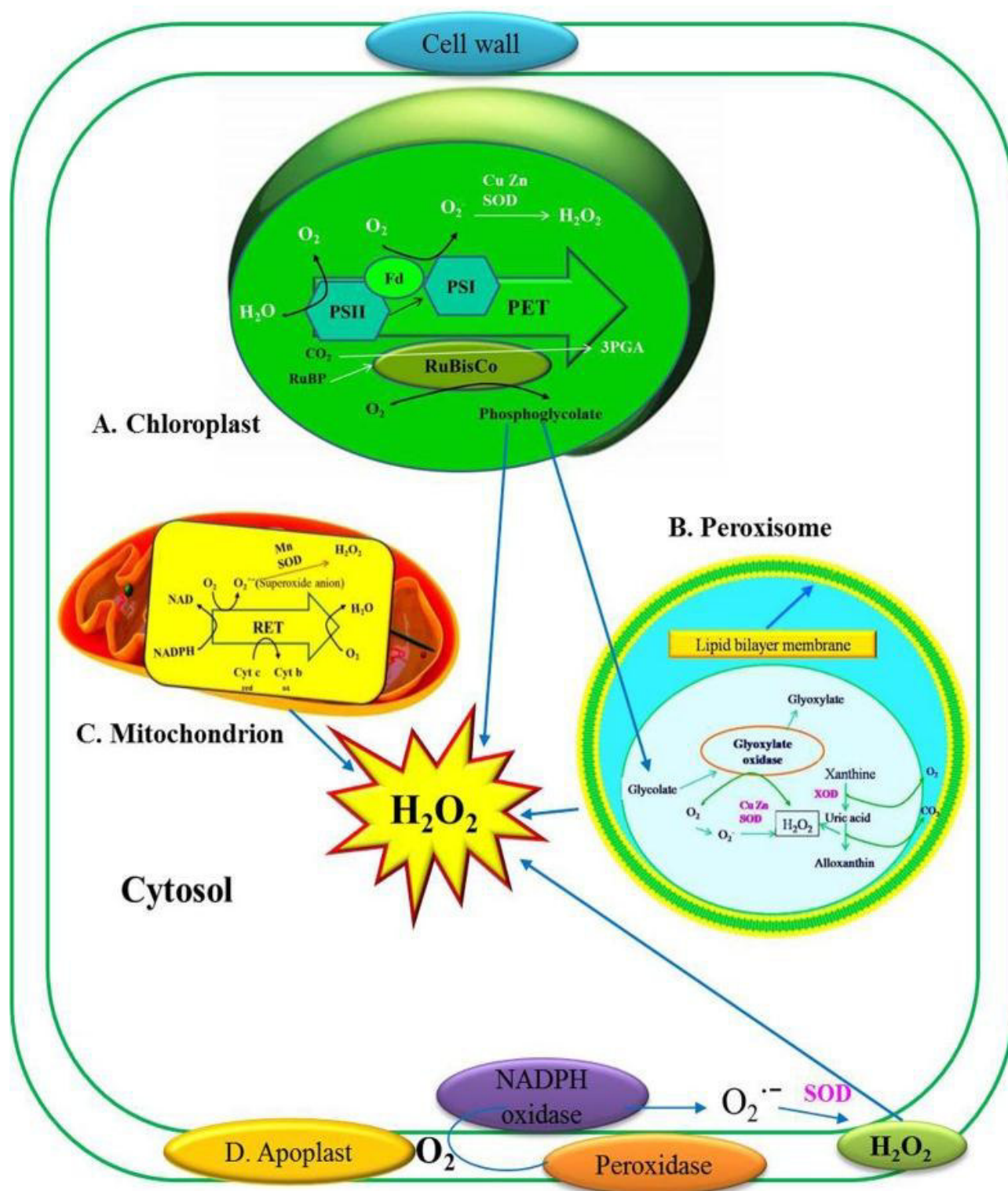


Figure II.7: Production d' H_2O_2 dans les cellules végétales et réaction dans les différents compartiments cellulaires

Production d' H_2O_2 dans (A) le chloroplaste au niveau des sites des photosystèmes I et II (PSI et PSII), (B) le peroxisome, avec l'action des enzymes xanthine oxydase (XOD) et de la glycolate-oxydase (GOX), (C) les mitochondries et (D) dans l'apoplaste.

Extrait de Saxena et al, 2016

c. GSNO et GSNO réductase

Les SNO sont généralement plus stables en solution que le NO. Les SNO peuvent participer au transport, au stockage, à la livraison du NO ainsi qu'aux modifications post-traductionnelles impliquées dans la signalisation cellulaire (Lindermayr & Durner, 2009). Le GSNO est considéré comme l'un des principaux nitrosothiols de faible poids moléculaire et comme le réservoir endogène majeur de NO (Wang *et al*, 2006). Les niveaux de GSNO sont contrôlés par la GSNOR, enzyme clé métabolisant le GSNO en ammoniac et en GSH disulfide (GSSG). Le mutant *Atgsnor1*, invalidé dans l'expression de la GSNOR, présente des niveaux élevés de SNO et est perturbé dans la résistance de la plante à *P. syringae* (Feechan *et al*, 2005). Rustérucci *et al*, (2007) ont confirmé que la GSNOR contribuait à la régulation de la teneur en SNO. Le rôle du SNO dans les réponses de défense des plantes a également été mis en évidence dans ces études mais celui-ci semble dépendant du pathosystème. Par ailleurs, une régulation inverse de la GSNOR sur la teneur en SNO peut être observée. En effet, chez le pois, l'induction des niveaux de SNO provoquée lors d'une blessure est corrélée à l'augmentation de l'activité de la GSNOR (Corpas *et al*, 2008).

1.5 Interaction NO/ROS et système antioxydant

Parallèlement à la production de NO, une production de ROS est fréquemment observée dans les cellules et tissus. Il apparaît que ces molécules sont capables d'interagir directement ou indirectement par la régulation de leur synthèse ou leur dégradation ce qui conduit à une modulation de leurs effets respectifs.

a. Synthèse des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et burst oxydatif

Les ROS sont produites majoritairement de manière constitutive dans les mitochondries, les plastes et les peroxysomes au cours des phénomènes de la respiration cellulaire et de la photosynthèse (Apel & Hirt, 2004) (Figure II.7).

Bien que l'O₂ soit dans un état relativement non réactif, sa réduction partielle conduit à la formation des ROS. Parmi les ROS, on retrouve l'anion superoxide (O₂^{•-}), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le radical hydroxyle (•OH) (Figure II.8). O₂^{•-} est un produit constitutif issu du transport d'électron mitochondrial, de la photosynthèse et des réactions de la flavine déhydrogénase et de la NADPH oxydase. Il peut être converti en d'autres ROS comme •OH qui

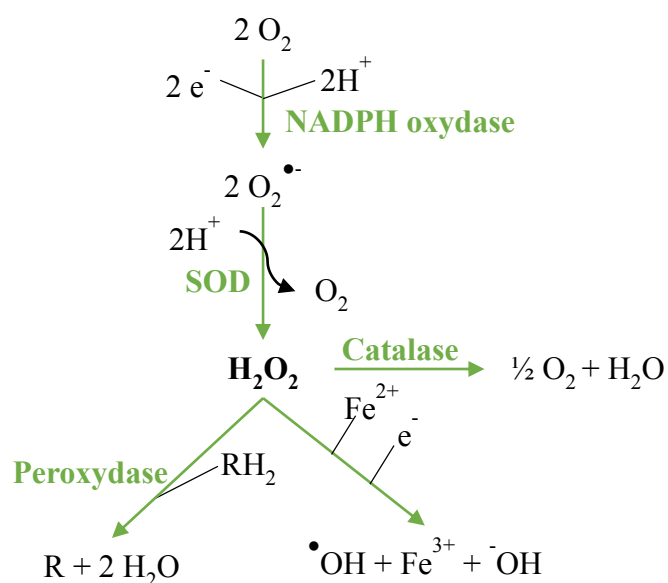


Figure II.8: Formation des espèces réactives de l'oxygène

La réduction partielle de l' O_2 par ajout d'un électron permet la formation de l' $\text{O}_2^{\bullet -}$, grâce à la NADPH oxydase. L' $\text{O}_2^{\bullet -}$ peut être protoné à faible pH entraînant la formation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) grâce à l'enzyme superoxyde dismutase (SOD). Ce dernier a plusieurs devenir. La catalase et la peroxydase vont entraîner la formation d' H_2O à partir d' H_2O_2 . L' H_2O_2 peut former le radical hydroxyle OH en présence de cations métalliques tels que Fe^{2+} .

Adapté de Buchanan et al, 2000

est le plus réactif ou H_2O_2 . L' H_2O_2 , stable et moins réactif que l' $\text{O}_2^{\bullet-}$, peut être transformé en H_2O par des catalases ou des peroxydases comme l'ascorbate peroxydase (APX) et la glutathion peroxydase (GPX). Les peroxydases peuvent aussi catalyser la formation de l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ et de l' H_2O_2 par une réaction complexe qui nécessite l'oxydation du NADH en utilisant en premier lieu l' H_2O_2 produit de manière non enzymatique. Le radical NAD qui est formé, va réduire l' O_2 en $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Hahlbrock *et al*, 1995).

La production de ROS, peut être également induite lors des réponses aux stress, phénomène appelé « burst oxydatif ». L'induction de la production de ROS fait intervenir deux sources enzymatiques différentes: les peroxydases des parois cellulaires et les NAPDH oxydases, connues sous le nom de ROBHS (*respiratory burst oxidase homologues*). Des études utilisant des inhibiteurs de ces enzymes ont montré que les peroxydases contribuaient à 50 % de la production de ROS extracellulaires alors que le reste est issu des RBOHS membranaires et de sources intracellulaires (O'Brien *et al*, 2012b). Les protéines et les gènes correspondants ont été particulièrement étudiés. Chez *M. truncatula*, on dénombre sept gènes *Rboh* (*RbohA* à *RbohG*; Marino *et al*, 2011). Selon le tissu, les niveaux d'expression diffèrent entre les *Rbohs*. *MtRbohA* est préférentiellement exprimée dans les nodosités; *MtRbohB* est exprimée relativement au même niveau dans les racines, les nodosités, la tige et les gousses mais faiblement exprimée dans les feuilles et les fleurs; *MtRbohC*, *MtRbohD* et *MtRbohG* sont très faiblement exprimées; *MtRbohF* est fortement exprimée dans les poils absorbants et également dans les racines mais à plus faible niveau (Marino *et al*, 2011); *MtRbohE* est exprimée lors de la symbiose mycorhizienne (Belmondo *et al*, 2015).

Le taux de ROS est régulé par des systèmes enzymatiques (superoxyde dismutase, catalases, APX) qui permettent leur détoxification ou non enzymatiques, grâce à des molécules antioxydantes (glutathion, tocophérol et ascorbate) (O'Brien *et al*, 2012b). Le glutathion (GSH) est le principal thiol antioxydant des cellules. Il est synthétisé en deux étapes dans le cytosol, catalysées par la glutamate cystéine ligase et la GSH synthétase. Le GSH est nécessaire pour piéger les ROS avec l'aide de la GPX. La présence de l'homoglutathion (γ -glutamylcystéine- β -alanine; hGSH), un homologue de GSH est une des caractéristiques des légumineuses (Frendo *et al*, 1999). L'absence de synthèse du GSH et de hGSH au cours des premières étapes de la symbiose entre *M. truncatula* et *S. meliloti* conduit à une inhibition de la formation des nodosités soulignant le rôle important de ces molécules dans la symbiose (Frendo *et al*, 2005).

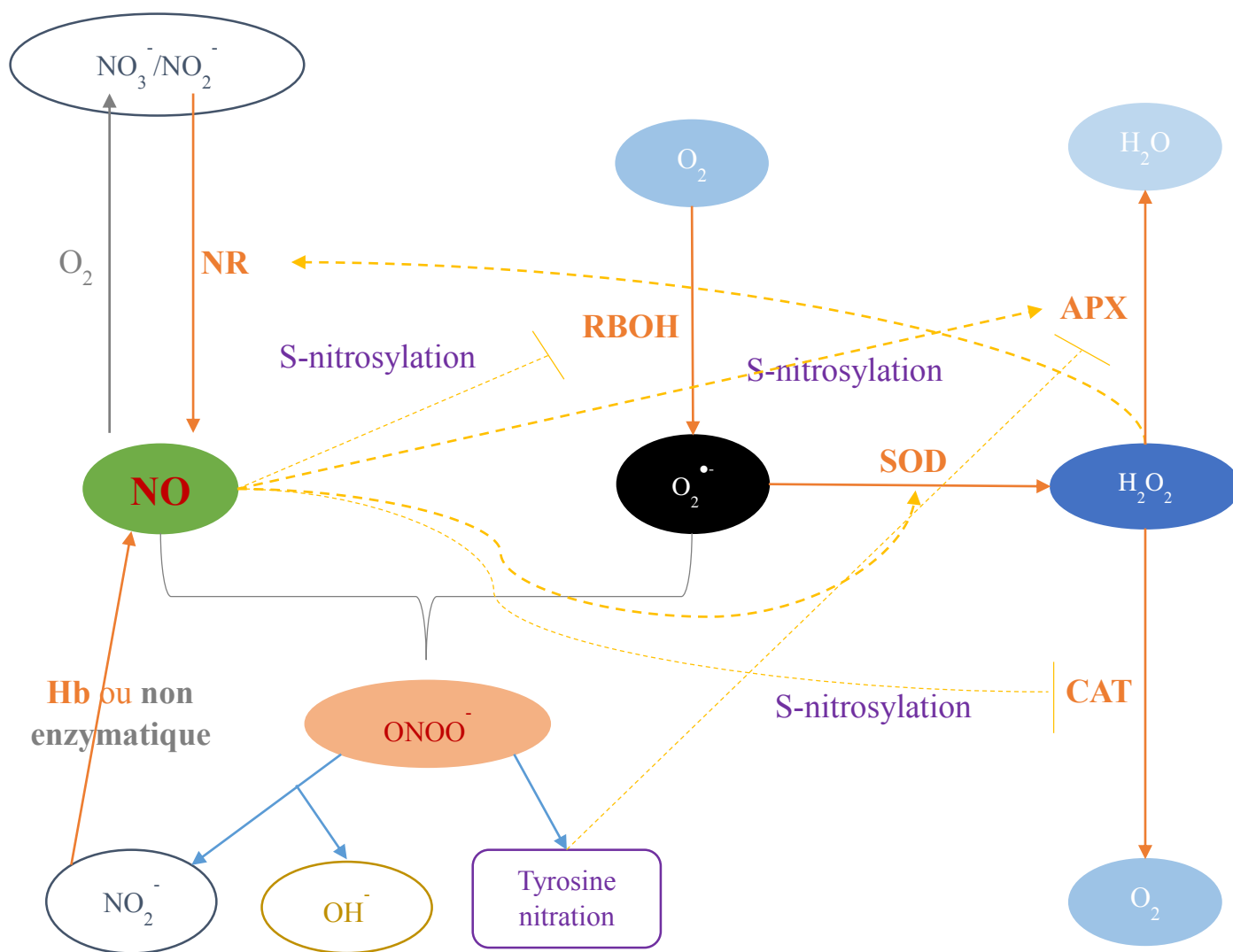


Figure II.9: Exemple de régulation croisée entre NO et ROS dans les cellules végétales

NR, nitrate réductase; NO, monoxyde d'azote; NO₃⁻, nitrate; NO₂⁻, nitrite ONOO⁻, peroxy-nitrite; Hb, hémoglobine; O₂^{•-}, superoxyde; RBOH, NADPH oxydase; SOD, superoxyde dismutase; H₂O₂, peroxyde d'hydrogène; CAT, catalase; APX, ascorbate peroxydase

Adapté de Wang et al, 2013

Plusieurs rôles sont attribués à la production de ROS dans le contexte des interactions plantes-microorganismes. Le « burst oxydatif » a une activité antimicrobienne directe et participe au renforcement de la paroi cellulaire en induisant la formation de liaisons covalentes entre certaines protéines structurales de la paroi (Bradley *et al*, 1992). Les ROS jouent un rôle dans les défenses en tant que molécules de signalisation. Elles sont ainsi impliquées dans la production des phytoalexines (Apostol *et al*, 1989), le dépôt de callose et la mise en place de la mort cellulaire, limitant la propagation du microorganisme (Lamb & Dixon, 1997; O'Brien *et al*, 2012a). Les ROS sont impliquées dans le contrôle des processus de la HR avec le NO (Delledonne *et al*, 2001). Elles ont aussi un rôle important dans les interactions symbiotiques rhizobiennes au cours des phases précoces et tardives (Fester & Hause, 2005; Matamoros *et al*, 2003). Dans les symbioses à AM, l'accumulation d'H₂O₂ a également été mise en évidence (Salzer *et al*, 1999).

b. Cross-talk du NO avec les ROS

ROS et NO participent donc à la régulation de phénomènes similaires (développement, réponses aux stress...*cf* Chapitre II 1.6) et des interactions fines interviennent entre ces deux types de molécules. Le cross-talk entre le NO et les ROS fait intervenir tout d'abord la régulation de la synthèse de l'un par l'autre (et inversement) (Figure II.9). Par exemple la production de NO module la production des ROS médiées par *AtRBOHD* dans les feuilles d'*A. thaliana* élicitées par les OG (Rasul *et al*, 2012) alors que chez le tabac, la production de NO induite dans les cellules traitées à la cryptogéine est partiellement régulée à travers une voie ROS-dépendante impliquant *NtRBOHD* (Kulik *et al*, 2015). En plus d'agir en tant que composant de la cascade de signalisation en impliquant les NAPDH oxydases, le NO pourrait également favoriser une augmentation des niveaux d'H₂O₂ en réduisant sa diminution. En effet, la S-nitrosylation, médiée par le NO, inhibe la catalase et l'ascorbate peroxydase, deux enzymes impliquées dans la transformation des ROS (Ortega-Galisteo *et al*, 2012; Pinto *et al*, 2013). Ces données indiquent que le NO et les ROS peuvent intervenir en synergie comme molécule signal. Leur action coordonnée est un mécanisme crucial pour l'activation des gènes de défense et l'induction de la mort cellulaire.

Les effets délétères induits par les ROS peuvent également être atténués par le NO. Au moins deux procédés ont été proposés. Comme décrit précédemment, le NO peut interagir avec l'O₂^{•-} pour former ONOO⁻ réduisant ainsi les dommages cellulaires induits par les ROS. Ce modèle est également soutenu par le fait que la production de NO peut contrôler négativement le taux d'H₂O₂ produit dans les cellules de tabac traitées à la cryptogéine (Kulik *et al*, 2015).

Ce processus a été associé à une production concomitante de ONOO⁻. Le second procédé proposé est que le NO atténue les effets indésirables des ROS en contrôlant les activités NADPH oxydases. Yun *et al*, (2011) ont montré qu'en présence d'une concentration importante de SNO, le NO entraîne l'inactivation de la NADPH oxydase, via une MPT (S-nitrosylation). Ces auteurs ont proposé un modèle dans lequel les réponses des cellules végétales à l'attaque d'agents pathogènes nécessitent une régulation fine de l'équilibre NO/ROS afin de mieux contrôler le développement de la HR.

1.6 Rôle du NO chez les plantes

Chez les plantes, des études ont mis en évidence le rôle du NO dans la signalisation cellulaire et son implication dans divers processus comme la germination, la fermeture des stomates, la croissance racinaire et l'adaptation aux stress biotiques et abiotiques (Wilson *et al*, 2008; Besson-Bard *et al*, 2008b).

a. Croissance et développement

Le NO est impliqué dans la croissance et le développement des plantes, évènements régulés par les phytohormones (Simontacchi *et al*, 2013). Par exemple, le NO entraîne l'inhibition de la floraison (He *et al*, 2004) et de la sénescence (Guo & Crawford, 2005) chez *A. thaliana*. Il joue un rôle dans la levée de la dormance des graines contrôlée par l'ABA (Bethke *et al*, 2006). Le NO est nécessaire à l'activation du cycle cellulaire induit par l'auxine chez *M. sativa* (Otvös *et al*, 2005). Il intervient dans la fermeture des stomates provoquée par l'ABA (Garcia-Mata & Lamattina, 2002) et régule les canaux potassiques et calciques des cellules de garde (Garcia-Mata *et al*, 2003) chez la fève. De plus, il est considéré comme un composé signal impliqué dans la mort cellulaire induite par les cytokinines (Carimi *et al*, 2005). Le NO est également impliqué dans le développement racinaire. Il est nécessaire au développement des racines adventices dont la formation est induite par l'auxine (Pagnussat *et al*, 2002). Récemment, il a été montré que les réponses des racines de maïs au nitrate sont régulées par le NO, l'auxine et les strigolactones (Manoli *et al*, 2016). Le NO permettrait de moduler les effets du nitrate sur la croissance de la racine primaire.

b. Stress abiotiques

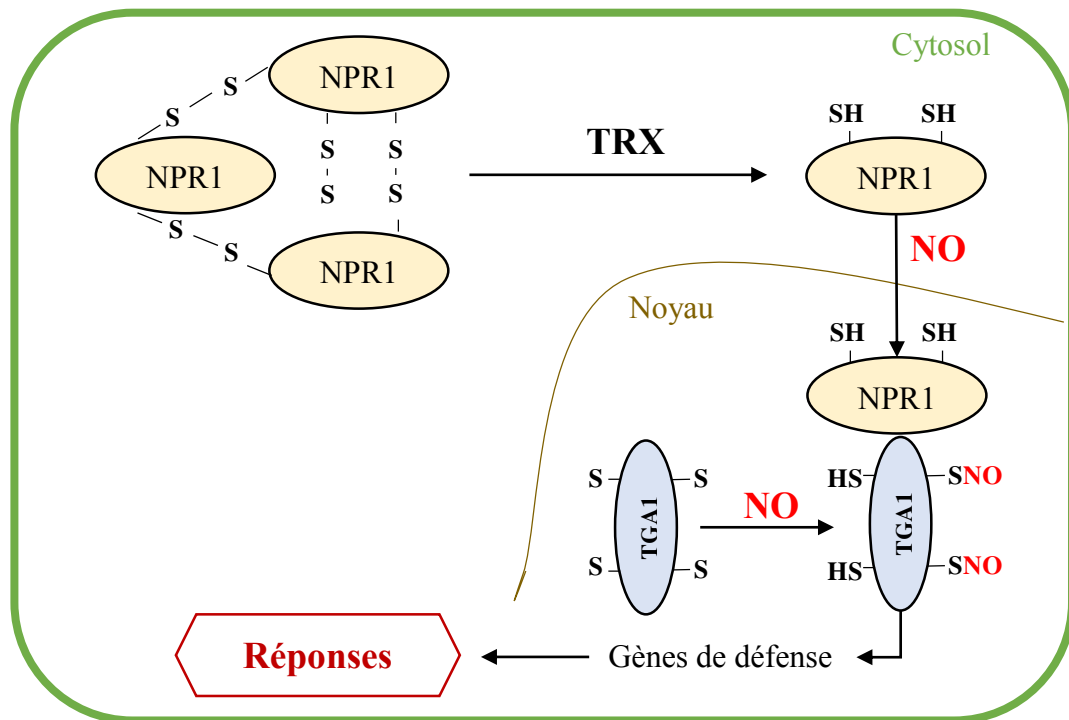
La capacité des plantes à réagir et à survivre dans des conditions de stress environnementaux, implique la détection et la signalisation d'évènements moléculaires où le NO devient un composant clé. Par exemple chez *N. tabacum*, de fortes températures, un stress osmotique ou salin entraînent une augmentation rapide de NO dans les cellules de feuille (Gould *et al*, 2003). En condition d'hypoxie, une forte production de NO est également observée chez *M. sativa* (Dordas *et al*, 2003; Igamberdiev *et al*, 2006), ainsi qu'une génération d'ATP par réduction du nitrite en NO par la chaîne de transport d'électrons (Igamberdiev & Hill, 2004) montrant également un rôle du NO dans le métabolisme énergétique. Le NO peut aussi être impliqué dans la régulation des stress oxydatifs. En effet, il protège contre les dommages oxydatifs induits par le polyéthylène glycol dans des suspensions cellulaire de roseaux (Zhao *et al*, 2008). Dans le cas de l'acclimatation des plantes au froid, Cantrel *et al*, (2011) ont montré que le NO servirait d'intermédiaire dans la régulation des gènes et la formation de phosphosphingolipide au cours du stress. Le stress froid peut entraîner la S-nitrosylation des enzymes, dehydroascorbate réductase et glutathion S-transférase provoquant une augmentation de leur activité et permettant ainsi une détoxification des ROS générées en réponse à ce stress (Sehrawat & Deswal, 2014). D'autres enzymes impliquées dans le métabolisme azoté et le métabolisme des acides aminés, telles que la cystéine synthase, l'alalanine glyoxylate aminotransférase, la glutamate glyoxylate aminotransférase et la glutamate synthase, ont été identifiées comme étant S-nitrosylées en réponse au stress froid (Puyaubert *et al*, 2014).

c. Stress biotiques

De très nombreuses données bibliographiques existent concernant l'implication du NO dans les stress biotiques. C'est d'ailleurs dans le contexte des interactions plante-agent pathogène, que les premières données concernant l'implication du NO comme agent de signalisation ont été publiées (Durner *et al*, 1998; Delledonne *et al*, 1998). Une production de NO est communément observée en réponse aux agents pathogènes ou éliciteurs des réactions de défense, comme par exemple dans les feuilles d'*A. thaliana* infectées par *P. syringae* (Modolo *et al*, 2005) ou dans des suspensions cellulaires de tomate élicitées par la xylanase (Laxalt *et al*, 2007). L'utilisation de plantes mutantes affectées dans la production ou d'inhibiteurs de la biosynthèse de NO ont permis de démontrer le rôle dans la résistance à certains agents pathogènes. En effet, des plantes d'*A. thaliana* possédant une activité NR très réduite (double mutant *nialnia2*) ou traitées par des inhibiteurs de la synthèse de NO montrent

A

Phase d'induction



B

Phase de rétrocontrôle

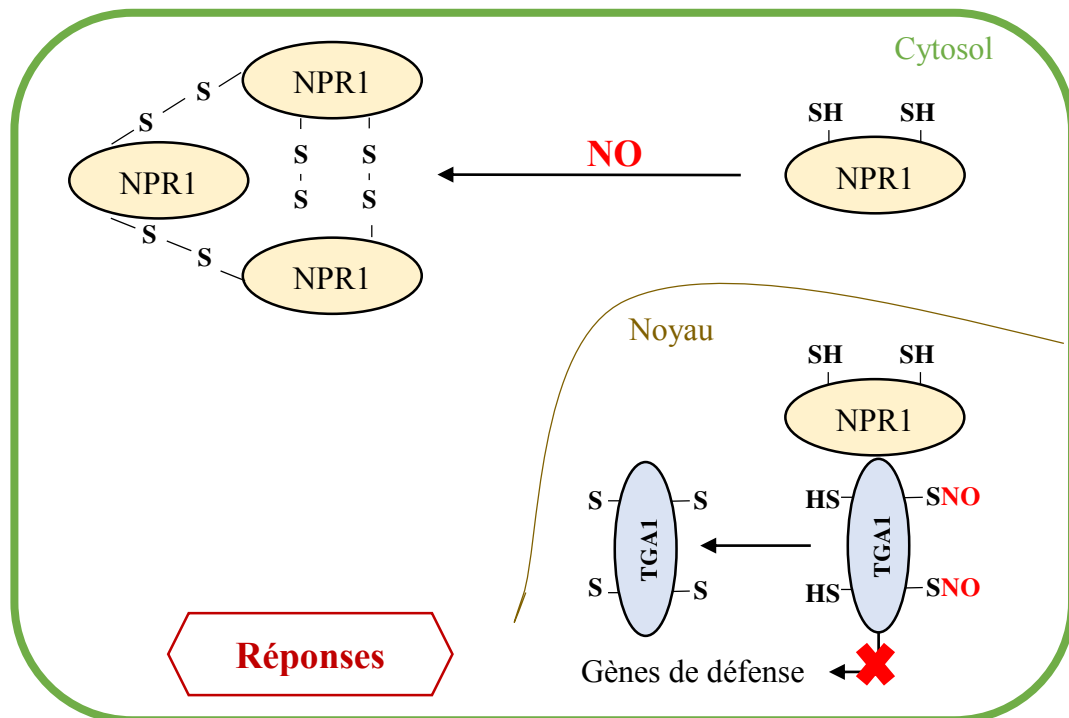


Figure II.10: Rôle du NO dans les réponses de défense sur le système NPR1/TGA1

(A), Première phase montrant l'activation des défenses par l'effet du NO sur NPR1/TGA1; (B), Deuxième phase montrant le contrôle négatif du NO sur NPR1.

Adapté de Astier et al, 2012

une réponse altérée de la HR au cours de l'infection par *P. syringae* (Delledonne *et al*, 1998; Modolo *et al*, 2005) suggérant ainsi que le NO est impliqué dans l'induction de la HR. Enfin, des plantes mutantes *gsnor* d'*A. thaliana*, dont les niveaux de SNO sont augmentés, montrent une augmentation de la SAR (Rustérucchi *et al*, 2007) suggérant le rôle du NO dans la résistance systémique.

Le NO va agir dans la plante par différents mécanismes (*cf* chapitre II partie 1.3). Parmi ces mécanismes, les MPT peuvent jouer un rôle important lors d'une interaction plante/agent pathogène. L'identification de protéines S-nitrosylées *in vivo* a renforcé l'importance de ce mécanisme dans l'établissement de la résistance des plantes aux agents pathogènes (Trapet *et al*, 2015 pour revue). Un exemple du rôle du NO dans les réponses de défense peut être représenté par le système NPR1/TGA1. Dans les cellules non infectées, la protéine NPR1, régulateur majeur de la voie de signalisation du SA en réponse à un agent pathogène (Tada *et al*, 2008), est présente dans le cytosol sous forme d'homo-oligomères inactifs formés grâce à des ponts disulfures entre les monomères. Lors de la stimulation des réponses de défense, l'oligomère est dissocié en monomères par une réduction des ponts disulfures grâce à une thioredoxine. Dans un premier temps, une production de NO va faciliter la migration des monomères de NPR1 libérés dans le noyau où ces derniers vont interagir et activer le facteur de transcription TGA1 régulant positivement l'expression de gènes de défense (Lindermayr *et al*, 2010) (Figure II.10A). TGA1 est en effet S-nitrosylé favorisant ainsi sa fixation sur la région promotrice de certains gènes de défense. Dans un second temps, le NO pourrait exercer un contrôle négatif sur l'expression des gènes cibles de TGA1 en induisant l'oligomérisation des monomères NPR1 en oligomères inactifs par S-nitrosylation (Tada *et al*, 2008) (Figure II.10B). Ceci traduirait une hiérarchie temporelle des événements induits par le NO. En effet, au cours de la progression de la SAR, le NO pourrait activer ou réprimer la cascade NPR1/TGA1 à des moments stratégiques. Ainsi, la S-nitrosylation de NPR1 pourrait représenter un rétrocontrôle négatif de la modulation de la SAR. Une autre protéine, CDC48 (*cell division cycle 48*), pouvant être S-nitrosylée a été identifiée dans notre équipe par une approche biotin-switch réalisée sur des protéines solubles de cellules de tabac traitées par la cryptogéine. CDC48 est une protéine chaperonne très conservée chez la levure, les mammifères et les plantes et qui appartient à la famille des AAA+ ATPase (ATPase associated with various activities) (Erzberger & Berger, 2006). Ces protéines sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires, telles que la dégradation protéique, le repliement des protéines, l'activité hélicase de l'ADN, le contrôle de la réplication de l'ADN et le transport cellulaire (Tucker & Sallai, 2007). Astier *et al*, (2012a) ont montré que la S-nitrosylation de NtCDC48 est nécessaire à l'activité de la protéine *in vitro*.

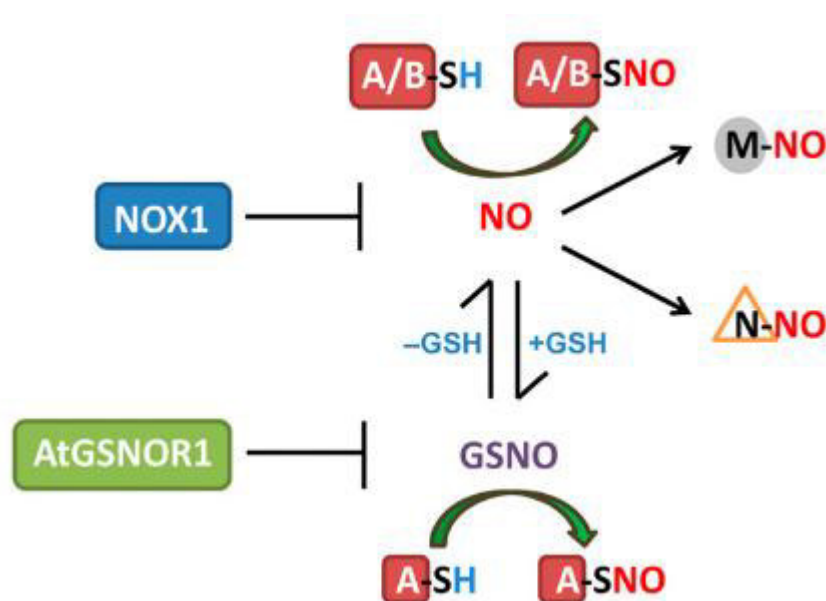


Figure II.11: Modèle schématique montrant les activités distinctes et chevauchantes du NO et de GSNO

NOX1 et AtGSNOR1 régulent négativement les niveaux de NO et de GSNO, respectivement. La lettre A correspond aux protéines cibles pouvant être transnitrosylées par GSNO et les lettres A/B correspondent aux protéines cibles pouvant être S-nitrosylées par le NO. Le glutathion (GSH) correspond au lien entre le NO et le GSNO. La liaison du NO au GSH permet la formation de GSNO et l'activité de la GSNOR1 d'*A. thaliana* permet de reformer du GSH. Le NO peut également nitrosyler des métaux de transition incorporés à des protéines (cercle gris M) et des chaînes latérales d'acides aminés (triangle orange N). Ceci montre que le NO a un plus large éventail d'activités que le GSNO.

Extrait de Tun et al, 2016

Par ailleurs, l'implication de cette protéine dans l'immunité a été récemment démontrée chez *A. thaliana* (Copeland *et al.*, 2016).

Les deux agents de nitrosylation NO et GSNO peuvent avoir des fonctions synergiques dans l'immunité des plantes (Yun *et al.*, 2016) (Figure II.11). Les auteurs ont montré que les mutants pertes de fonction *nox1-1* (*NO overexpression 1*) et *atgsnor1-3* d'*A. thaliana* sont plus sensibles à *P. syringae*. Le mutant *nox1* montre une augmentation des niveaux de NO et le mutant *atgsnor1-3* une augmentation des niveaux de SNO. Le double mutant *atgsnor1-3 nox1-1* affiche une suraccumulation de SNO et de NO, ainsi qu'une augmentation de la sensibilité à *P. syringae* plus importante que les simples mutants. Par ailleurs, la surexpression d'AtGSNOR1 réverte le phénotype d'un mutant perte de fonction *gsnor* mais pas d'un mutant surproducteur de NO. Le NO et le GSNO ont donc des cibles moléculaires distinctes et chevauchantes permettant ainsi le contrôle différentiel de processus cellulaires clés de l'immunité.

Chez les microorganismes, le NO peut être synthétisé par la NOS (Ninnemann & Maier, 1996; Crane *et al.*, 2010) ou par la NR (Cutruzzola, 1999; Marcos *et al.*, 2016). Chez les bactéries, des études ont par exemple montré que le NO, produit par la NOS ou grâce à des donneurs de NO, induit l'expression de gènes impliqués dans les réponses aux stress oxydatifs, à la micro-aérobie et prend part à la transduction du signal dans les phénomènes de pathogénicité et de résistance (Crane *et al.*, 2010; Meilhoc *et al.*, 2010).

d. Interactions symbiotiques

Le NO peut également jouer un rôle dans les interactions symbiotiques puisque la modification des niveaux de cette molécule chez les deux partenaires nuit au développement des nodosités (Puppo *et al.*, 2013). Une production de NO est observée chez la légumineuse *Lotus japonicus* 4 h après inoculation par *Mesorhizobium loti* (Shimoda *et al.*, 2005). Le NO semble donc jouer un rôle important dans les stades précoces de la symbiose rhizobienne. Par ailleurs, de nombreuses études montrent son implication dans la régulation de la symbiose entre *M. truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. En effet, une production de NO, dépendante de l'activité NR (Horchani *et al.*, 2011), est observée dans les nodosités (Baudouin *et al.*, 2006) ainsi qu'une modulation de l'expression des gènes liés au NO au cours de la formation de la nodosité (Ferrarini *et al.*, 2008; Boscarri *et al.*, 2013). De plus, l'utilisation de racines surexprimant le gène *hmp*, codant pour une flavohémoglobine capable de piéger le NO, a

montré une diminution de l'expression des gènes impliqués dans le développement des nodosités (del Giudice *et al.*, 2011) suggérant ainsi la participation du NO dans le développement de ces organes.

Le NO semble également être impliqué dans la symbiose MA. Calcagno *et al.*, (2012) ont mis en évidence la présence de NO dans les premiers stades de l'interaction entre *M. truncatula* et *Gigaspora margarita*. En effet, les racines de *M. truncatula* traitées avec des exsudats de *G. margarita* montrent une augmentation des niveaux de NO 5 min après traitement.

e. NO et nutrition azotée

La relation entre le NO et le métabolisme azoté est détaillée dans l'introduction de l'article « Cross-regulation between N metabolism and nitric oxide (NO) signaling during plant immunity » (*Chapitre II 2.1*).

1.7 Conclusion

Nos premières expériences nous ont permis de mettre en évidence l'implication de l'azote dans la résistance de *M. truncatula* à *A. euteiches* (*cf Chapitre I*). D'après la bibliographie, nous savons que la synthèse du NO est dépendante de l'azote et liée au métabolisme azoté. De plus, le NO est une molécule impliquée dans les réponses de défense. Nous nous sommes ainsi demandé quel pouvait être le rôle du NO et de son homéostasie dans la régulation de l'immunité des plantes par l'azote.

2. Résultats

2.1 Article scientifique: Cross-regulation between N metabolism and nitric oxide (NO) signaling during plant immunity

Le but de cette étude est d'analyser l'interaction entre le nitrate et le NO dans le cadre de la réponse immunitaire chez *M. truncatula* suite à l'infection par *A. euteiches*, et ainsi mieux comprendre l'impact du NO dans les relations nutrition/défense.

L'article est organisé en deux parties distinctes. La première partie correspond à une brève revue bibliographique qui se focalise majoritairement sur les liens entre NO et le métabolisme azoté. La deuxième partie expérimentale a pour objectif d'évaluer (i) si des changements dans l'homéostasie du NO pouvaient affecter la résistance de *M. truncatula* à *A. euteiches* et (ii) si l'homéostasie du NO pouvait être modulée par la nutrition azotée au cours de l'interaction *M. truncatula/A. euteiches*.

Les travaux de cette publication ont été réalisés sur le génotype A17 et sur les racines transformées de ce génotype.



Cross-Regulation between N Metabolism and Nitric Oxide (NO) Signaling during Plant Immunity

Elise Thalineau¹, Hoai-Nam Truong¹, Antoine Berger², Carine Fournier¹, Alexandre Boscari², David Wendehenne¹ and Sylvain Jeandroz^{1*}

¹ Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France, ² Institut Sophia Agrobiotech, UMR, INRA, Université Nice Sophia Antipolis, CNRS, Sophia Antipolis, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Jeremy Astier,
Helmholtz Zentrum München,
Germany

Reviewed by:

Christian Lindermayr,
Helmholtz Zentrum München –
German Research Center
for Environmental Health, Germany
Helena G. Carvalho,
Instituto de Biologia Molecular
e Celular, Portugal
Elodie Vandelle,
Università degli Studi di Verona, Italy

*Correspondence:

Sylvain Jeandroz
sylvain.jeandroz@agrosupdijon.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 27 November 2015

Accepted: 24 March 2016

Published: 08 April 2016

Citation:

Thalineau E, Truong H-N, Berger A,
Fournier C, Boscari A, Wendehenne D
and Jeandroz S (2016)
Cross-Regulation between N
Metabolism and Nitric Oxide (NO)
Signaling during Plant Immunity.
Front. Plant Sci. 7:472.
doi: 10.3389/fpls.2016.00472

Plants are sessile organisms that have evolved a complex immune system which helps them cope with pathogen attacks. However, the capacity of a plant to mobilize different defense responses is strongly affected by its physiological status. Nitrogen (N) is a major nutrient that can play an important role in plant immunity by increasing or decreasing plant resistance to pathogens. Although no general rule can be drawn about the effect of N availability and quality on the fate of plant/pathogen interactions, plants' capacity to acquire, assimilate, allocate N, and maintain amino acid homeostasis appears to partly mediate the effects of N on plant defense. Nitric oxide (NO), one of the products of N metabolism, plays an important role in plant immunity signaling. NO is generated in part through Nitrate Reductase (NR), a key enzyme involved in nitrate assimilation, and its production depends on levels of nitrate/nitrite, NR substrate/product, as well as on L-arginine and polyamine levels. Cross-regulation between NO signaling and N supply/metabolism has been evidenced. NO production can be affected by N supply, and conversely NO appears to regulate nitrate transport and assimilation. Based on this knowledge, we hypothesized that N availability partly controls plant resistance to pathogens by controlling NO homeostasis. Using the *Medicago truncatula/Aphanomyces euteiches* pathosystem, we showed that NO homeostasis is important for resistance to this oomycete and that N availability impacts NO homeostasis by affecting S-nitrosothiol (SNO) levels and S-nitrosoglutathione reductase activity in roots. These results could therefore explain the increased resistance we noted in N-deprived as compared to N-replete *M. truncatula* seedlings. They open onto new perspectives for the studies of N/plant defense interactions.

Keywords: nitrogen metabolism, plant immunity, *Aphanomyces euteiches*, *Medicago truncatula*, nitric oxide homeostasis

NITROGEN AND THE PLANT IMMUNE RESPONSE

Plants are under the constant threat of pathogen attacks that limit their survival and are major yield-limiting factors. In response to these attacks, plants activate multiple defense reactions both at the site of infection and systemically, which in many cases lead to resistance. These reactions include massive transcriptional reprogramming, cell wall reinforcement, synthesis of

antimicrobial metabolites, and production of pathogenesis-related (PR) proteins. These events are mediated by a variety of rapidly mobilized molecules, such as second messengers, e.g., Ca^{2+} , protein kinases, reactive oxygen species (ROS), or reactive nitrogen species (RNSs), including nitric oxide (NO). Although these defense responses have been widely studied, it has become increasingly obvious over the past years that a plant's capacity to mobilize them is greatly affected by its physiological status (Snoeijs et al., 2000) and its development (Develey-Riviere and Galiana, 2007).

Nutrients are important for the growth and development of plants and microorganisms. Among them, nitrogen (N) can affect the fate of an interaction between a plant and a pathogen (Dordas, 2008). No general rules can be drawn about modification of resistance by N. Although we know that N lack or excess, along with the nature of available N in soil, can modulate plant resistance (Huber and Watson, 1974), the underlying mechanisms remain unclear. Recent works indicate that plants' capacity to acquire and assimilate N could partly explain nutrition effects on plant defense. N is taken up by the roots mostly in the form of nitrate (NO_3^-) in aerobic soils and ammonium (NH_4^+) in flooded wetlands or acidic soils. Ammonium taken up directly from the soil or resulting from the reduction of NO_3^- and nitrite (NO_2^-) by nitrate reductase (NR) and nitrite reductase (NiR), respectively, is assimilated *via* the glutamine synthetase (GS)/glutamate synthase cycle (Xu et al., 2012). The uptake of mineral N from the soil and the subsequent distribution to the whole plant is driven by nitrate transporters from the multigenic *NRT2* and *NPF* families and by ammonium transporters from the *AMT* family (Krapp, 2015). The contribution of several of these transporters to plant defense has recently been highlighted in *Arabidopsis thaliana*. For instance, induction of *AMT1.1* expression was evidenced upon infection by the bacterium *Pseudomonas syringae* or the fungus *Erysiphe cichoracearum* (Liu et al., 2010). The role of specific transporters was demonstrated using plant mutants: *nrt2* (deficient in the expression of the *NRT2.1* and *NRT2.2* genes) and *nrt2.6-1* mutants displayed altered sensitivity to the bacterial phytopathogens *P. syringae* and *E. amylovora* (Camanes et al., 2012; Dechorgnat et al., 2012). Besides N uptake into plants and its subsequent allocation, several results indicate that N assimilation and particularly amino acid homeostasis can impact plant-pathogen interactions (Zeier, 2013; Luna et al., 2014). Conversely, pathogen attacks are correlated with modulation of the expression of genes or of the activity of enzymes involved in N assimilation such as NR or GS2, in N remobilization such as GS1, and in amino acid metabolism [reviewed by Fagard et al. (2014)]. Whether these changes in N metabolism reflect the manipulation of host metabolism by the pathogen or result from the modulation of plant defenses is not always clear. Interestingly, some members of the GLR glutamate receptor family were recently proposed to play a role as amino acid sensors during plant defense, perhaps by sensing changes in extracellular amino acids caused by pathogen infection (Forde and Roberts, 2014). Crosstalk between N metabolism and phytohormones can also interfere with plant stress responses

and could be considered as a mechanism involved in the partitioning of available resources between defense and growth. For instance, N limitation induced the accumulation of salicylic acid (SA) in *A. thaliana* leaves (Yaeno and Iba, 2008). Conversely, ethylene/jasmonic acid signaling coordinated the upregulation of the nitrate transporter *NRT1.8* (*AtNPF7.2*) and the downregulation of *NRT1.5* (*AtNPF7.3*) genes to tune NO_3^- reallocation in plants from the shoot to the roots under stress conditions (Zhang et al., 2014). Finally, experiments on rice showed that N-induced susceptibility to *Magnaporthe oryzae* is genotype-dependent, and may be linked to N use efficiency (Ballini et al., 2013). These interesting data raise the question of the genetic control of N effects on plant immunity. The identification of the corresponding QTLs will permit to uncover new molecular actors of N-controlled resistance to pathogens.

NITRIC OXIDE AND N METABOLISM

The role of NO in plant defense is widely accepted. NO is involved in transcriptional regulation of defense genes encoding PR proteins or proteins involved in phytoalexin synthesis, SA accumulation, and post-translational protein modifications (Wendehenne et al., 2014). NO is a nitrogen species produced *via* a variety of pathways in plants (reviewed by Gupta et al., 2011c). Briefly, these pathways can be classified into two groups according to nitrogen-containing precursors: the L-arginine-dependent pathway (oxidative pathway), and the NO_2^- -dependent pathway (reductive pathway). NO_2^- -dependent NO synthesis involves NR which reduces NO_2^- to NO both *in vitro* and *in vivo* in specific physiological contexts (Yamasaki and Sakihama, 2000); alternatively, formation of NO through the reduction of NO_2^- by the mitochondrial respiratory chain can also be observed, particularly in roots (Gupta et al., 2011a; Horchani et al., 2011). Finally, NO can be produced by an apoplasmic non-enzymatic conversion of NO_2^- to NO at acidic pH, in the presence of reductants such as ascorbic acid (Bethke et al., 2004).

Several pathways involved in NO transformation and turnover and balancing the bioavailability of this molecule have been identified (Leitner et al., 2009). Firstly, NO can react with reduced glutathione to produce S-nitrosoglutathione (GSNO), a low-molecular-weight S-nitrosothiol (SNO) that is more stable than NO and considered to be a mobile reservoir of NO. The cellular level of GSNO is enzymatically regulated primarily by GSNO reductase (GSNOR), which catalyzes the reduction of GSNO to oxidized glutathione and ammonium. Importantly, Yun et al. (2016) recently reported that NO and GSNO have additive functions in plant immunity but also in plant development. NO and GSNO might have distinct or overlapping molecular targets, thus allowing differential control of key cellular processes belonging to both defense and development. Secondly, besides their O_2 binding properties, hemoglobins (Hbs) can metabolize NO into NO_3^- and therefore are also considered as NO and NO_2^- concentration modulators (Gupta et al., 2011b). Finally, NO rapidly reacts with superoxide (O_2^-) to

form peroxynitrite (ONOO^-), an oxidizing and nitrating RNS produced for instance in plant cells during immune responses (Vandelle and Delledonne, 2011). These molecules associated with NO turnover also play a role in the plant immune response. For instance, GSNO plays a key role in mediating the structural and functional changes of NPR1, a key transcription coactivator of plant immunity (Tada et al., 2008).

Nitric oxide is partly produced through NR, dependent on its substrate/product $\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$ as well as on L-arginine and polyamines. As a result, cross-regulation between NO signaling and N supply/metabolism is expected. Several lines of evidence show that NO production is likely to be affected by N supply. In a physio-pathological context, plant NO production is dependent on the form of N supply. Besson-Bard et al. (2008) and Gupta et al. (2013) showed that tobacco cell suspensions or leaves from plants grown on ammonium instead of nitrate as an N source emitted less NO when elicited by cryptogeiin or *P. syringae*. Thus these data highlight the determining role of the N source on the rate of NO synthesis. Modifications of the intracellular concentration of diverse intermediates of N metabolism such as amino acids or polyamines also result in the modulation of NO production. For instance, exogenously added polyamines induced rapid NO biosynthesis in *A. thaliana* (Tun et al., 2006). In the same manner, overexpression of the Asparagine synthetase 1 gene significantly enhanced the NO burst (Hwang et al., 2011). Finally, N nutrition could also impact important redox molecules associated with NO homeostasis. Nitrate deprivation led to altered levels of ROSs in *A. thaliana* and tobacco (Schachtman and Shin, 2007; Besson-Bard et al., 2008). Pathogen-induced expression of the nitrate transporter *NRT2.6* was also correlated with ROS accumulation (Dechorgnat et al., 2012). Concentrations of antioxidant molecules such as glutathione (GSH) were altered (decreased in shoots and increased in roots) in *A. thaliana* and barley plants exposed to N deficiency (Kandlbinder et al., 2004; Kovacik et al., 2014).

Reciprocally, NO and derived RNS could participate in the regulation of N metabolism. NO can control physiological processes by modifying gene transcription. By analyzing available literature and databases, we identified interesting candidates likely to contribute to the crosstalk between N metabolism and NO among the numerous NO-regulated genes. Transcriptomic studies highlighted the up- or down-regulation of transcripts encoding N transporters (Ahlfors et al., 2009; Corti Monzon et al., 2014; Trevisan et al., 2015) or N assimilation/remobilization genes (Ferrarini et al., 2008; Ahlfors et al., 2009; Xu et al., 2013; Begara-Morales et al., 2014; Corti Monzon et al., 2014; Zeng et al., 2014; Trevisan et al., 2015) and amino acid metabolism-related genes (Ferrarini et al., 2008; Xu et al., 2013) upon modulation of NO homeostasis by treatment with NO donors, NO scavengers, or using mutants affected in NO homeostasis. Physiological studies identified NO as a regulator of N uptake in *Chlamydomonas reinhardtii*, possibly through the control of the expression of the nitrate or ammonium (*AMT1.1* and *AMT2.2*) transporters. In *A. thaliana*, the expression of the high affinity nitrate transporter *NRT2.1* was down-regulated by NO donors and in a *GSNOR* knock-out mutant, but the expression

of the low-affinity nitrate transporter *NRT1.1* remained unaltered (Frunghillo et al., 2014), suggesting a switch from high- to low-affinity nitrate transport. By contrast, the expression of *NRT2.1* was up-regulated through an NO-dependent process in *A. thaliana* roots exposed to cadmium (Besson-Bard et al., 2009). In addition to NO-mediated transcriptional regulation, many of NO biological functions arise as a direct consequence of chemical reactions between proteins and NO/RNS. Metal-nitrosylation, S-nitrosylation, and tyrosine nitration are notably emerging as main NO-dependent post-translational protein modifications (Astier and Lindermayr, 2012). Among the soluble proteins identified as S-nitrosylated or Tyr-nitrated, possible candidates contributing to the NO/N metabolism interplay are mainly involved in both N assimilation/remobilization and amino acid metabolism (Table 1). Post-translational inhibition of high-affinity ammonium and high-affinity $\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$ transporters by NO was highlighted in *C. reinhardtii* (Sanz-Luque et al., 2013). However, whether the reversible effect of NO was linked to S-nitrosylation of the transporters or to an indirect effect of NO leading to other post-translational modifications of the transporters remains to be determined (Sanz-Luque et al., 2013). In that same study, NO also inhibited NR activity reversibly, but not NiR or GS activity. This post-translational effect of NO on N transporters and NR might mediate the fast inhibition of N uptake and assimilation by ammonium in *C. reinhardtii*. More recently, inhibition of NR activity by NO was proposed to be partly mediated by a truncated hemoglobin THB1 whose gene expression is highly induced by NO (Sanz-Luque et al., 2015).

In higher plants, NO produced by denitrification in the rhizosphere of forest soils impacts N uptake without affecting gene expression patterns of putative N transporters, suggesting post-translational modification of these transporters (Dong et al., 2015). NR is also highly regulated by complex transcriptional and post-translational mechanisms. Studies on different models using NO donors, NO synthase inhibitors, or the scavenger cPTIO indicate that NO modulates NR activity. Results are sometimes contradictory. NR activity in leaves was inhibited under high NO concentrations (Rosales et al., 2011, 2012; Frunghillo et al., 2014), but was enhanced in cabbage (Du et al., 2008). Moreover, the inhibition or activation of NR by NO in tomato roots could depend on the NO_3^- concentration (Jin et al., 2009). The mechanisms explaining these effects of NO on NR are poorly understood. Regulation of NR by NO could occur through transcriptional downregulation of the NR *NIA* genes in *Chlamydomonas* and *A. thaliana* (de Montaigu et al., 2010). A direct interaction of NO with NR is possible, as S-nitrosylation of NR was evidenced in poplar exposed to cold stress (Cheng et al., 2015). Glutamine synthetase 2 is a second key enzyme of plant N metabolism involved in the synthesis of essentially nitrogenous compounds *via* Gln production. Interestingly, GS1 and GS2 were identified as molecular targets of NO (Table 1). GS activity was inhibited by Tyr nitration in root nodules of *Medicago truncatula*. This post-translational modification may mediate channeling of glutamate to boost plant antioxidant defenses (Melo et al., 2011) in response to NO. This interesting feature does not seem to be shared across the plant kingdom

TABLE 1 | Examples of S-nitrosylated or Tyr-nitrated proteins involved in N and amino acid metabolism.

Functions	Post-translational modifications	Identified Proteins	Conditions	Reference
Amino acid metabolism	Tyrosine nitration	Methionine synthase	–	Lozano-Juste et al., 2011
		S-nitrosylation	Asparagine synthase 3	Biotic stress
	S-nitrosylation	Glutamate decarboxylase	Biotic stress	Maldonado-Alconada et al., 2011
		EPSP synthase	Biotic stress	Astier et al., 2012
		Acetohydroxy acid isomeroreductase (Val and Ile synthesis)	Biotic stress	Astier et al., 2012
		Aspartate aminotransferase	Biotic stress	Astier et al., 2012
		Cysteine synthase	Abiotic stress	Puyaubert et al., 2014
		Alanine glyoxylate aminotransferase	Abiotic stress	Puyaubert et al., 2014
		Glutamate glyoxylate aminotransferase	Abiotic stress	Puyaubert et al., 2014
		Glutamine synthetase 2	Biotic stress	Cecconi et al., 2009; Lozano-Juste et al., 2011
Nitrogen metabolism	Tyrosine nitration	Glutamine synthetase 1	Rhizobium-legume symbiosis	Melo et al., 2011
		S-nitrosylation	Argininosuccinate synthase	Biotic stress
	Nitrite reductase	<i>atgsnar1-3</i>		Hu et al., 2015
	Glutamate synthase	Abiotic stress	Puyaubert et al., 2014	
	Glutamate dehydrogenase 1	Biotic stress	Maldonado-Alconada et al., 2011	
	Glutamate dehydrogenase 2	Biotic stress	Maldonado-Alconada et al., 2011	

since GS activity was not affected by the NO donor DEA-NONOate in the alga *Chlamydomonas* (Sanz-Luque et al., 2013).

ROLE OF NO/RNS IN THE MODULATION OF THE IMMUNE RESPONSE BY N NUTRITION: FIRST EXPERIMENTAL EVIDENCE

Altogether, these data indicate that N supply has an impact on plant immunity and NO/RNS signaling and lead us to wonder about the role of NO/RNS in the modulation of the immune response by N nutrition. In the present work, we used an *in vitro* pathosystem composed of the legume *M. truncatula* challenged with the soil-borne root pathogen *Aphanomyces euteiches*. This oomycete is considered as the most limiting factor for legume production. Resistance of *M. truncatula* roots includes protection of the central cylinder against pathogen invasion, associated with frequent pericycle cell divisions, lignin deposition, and accumulation of soluble phenolic compounds (Djébali et al., 2009). First investigations of the biochemical processes underlying the expression of this resistance showed modulation of H₂O₂ levels and of the activity of antioxidant enzymes (Djébali et al., 2009, 2011). Interestingly, in the *M. truncatula* A17 genotype, resistance against *A. euteiches* was significantly enhanced in response to NO₃⁻ starvation as compared to sufficient N conditions (Thalineau et al., unpublished). Based on the current literature, we hypothesized that NO could play a role in this N-induced modulation of *M. truncatula* defense responses against *A. euteiches*. We therefore first assessed whether changes in NO homeostasis could

indeed affect *M. truncatula* resistance to *A. euteiches*. Secondly, we determined whether NO homeostasis could be modulated by N nutrition during the *M. truncatula*-*A. euteiches* interaction. We considered NO homeostasis as the maintenance of a functional NO concentration in a specific condition, through a balance between its biosynthesis (e.g., NR activity) and turnover pathways (e.g., interactions with GSH or O₂^{·-} to form GSNO or ONOO⁻, respectively).

MATERIALS AND METHODS

Plant Growth and Inoculation by *A. euteiches*

We used the *M. truncatula* Jemalong-A17 genotype. *M. truncatula* seeds were scarified according to Djébali et al. (2009). After stratification overnight at 4°C, they were germinated in phytochambers with 16 h light under 350 μmol m⁻² s⁻¹ photons at 23°C / 8 h night at 21°C. One day after germination, the seedlings were transferred to 12 cm × 12 cm square Petri dishes containing modified M medium (Bécard and Fortin, 1988). This modified medium was sugar-free, enriched in phosphate (1.3 mM final concentration), and contained either 3.2 mM nitrate (complete medium) or no nitrate (NØ medium). The Petri dishes were sealed with parafilm and the roots were protected from light with aluminum foil, and then placed vertically in the culture chamber (16 h light under 350 μmol m⁻² s⁻¹ photons at 23°C/8 h night at 21°C) for 7 days. The strain *Aphanomyces euteiches* Drechs ATCC 201684 was used to inoculate the seeds one day after germination. Zoospores were produced as described in Rey et al. (2013), and each root was inoculated with 500 zoospores.

Agrobacterium rhizogenes Root Transformation

The pENTR4 vector carrying the MtNR1 or the MtNR2 fragment (Horchani et al., 2011) was recombined with the pK7GWIWG2d vector using LR clonase II enzyme mix (Invitrogen, France) to create RNA interference expression vectors. The MtGSNOR gene (*M. truncatula* Gene code Medtr7g099040) (1,143 bp) was amplified using *M. truncatula* cDNA as a template and the specific primers GSNOR-F 5'-AAAAGCAGGCTTCACCATGGCATCGTCGACTGAAGGT-3' and GSNOR-R 5'-AGAAAAGCTGGGTGTCAATGCAATGCAAGCACAC containing the corresponding attB recombination sites. The PCR product was recombined into the pDONR entry vector (Invitrogen) and checked by sequencing. The pDONR vector carrying the MtGSNOR gene was recombined with pK7WG2d plasmids¹ to create the overexpression vector. The constructs pK7GWIGW2d-MtNR1-2/GFP (RNAi::MtNIA1/2) and pK7WG2d-MtGSNOR/GFP (35S::GSNOR) were introduced into *A. rhizogenes* strain Arqual (Quandt et al., 1993). *M. truncatula* plants were transformed with *A. rhizogenes* according to Boisson-Dernier et al. (2001). Control plants were transformed with *A. rhizogenes* containing the pK7GWIGW5D or the pK7WG2d empty vectors. Hairy roots were selected based on the fluorescent marker GFP 21 days after transformation.

RNA Extraction, Reverse Transcription, and Quantitative PCR on Transformed Roots

Total RNA was extracted from transformed roots using TRIzol[®] Reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's recommendations. To carry out the qPCR reaction, RNAs (0.5–1 µg) were reverse-transcribed in a final volume of 20 µL in the presence of RNasin (Promega, Charbonnières, France), and oligo(dT)₁₅, with M-MLV reverse transcriptase (Promega, Charbonnières, France), as recommended by the manufacturer.

Quantitative PCR was performed on reverse-transcribed RNAs from four independent biological replicates per condition and from two independent plant cultures. Quantitative PCR reactions were performed in an ABI PRISM 7900 sequence detection system (Applied Biosystems[®], Saint-Aubin, France), in a final volume of 15 µL containing Absolute SYBR green ROX Mix (Thermo Scientific, Surrey, UK), 0.3 µM of gene-specific primers, and 5 µL of cDNA template diluted 60-fold. The reference gene used for normalization was *MtEF1α*. Relative expression was expressed as $2^{-\Delta Ct}$ test genes – reference gene. The primers used for the qPCR all displayed a high amplification efficiency (90–100%). They were the following:

MtGSNORforward 5'-GTGACTGGGCGTGTATGGAA-3'
 MtGSNORreverse 5'-TGCAAGCACACAACGAAGAC-3'
 MtNIA1forward 5'-TGTTCCACAGGCTTCTCCAGATCA-3'
 MtNIA1reverse 5'-CATACAGCGTCGTACTCAGCGACA-3'

MtNIA2forward 5'GCAAACCGGACGGAGGATGA-3'
 MtNIA2reverse 5'CCGTGATGAATCCCACACTATATTC-3'
 MtEF1αforward 5'-AAGCTAGGAGGTATTGACAAG-3'
 MtEF1αreverse 5'-ACTGTGCAGTAGTACTTGGTG-3'

Inoculation of Transformed Root Cultures with *A. euteiches*

Roots were cultured on Shb10 medium (Boisson-Dernier et al., 2001) and transferred on modified Fahraeus medium enriched in ammonitrate (1 mM NH₄NO₃ final) one day before inoculation. Inoculation of the root cultures with *A. euteiches* strain ATCC 201684 was carried out by adding 10 mL of an *A. euteiches* zoospore suspension containing 80,000 zoospores.mL⁻¹ in sterilized Volvic (Colditz et al., 2007) water. Zoospore production was initiated as described in Rey et al. (2013). Control root cultures were inoculated with 10 mL of sterile Volvic water. After 4 h of incubation in the dark, the zoospore solution was drained off the roots, and the Petri dishes were placed back into the growth room and left there for 7 days in the dark.

Assessing Infection Levels by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Assessment of *A. euteiches* development in roots was performed by ELISA, using rabbit polyclonal serum raised against *A. euteiches*, and a mouse anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate as described by Sleczak et al. (1999), on protein extracts from roots from pooled plants. Alkaline phosphatase activity was monitored by recording the increase in absorbance at 405 nm for 2–3 h, and was expressed as the slope of the resulting curve per mg of root fresh weight.

Hydrogen Peroxide Quantification

H₂O₂ concentration was measured using an Amplex Red[®]/peroxidase-coupled fluorescence assay adapted from Ashtamker et al. (2007). Roots were ground on ice and in the dark, in 1 mL of KRPG buffer (145 mM NaCl; 5.7 mM K₂HPO₄; 4.86 mM KCl; 0.54 mM CaCl₂; 1.22 mM MgSO₄; 5.5 mM glucose; pH 7.35) with 10 µM Amplex Red[®] and 0.2 U/mL of Horse Radish Peroxidase (HRP) per 100 mg of fresh weight. Catalase, an H₂O₂ scavenger, was used as a control. After 10 min of incubation at 4°C with catalase (1 unit/µL), 10 µM Amplex Red[®] and 0.2 U/mL of HRP were added to the samples. After centrifugation (10,000×g, 15 min, 4°C), 100 µL of supernatant were used to quantify resorufin (λ_{ex} = 560 nm; λ_{em} = 584 nm) by spectrofluorimetry (Mithras, Berthold Technology). The relative fluorescence units were converted into µmol of H₂O₂ mg⁻¹ root fresh weight on the basis of a standard curve established from known concentrations of H₂O₂.

Nitric Oxide and Peroxynitrite Quantification

ONOO⁻ and NO concentrations were determined using A17 or transformed roots ground on ice and in the dark, with 1 mL of Tris-HCl (10 mM, pH 7.5), KCl (10 mM) buffer

¹<https://gateway.psb.ugent.be/>

with 5 μM aminophenyl fluorescein (APF) or 10 μM 4,5-diaminofluorescein (DAF), respectively, per 100 mg of fresh weight. Epicatechin, an ONOO⁻ scavenger, was used as a control. After 10 min of incubation at 4°C with epicatechin (1 mM), APF was added to the samples at a final concentration of 5 μM . cPTIO, an NO scavenger, was used as a control. After 10 min of incubation at 4°C with cPTIO (500 μM), DAF was added to the samples at a final concentration of 10 μM .

After centrifugation (10,000 \times g, 15 min, 4°C), 100 μL of supernatant were used to quantify ONOO⁻ or NO ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$) by spectrofluorimetry (Mithras, Berthold Technology).

S-nitrosothiol Quantification

S-nitrosothiol quantification was performed using the Saville–Griess assay (Gow et al., 2007). A17 roots or transformed roots were ground, on ice and in the dark, in extraction buffer (1 mL/100 mg of fresh weight, 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5; 1 mM PMSF). After centrifugation (10,000 \times g, 15 min, 4°C), 100 μL of supernatant were incubated with 100 μL of buffer A (0.5 M HCl; 1% sulfanilamide) or 100 μL of buffer B (0.5 M HCl; 1% sulfanilamide; 0.2% HgCl₂). After incubation (15 min at room temperature), 100 μL of Griess reagent[(0.5 M HCl; 0.02% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride)] were added. After 15 min, SNOs were quantified by measuring absorbance at 540 nm. A standard curve was obtained using different concentrations of GSNO.

Nitrate Determination

Nitrate determination was performed according to Miranda et al. (2001), based on the reduction of nitrate to nitrite by vanadium and colorimetric detection at 540 nm of nitrite in the presence of sulfanilamide and N-1-naphthylethylenediamine. Approximately 100 mg of 7-day-old plant roots were collected, flash-frozen in liquid N₂, and ground into powder. Three hundred micro liter of ultra-pure water were added to 20 mg of frozen sample, thoroughly vortexed, and incubated with occasional mixing for 15 min on ice. After centrifugation 15 min at 13,000 \times g and 4°C, the supernatant was recovered and used for nitrate determination.

Nitrate Reductase Activity Measurements

Transformed root samples were frozen in liquid nitrogen and ground using pestle and mortar. Extraction was performed in MOPS buffer (1 mL per 100 mg of fresh weight, 50 mM MOPS-KOH buffer, pH 7.6; 5 mM NaF; 1 μM Na₂MoO₄; 10 μM FAD; 1 μM leupeptin, 0.2 g/g FW polyvinylpyrrolidone; 2 mM β -mercaptoethanol; 5 mM EDTA). After centrifugation (20,000 \times g, 5 min, 4°C), the supernatant was used to measure NR activity. The reaction mixture consisted of 50 mM MOPS-KOH buffer, pH 7.6, containing 1 mM NaF, 10 mM KNO₃, 0.17 mM NADH, and 5 mM EDTA. After incubation 15 min at 30°C, the reaction mixture was stopped by adding an equal volume of sulfanilamide (1% w/v in 3 N HCl) followed by N-naphthylethylenediamine dihydrochloride (0.02%, w/v), and

the A₅₄₀ was measured. A standard curve was obtained based on different concentrations of nitrite.

GSNOR Activity Measurements

To measure GSNOR activity, roots were ground in liquid nitrogen and proteins were extracted in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8, 0.5 mM EDTA, and 1 mg/mL of a protease inhibitor cocktail (1 mL of buffer per 100 mg of fresh weight). GSNOR activity was assayed from the rate of NADH oxidation by measuring the decrease in absorbance at 340 nm at 25°C using 25 μg of proteins in a total volume of 200 μL of extraction buffer containing 350 μM NADH with or without 350 μM GSNO. GSNO reductase activity was determined by subtracting NADH oxidation values in the absence of GSNO from values in the presence of GSNO. All samples were protected from light during the assay and tested for linearity. A standard curve was obtained using different concentrations of NADH.

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using one- or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's test. Data were considered as significantly different when $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

NO Homeostasis Participates in the *M. truncatula* Immune Response

To investigate the putative role of NO homeostasis in the *M. truncatula*/*A. euteiches* interaction, roots were transformed to inactivate the NR-encoding *MtNIA1/2* genes or to overexpress GSNOR-encoding genes. Quantification of gene transcripts in transformed roots using RT-qPCR confirmed that the two *NIA* genes were repressed (**Figure 1A**) while GSNOR was overexpressed (**Figure 1B**). To perform functional validation of the different constructs, we quantified NO and SNO levels in transformed roots. The two genetic manipulations modulated NO or SNO levels (**Figure 1**). SNO levels remained unchanged in *RNAi::MtNIA1/2* roots as compared to the controls, whereas NO levels clearly decreased (**Figure 1A**). This was in accordance with the downregulation of NR, a major enzymatic source of NO. Conversely, NO levels in the *35S::GSNOR* roots did not significantly change, but SNO significantly increased as compared to control roots (**Figure 1B**). This was surprising because in most previous experiments a negative correlation was described between SNO levels and GSNOR activity (Feechan et al., 2005; Rusterucci et al., 2007; Yun et al., 2011). However, it is interesting to note that in pea (a legume closely related to *M. truncatula*), higher SNO levels induced by wounding were correlated with higher GSNOR activity (Corpas et al., 2008).

We studied the impact of these genetic transformations on the *M. truncatula*/*A. euteiches* interaction. ELISA tests using antibodies raised against *A. euteiches* (Slezack et al., 1999) were performed to quantify the presence of the pathogen in roots. In *RNAi::MtNIA1/2* roots (**Figure 2A**), *A. euteiches* colonization was significantly greater than in control transformed roots

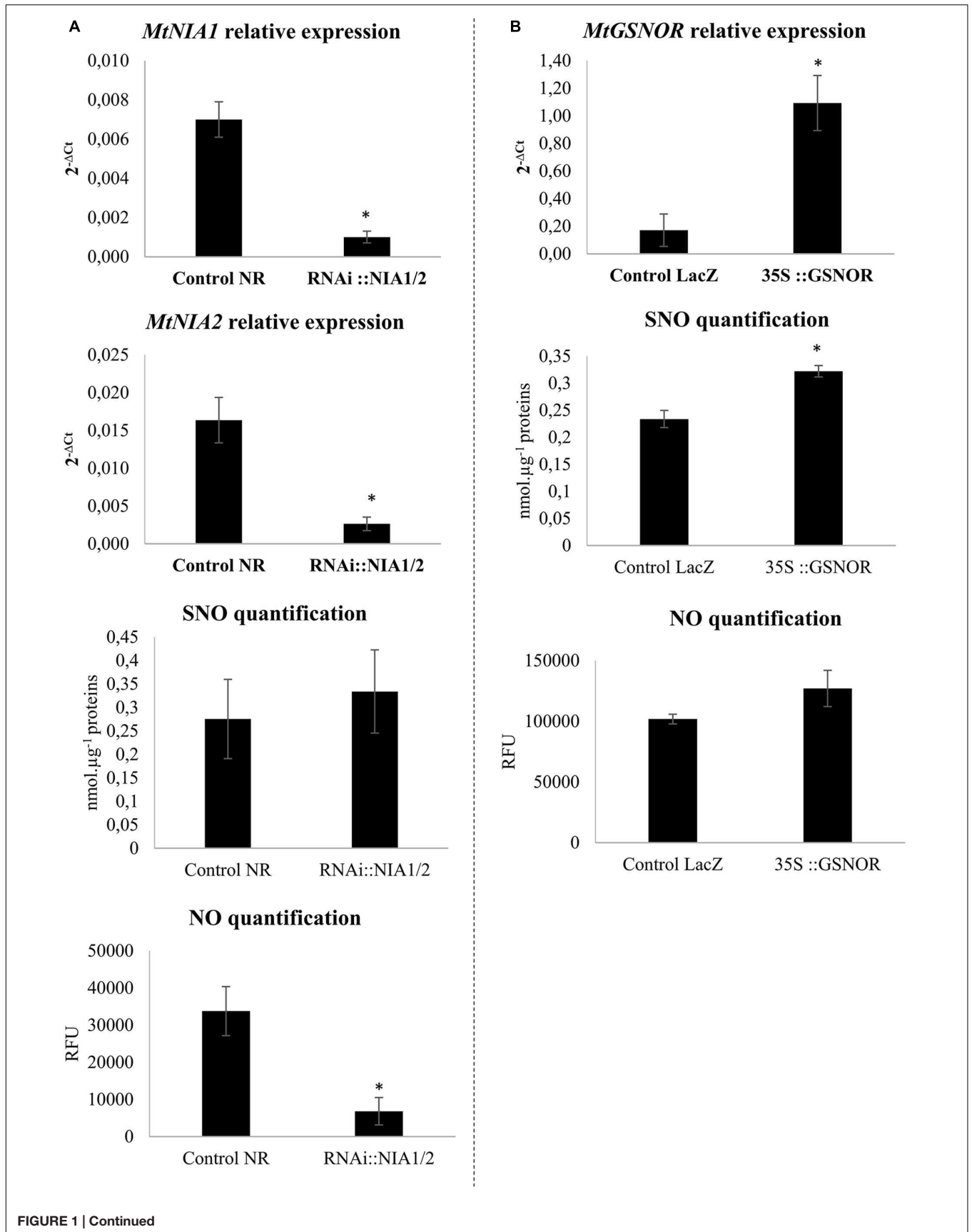
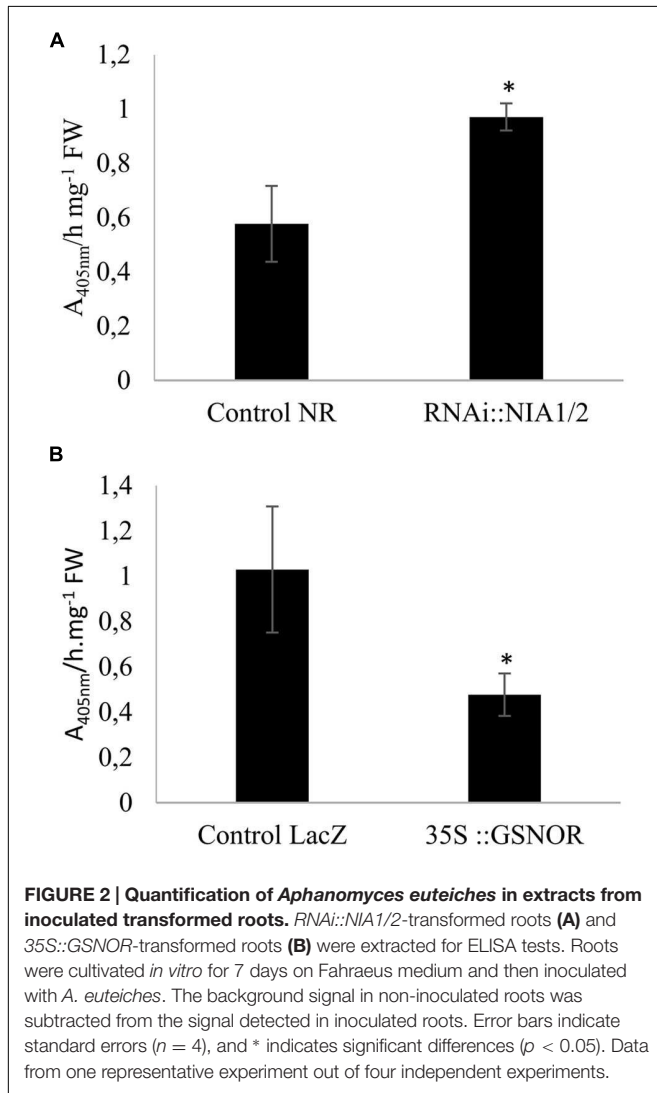


FIGURE 1 | Continued

FIGURE 1 | Continued

Transformed root validation. (A) Transcript levels of *MtNIA1* and *MtNIA2* in *RNAi::NIA1/2*-transformed roots were compared to control transformed roots (control NR). SNO quantification using the Saville–Griess assay and NO quantification using the fluorophore DAF (10 μ M). Control NR and *RNAi::NIA1/2*-transformed roots extracts were pre-incubated or not with 500 μ M cPTIO as an NO scavenger. **(B)** Transcript levels of *MtGSNOR* in *35S::GSNOR*-transformed roots were compared to control transformed roots (control LacZ). SNO quantification using the Saville–Griess assay and NO quantification using the fluorophore DAF (10 μ M). Control LacZ and *35S::GSNOR*-transformed roots extracts were pre-incubated or not with 500 μ M cPTIO as an NO scavenger. Error bars indicate standard errors ($n = 4$ for transcripts and NO levels; $n = 8$ for SNO levels), and * indicates significant differences ($p < 0.05$).

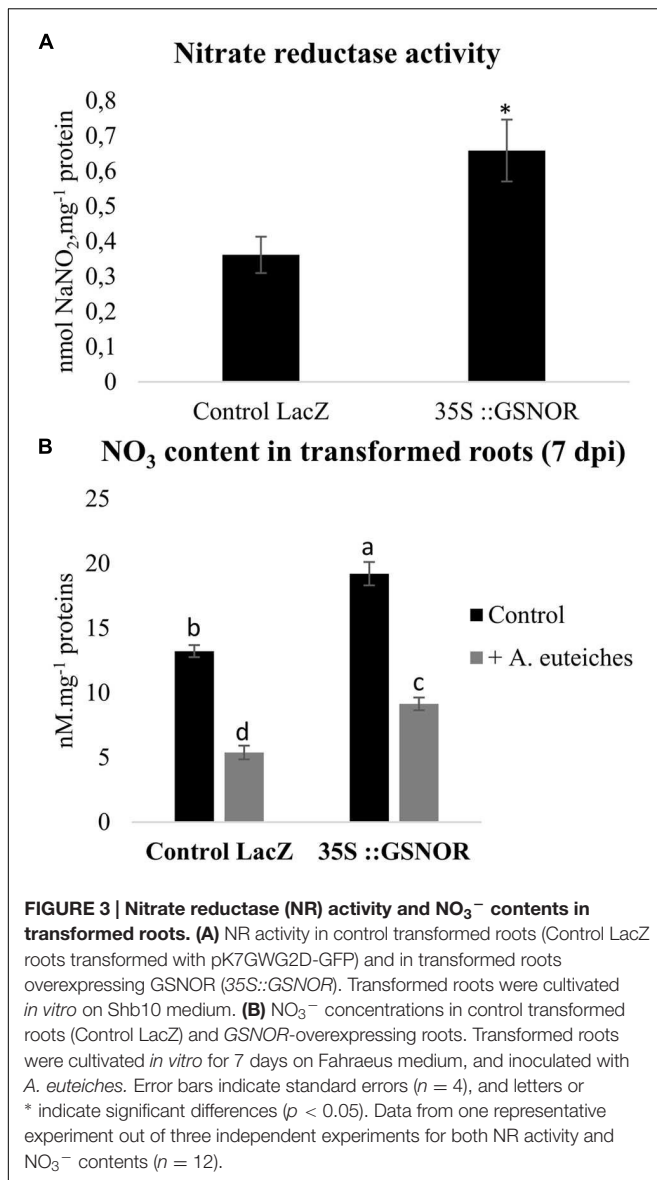


(Control NR roots). These data reaffirm the role of the NR enzyme in the plant immune response. In *A. thaliana*, the NR-deficient double mutant (*nia1 nia2*) failed to exhibit a hypersensitive response and was hyper-susceptible to *P. syringae* (Modolo et al., 2006; Oliveira et al., 2009) and to the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* or *Botrytis cinerea* (Perchepied et al., 2010; Rasul et al., 2012). Although these effects were attributed to the substantially reduced NO levels in this mutant, a side effect of N metabolism on plant defense cannot be excluded as NR stands at the crossroads between N metabolism and NO production.

Our results using *GSNOR*-transformed roots showed that pathogen levels were lower in *GSNOR*-overexpressing roots (Figure 2B) than in control transformed roots (Control LacZ roots). *GSNOR* could therefore be considered as a positive regulator of *M. truncatula* resistance to *A. euteiches*. Previous works already investigated the physiological roles of *GSNOR* in plant-pathogen interactions, using transgenic *A. thaliana* plants (Feechan et al., 2005; Rusterucci et al., 2007; Yun et al., 2011). Results are sometimes contradictory, as modulation of *AtGSNOR* expression enhanced or decreased plant disease resistance depending on the pathosystem. *GSNOR* could play a significant role in plant immunity because GSNO is considered as a mobile reservoir of NO, is more stable than NO, and is a transnitrosylation agent of proteins. The contrasted results obtained in our study with NR and *GSNOR* constructs could be attributed to the specific roles of the corresponding proteins in NO homeostasis. NR is involved in NO synthesis, whereas the primary role of *GSNOR* is to regulate GSNO contents. The recent results from Yun et al. (2016) confirm that GSNO and NO may play distinct roles in plant immunity by acting on different molecular targets. In addition, *GSNOR* indirectly affects NO, GSH, ROS, and total intracellular nitrosothiol (SNO) levels, indicating that *GSNOR* might be more globally involved in the regulation of the cell redox state (Espunya et al., 2006; Yun et al., 2011).

Nitric Oxide partly regulates N metabolism. Therefore we also investigated the effects of *GSNOR* overexpression on root NO_3^- contents and NR activity in transformed roots. *GSNOR* overexpression increased basal NO_3^- content and NR activity (Figures 3A,B). Modulation of N metabolism by GSNO and NO in *A. thaliana* has been described (Frunghillo et al., 2014), and was explained by the effect of NO and GSNO on NR activity and on the expression of the *AtNRT2.1* high-affinity NO_3^- transporter gene. Similarly to our data, that study shows that *GSNOR* overexpression is correlated with higher NR activity and NO_3^- content. Interestingly, we noted that pathogen colonization reduced NO_3^- concentrations in roots by approximately 65%, suggesting an effect of *A. euteiches* on nitrate transport and/or NO_3^- assimilation. Although we found a higher NO_3^- content in *35S::GSNOR*-infected roots than in control infected roots, the amplitude of the pathogen-induced decrease in NO_3^- level was not impacted in *35S::GSNOR* roots, suggesting that this process is independent of GSNO homeostasis. This reduced level of NO_3^- is unlikely to result from consumption of NO_3^- by the pathogen: data mining of the *A. euteiches* database revealed that no homologs of the NR, NIR, and NO_3^- transporter (NRT2) genes were detected in the genome of this pathogen², confirming

²<http://www.polebio.lrsv.ups-tlse.fr/aphano/>



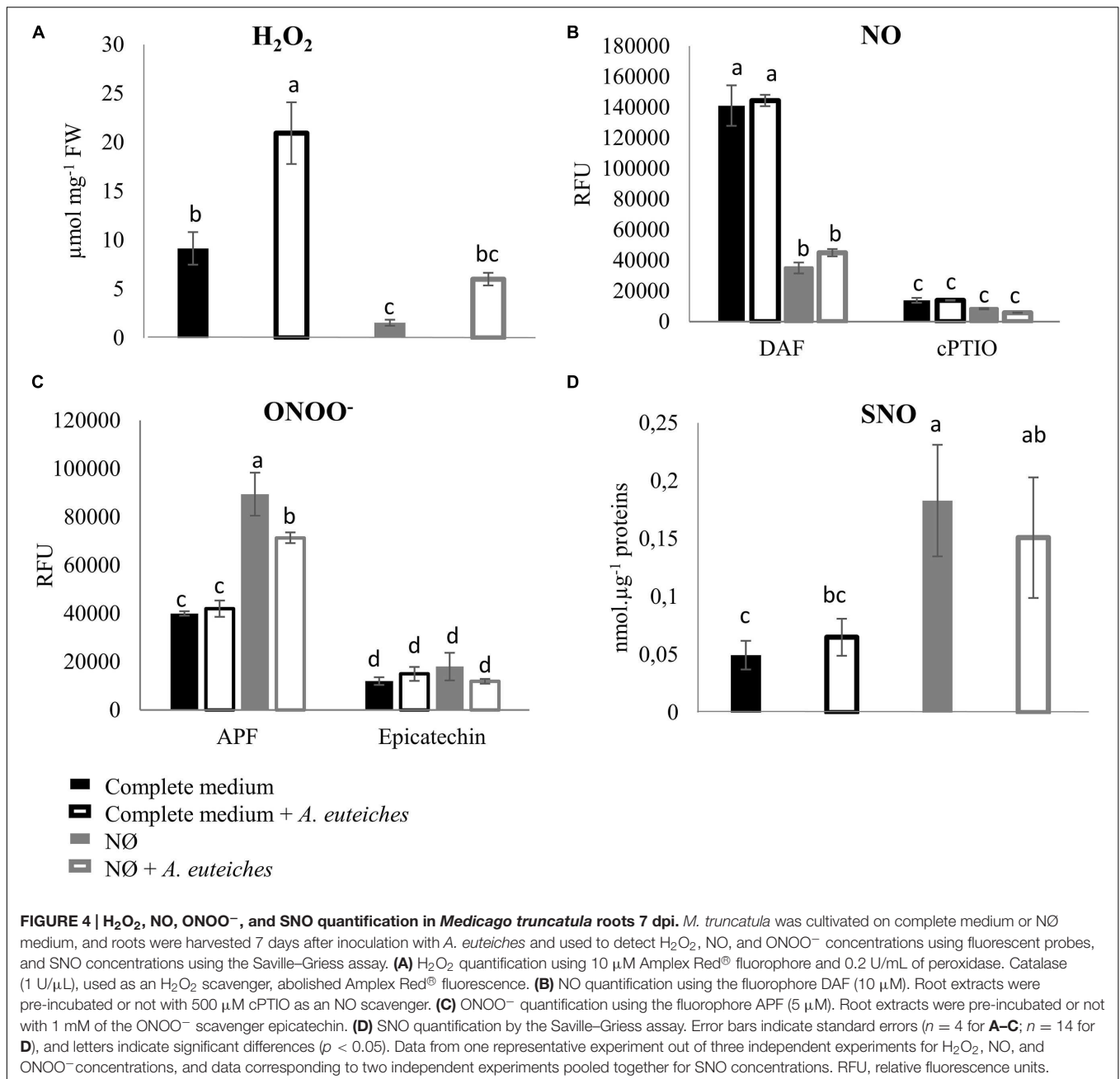
earlier observations that NO₃⁻ is unfavorable for *A. euteiches* development (Huber and Watson, 1974). Alternatively, we cannot exclude that the decreased NO₃⁻ content in infected roots could be due to nitrate leakage from the roots related to developing necrosis.

Effect of N Nutrition on NO/H₂O₂/ONOO⁻ Accumulation and SNO Contents

To analyze the role of N availability on NO, H₂O₂, and ONOO⁻ accumulation, *M. truncatula* plants were cultivated in complete medium or NO₃⁻-deficient medium (NØ), and inoculated or not with *A. euteiches*. The NO scavenger cPTIO and the ONOO⁻ scavenger epicatechin were used as controls to check the specificity of the fluorescence probes. We observed that NO₃⁻ deficiency caused a significant increase in ONOO⁻ content

on NØ medium (Figure 4C), whereas NO and H₂O₂ levels decreased (Figures 4A,B), highlighting a link between NO₃⁻ content and production of these reactive species. A clear effect of pathogen colonization was only evidenced for H₂O₂ contents (Figure 4A), and this increase was abolished on NØ. Surprisingly, although NO production is considered as a common response to pathogens, no increase in NO levels was detected in response to *A. euteiches* (Figure 4B). More generally, whereas NO, ROS, or ONOO⁻ production has been widely described in response to pathogens, the literature does not give a clear picture of the cross-talks between these molecules. For instance, we observed a negative correlation between NO and ONOO⁻ contents in response to NO₃⁻ deficiency, but in other models high NO levels are often correlated with high ONOO⁻ levels (Abramowski et al., 2015; Kulik et al., 2015). These conflicting observations raise some questions. Are these discrepancies due to plant models or due to the difficulty in measuring and precisely localizing these molecules? Differences in the stability of these molecules or their specific scavenging by plants during pathogen attack could explain why we did not detect changes in ONOO⁻ or NO levels in response to *A. euteiches*. Moreover, NO could also be used by the pathogen to activate its own metabolism, an important step in plant infection by fungi (Sedlářová et al., 2016).

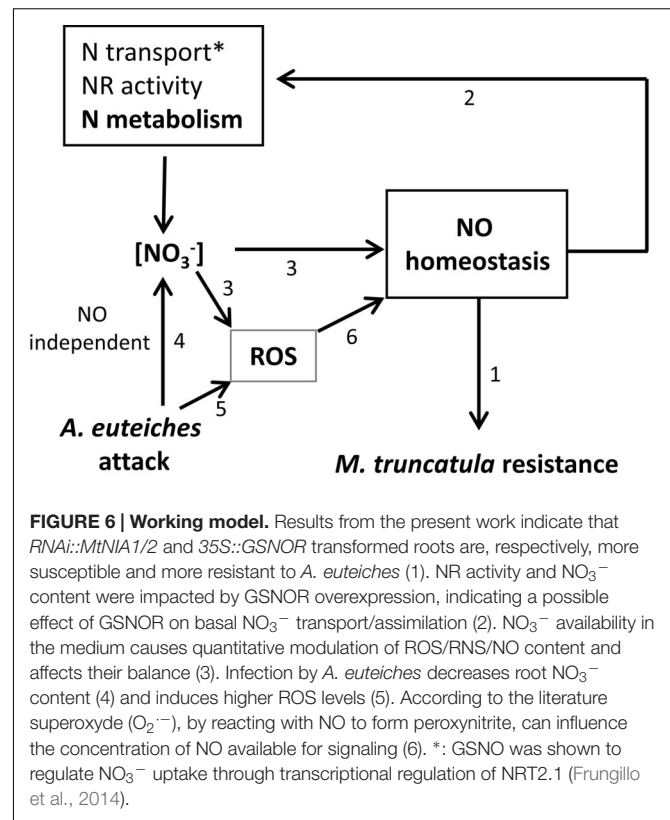
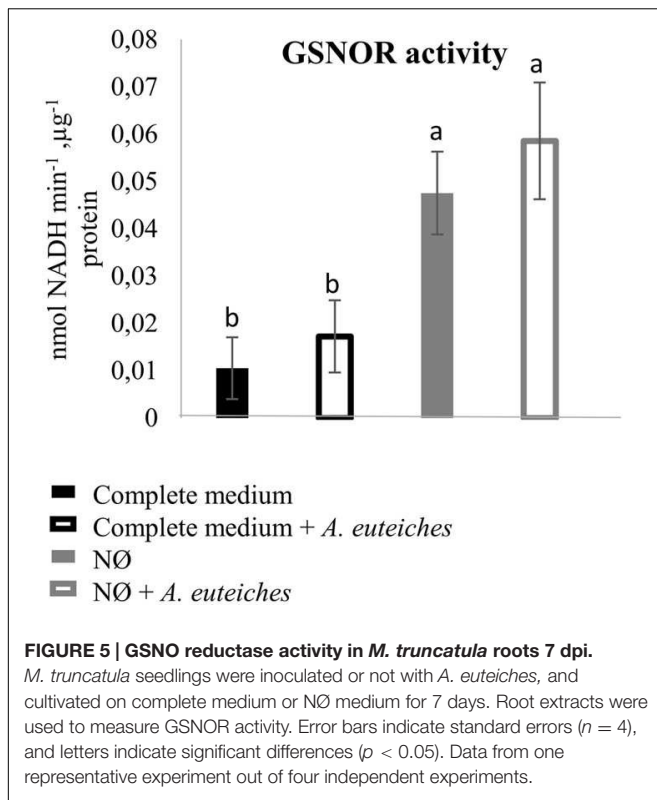
We also measured root SNO levels and GSNOR activity in the biological conditions of interest. Root SNO contents, determined using the Saville–Griess method, significantly increased on NØ medium as compared to the complete medium (Figure 4D). In response to *A. euteiches*, no significant change in SNO levels was highlighted (Figure 4D). Therefore, on NØ medium, the SNO content evolved in an opposite way to the NO content, similarly to the ONOO⁻ content. This result is in accordance with results reported in *Helianthus annuus* (Chaki et al., 2011), and can be attributed to the fact that NO is the source for ONOO⁻ and SNO. By contrast, a high NO content can be correlated with a high SNO content when plants are grown on culture medium containing NO₃⁻ (Abramowski et al., 2015; Pietrowska et al., 2015). Our data also suggest that NO₃⁻ nutrition impacts the overall balance between NO, ONOO⁻, and SNO. Regarding GSNOR, no changes in its activity was detected upon inoculation, in line with the absence of change in SNO levels in infected roots. In the roots of plants cultivated on NØ (Figure 5), higher GSNOR activity was correlated with higher SNO levels, confirming the positive correlation between GSNOR activity and SNO levels observed in 35S::GSNOR-transformed *Medicago* roots (Figure 1) and in pea, a closely related legume (Corpas et al., 2008). The positive or negative correlation between GSNOR activity and SNO levels or between NO and SNO levels depending on plant species and experimental conditions can be explained by several hypotheses. The SNO level is regulated through nitrosylation and denitrosylation; GSNOR, by controlling the level of GSNO, indirectly affects the level of S-nitrosylation. However, the TRX (thioredoxin)/NTR (NADPH-dependent TRX reductase) enzymatic system also controls S-nitrosylation (Kneeshaw et al., 2014). Interestingly, these activities were also identified in roots and activated by NO, leading to denitrosylation of specific proteins (Correa-Aragunde et al., 2015). Thus, these results, together with our study, illustrate the complex relationships



between NO production/GSNOR activity and total SNO levels. Abiotic stresses also increase GSNOR activity (Kubienova et al., 2014), and this appears to be the case for *M. truncatula* plants under NO₃⁻ deficiency. Higher GSNOR activity in N-deprived roots (Figure 5) could lead to a physiological state inducing higher resistance to *A. euteiches*, as observed in the 35S::GSNOR-transformed roots (Figure 2B). This could partly explain the enhanced resistance to this oomycete on NØ medium despite the low levels of NO in the roots. Thus, altogether our data highlight the possible positive and non-redundant roles of NO (Figures 1A and 2A) and SNO (Figures 1B, 2B, and 4D) in mediating *M. truncatula* resistance to *A. euteiches*.

CONCLUSION AND NEW HYPOTHESES

The results obtained in the present study are summarized in Figure 6. We have demonstrated, using transformed roots affected in genes involved in NO synthesis (*NIA* genes) and turnover (*GSNOR* gene), that deregulation of NO homeostasis has an effect on *M. truncatula* resistance against *A. euteiches*, as observed in other pathosystems (1). In addition, it appears that the modulation of NO homeostasis (through GSNOR overexpression) impacts NR activity and NO₃⁻ content, indicating possibly an effect of GSNOR (or GSNO) on basal NO₃⁻ transport/assimilation



and confirming the results of Frungillo et al. (2014) (2). In return, NO_3^- availability in the medium can affect NO homeostasis by modulating ROS/RNS/NO contents and their balance (3). Finally, infection by *A. euteiches* decreases root NO_3^- content (4) and induces higher ROS levels (5). Altogether these results highlight the close interplay occurring between N nutrition and NO homeostasis as well as the involvement of NO in the modulation of plant resistance by N nutrition.

Future work should take into account the role of N availability on NO-mediated plant molecular responses. Thus, the study of the specific role of GSNO in this process through the identification S-nitrosylated/denitrosylated proteins under different N availability conditions and N sources seems promising. A focus will be made on proteins involved in the plant immune response (1), but also on the feedback regulation of N metabolism by NO because NO could control NO_3^- availability and therefore plant resistance (2) (Figure 6). Investigations using foliar pathogens and other plant models will lead to a possible generalization of this phenomenon. More generally, plant N use efficiency can be affected by NO since NO controls not only N metabolism but also plant root growth and architecture changes in response to NO_3^- (Manoli et al., 2014; Sun et al., 2015). Recent data show that plant N use efficiency and N-induced susceptibility to pathogens may be linked (Ballini et al., 2013). Consequently future studies should also focus on candidate proteins involved in root development. Finally, experiments conducted with plant genotypes differing in their resistance levels will permit to

study the quantitative effect of NO/ROS production on plant defense.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ET, H-NT, ABo, and SJ conceived and designed the research; ET, H-NT, CF, ABo, and ABe carried out the experiments and analysis/interpretation of data; ET, H-NT, DW, and SJ wrote the manuscript. All authors contributed to the discussion and approved the final manuscript.

FUNDING

ET was funded by a Ph.D. contract (2013–2032) from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. This work was supported by a grant from AgroSup Dijon and the Conseil Régional de Bourgogne (PARI8).

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank N. Pauly for practical advice on *M. truncatula* root transformation, E. Gaulin, A. Nars, and C. Jacquet for providing the *A. euteiches* strain Drechs. ATCC 201684, and advice on the pathosystem, and E. Dumas-Gaudot for gift of the polyclonal antibody directed against *A. euteiches*.

REFERENCES

- Abramowski, D., Arasimowicz-Jelonek, M., Izbińska, K., Billert, H., and Floryszak-Wieczorek, J. (2015). Nitric oxide modulates redox-mediated defense in potato challenged with *Phytophthora infestans*. *Eur. J. Plant Pathol.* 143, 237–260. doi: 10.1007/s10658-015-0677-9
- Ahlfors, R., Brosche, M., Kollist, H., and Kangasjarvi, J. (2009). Nitric oxide modulates ozone-induced cell death, hormone biosynthesis and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 58, 1–12. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03756.x
- Ashtamker, C., Kiss, V., Sagi, M., Davydov, O., and Fluhr, R. (2007). Diverse subcellular locations of cryptogeiin-induced reactive oxygen species production in tobacco bright Yellow-2 cells. *Plant Physiol.* 143, 1817–1826. doi: 10.1104/pp.106.090902
- Astier, J., Besson-Bard, A., Lamotte, O., Bertoldo, J., Bourque, S., Terenzi, H., et al. (2012). Nitric oxide inhibits the ATPase activity of the chaperone-like AAA+ ATPase CDC48, a target for S-nitrosylation in cryptogeiin signalling in tobacco cells. *Biochem. J.* 447, 249–260. doi: 10.1042/BJ20120257
- Astier, J., and Lindermayr, C. (2012). Nitric oxide-dependent posttranslational modification in plants: an update. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 15193–15208. doi: 10.3390/ijms131115193
- Ballini, E., Nguyen, T. T., and Morel, J. B. (2013). Diversity and genetics of nitrogen-induced susceptibility to the blast fungus in rice and wheat. *Rice* 6, 32. doi: 10.1186/1939-8433-6-32
- Bécard, G., and Fortin, J. A. (1988). Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108, 211–218. doi: 10.1111/j.1469-8137.1988.tb03698.x
- Begara-Morales, J. C., Sanchez-Calvo, B., Luque, F., Leyva-Perez, M. O., Leterrier, M., Corpas, F. J., et al. (2014). Differential transcriptomic analysis by RNA-seq of GSNO-responsive genes between *Arabidopsis* roots and leaves. *Plant Cell Physiol.* 55, 1080–1095. doi: 10.1093/pcp/pcu044
- Besson-Bard, A., Courtois, C., Gauthier, A., Dahan, J., Dobrowolska, G., Jeandroz, S., et al. (2008). Nitric oxide in plants: production and cross-talk with Ca²⁺ signaling. *Mol. Plant* 1, 218–228. doi: 10.1093/mp/ssp016
- Besson-Bard, A., Gravot, A., Richaud, P., Auroy, P., Duc, C., Gaymard, F., et al. (2009). Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiol.* 149, 1302–1315. doi: 10.1104/pp.108.133348
- Bethke, P. C., Badger, M. R., and Jones, R. L. (2004). Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* 16, 332–341. doi: 10.1105/tpc.017822
- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Becard, G., Rosenberg, C., and Barker, D. G. (2001). Agrobacterium rhizogenes-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 695–700. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.6.695
- Camanas, G., Pastor, V., Cerezo, M., Garcia-Andrade, J., Vicedo, B., Garcia-Agustin, P., et al. (2012). A deletion in NRT2.1 attenuates *Pseudomonas syringae*-induced hormonal perturbation, resulting in primed plant defenses. *Plant Physiol.* 158, 1054–1066. doi: 10.1104/pp.111.184424
- Cecconi, D., Orzetti, S., Vandelle, E., Rinalducci, S., Zolla, L., and Delledonne, M. (2009). Protein nitration during defense response in *Arabidopsis thaliana*. *Electrophoresis* 30, 2460–2468. doi: 10.1002/elps.200800826
- Chaki, M., Valderrama, R., Fernandez-Ocana, A. M., Carreras, A., Gomez-Rodriguez, M. V., Pedrajas, J. R., et al. (2011). Mechanical wounding induces a nitrosative stress by down-regulation of GSNO reductase and an increase in S-nitrosothiols in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *J. Exp. Bot.* 62, 1803–1813. doi: 10.1093/jxb/erq358
- Cheng, T., Chen, J., Ef, A. A., Wang, P., Wang, G., Hu, X., et al. (2015). Quantitative proteomics analysis reveals that S-nitrosogluthathione reductase (GSNOR) and nitric oxide signaling enhance poplar defense against chilling stress. *Planta* 242, 1361–1390. doi: 10.1007/s00425-015-2374-5
- Colditz, F., Niehaus, K., and Krajinski, F. (2007). Silencing of PR-10-like proteins in *Medicago truncatula* results in an antagonistic induction of other PR proteins and in an increased tolerance upon infection with the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Planta* 226, 57–71. doi: 10.1007/s00425-006-0466-y
- Corpas, F. J., Chaki, M., Fernandez-Ocana, A., Valderrama, R., Palma, J. M., Carreras, A., et al. (2008). Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant Cell Physiol.* 49, 1711–1722. doi: 10.1093/pcp/pcn144
- Correa-Aragunde, N., Cejudo, F. J., and Lamattina, L. (2015). Nitric oxide is required for the auxin-induced activation of NADPH-dependent thioredoxin reductase and protein denitrosylation during root growth responses in *Arabidopsis*. *Ann. Bot.* 116, 695–702. doi: 10.1093/aob/mcv116
- Corti Monzon, G., Pinedo, M., Di Rienzo, J., Novo-Uzal, E., Pomar, F., Lamattina, L., et al. (2014). Nitric oxide is required for determining root architecture and lignin composition in sunflower. Supporting evidence from microarray analyses. *Nitric Oxide* 39, 20–28. doi: 10.1016/j.niox.2014.04.004
- de Montaigu, A., Sanz-Luque, E., Galvan, A., and Fernandez, E. (2010). A soluble guanylate cyclase mediates negative signaling by ammonium on expression of nitrate reductase in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 22, 1532–1548. doi: 10.1105/tpc.108.062380
- Dechorgnat, J., Patrit, O., Krapp, A., Fagard, M., and Daniel-Vedele, F. (2012). Characterization of the Nrt2.6 gene in *Arabidopsis thaliana*: a link with plant response to biotic and abiotic stress. *PLoS ONE* 7:e42491. doi: 10.1371/journal.pone.0042491
- Develey-Riviere, M. P., and Galiana, E. (2007). Resistance to pathogens and host developmental stage: a multifaceted relationship within the plant kingdom. *New Phytol.* 175, 405–416. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02130.x
- Djébali, N., Jauneau, A., Ameline-Torregrosa, C., Chardon, F., Jaulneau, V., Mathe, C., et al. (2009). Partial resistance of *Medicago truncatula* to *Aphanomyces euteiches* is associated with protection of the root stele and is controlled by a major QTL rich in proteasome-related genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22, 1043–1055. doi: 10.1094/MPMI-22-9-1043
- Djébali, N., Mhadhbi, H., Lafitte, C., Dumas, B., Esquerré-Tugayé, M.-T., Aouani, M. E., et al. (2011). Hydrogen peroxide scavenging mechanisms are components of *Medicago truncatula* partial resistance to *Aphanomyces euteiches*. *Eur. J. Plant Pathol.* 131, 559–571. doi: 10.1007/s10658-011-9831-1
- Dong, F., Simon, J., Rienks, M., Lindermayr, C., and Rennenberg, H. (2015). Effects of rhizospheric nitric oxide (NO) on N uptake in *Fagus sylvatica* seedlings depend on soil CO₂ concentration, soil N availability and N source. *Tree Physiol.* 35, 910–920. doi: 10.1093/treephys/tpv051
- Dordas, C. (2008). Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture, A review. *Agron. Sustain. Dev.* 28, 33–46. doi: 10.1051/agro:2007051
- Du, S., Zhang, Y., Lin, X., Wang, Y., and Tang, C. (2008). Regulation of nitrate reductase by nitric oxide in Chinese cabbage pakchoi (*Brassica chinensis* L.). *Plant Cell Environ.* 31, 195–204. doi: 10.1111/j.1365-3040.2007.01750.x
- Espunya, M. C., Diaz, M., Moreno-Romero, J., and Martinez, M. C. (2006). Modification of intracellular levels of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase alters glutathione homeostasis and root development. *Plant Cell Environ.* 29, 1002–1011. doi: 10.1111/j.1365-3040.2006.01497.x
- Fagard, M., Launay, A., Clement, G., Courtial, J., Dellagi, A., Farjad, M., et al. (2014). Nitrogen metabolism meets phytopathology. *J. Exp. Bot.* 65, 5643–5656. doi: 10.1093/jxb/eru323
- Feechan, A., Kwon, E., Yun, B.-W., Wang, Y., Pallas, J. A., and Loake, G. J. (2005). A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 8054–8059. doi: 10.1073/pnas.0501456102
- Ferrarini, A., De Stefano, M., Baudouin, E., Pucciariello, C., Polverari, A., Puppo, A., et al. (2008). Expression of *Medicago truncatula* genes responsive to nitric oxide in pathogenic and symbiotic conditions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21, 781–790. doi: 10.1094/mpmi-21-6-0781
- Forde, B. G., and Roberts, M. R. (2014). Glutamate receptor-like channels in plants: a role as amino acid sensors in plant defence? *F1000Prime Rep.* 6:37. doi: 10.12703/p6-37
- Fruntillo, L., Skelly, M. J., Loake, G. J., Spoel, S. H., and Salgado, I. (2014). S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. *Nat. Commun.* 5:5401. doi: 10.1038/ncomms6401
- Gow, A., Doctor, A., Mannick, J., and Gaston, B. (2007). S-Nitrosothiol measurements in biological systems. *J. Chromatogr. B* 851, 140–151. doi: 10.1016/j.jchromb.2007.01.052
- Gupta, K. J., Brotman, Y., Segu, S., Zeier, T., Zeier, J., Persijn, S. T., et al. (2013). The form of nitrogen nutrition affects resistance against *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola in tobacco. *J. Exp. Bot.* 64, 553–568. doi: 10.1093/jxb/ers348

- Gupta, K. J., Fernie, A. R., Kaiser, W. M., and Van Dongen, J. T. (2011a). On the origins of nitric oxide. *Trends Plant Sci.* 16, 160–168. doi: 10.1016/j.tplants.2010.11.007
- Gupta, K. J., Hebelstrup, K. H., Mur, L. A., and Igamberdiev, A. U. (2011b). Plant hemoglobins: important players at the crossroads between oxygen and nitric oxide. *FEBS Lett.* 585, 3843–3849. doi: 10.1016/j.febslet.2011.10.036
- Gupta, K. J., Igamberdiev, A. U., Manjunatha, G., Segu, S., Moran, J. F., Neelawarne, B., et al. (2011c). The emerging roles of nitric oxide (NO) in plant mitochondria. *Plant Sci.* 181, 520–526. doi: 10.1016/j.plantsci.2011.03.018
- Horchani, F., Prevot, M., Boscardi, A., Evangelisti, E., Meilhoc, E., Bruand, C., et al. (2011). Both plant and bacterial nitrate reductases contribute to nitric oxide production in *Medicago truncatula* nitrogen-fixing nodules. *Plant Physiol.* 155, 1023–1036. doi: 10.1104/pp.110.166140
- Hu, J., Huang, X., Chen, L., Sun, X., Lu, C., Zhang, L., et al. (2015). Site-specific nitrosoproteomic identification of endogenously S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 167, 1731–1746. doi: 10.1104/pp.15.00026
- Huber, D. M., and Watson, R. D. (1974). Nitrogen form and plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 12, 139–165. doi: 10.1146/annurev.py.12.090174.001035
- Hwang, I. S., An, S. H., and Hwang, B. K. (2011). Pepper asparagine synthetase 1 (CaAS1) is required for plant nitrogen assimilation and defense responses to microbial pathogens. *Plant J.* 67, 749–762. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2011.04622.x
- Jin, C. W., Du, S. T., Zhang, Y. S., Lin, X. Y., and Tang, C. X. (2009). Differential regulatory role of nitric oxide in mediating nitrate reductase activity in roots of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Ann. Bot.* 104, 9–17. doi: 10.1093/aob/mcp087
- Kandlbinder, A., Finkemeier, I., Wormuth, D., Hanitzsch, M., and Dietz, K. J. (2004). The antioxidant status of photosynthesizing leaves under nutrient deficiency: redox regulation, gene expression and antioxidant activity in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 120, 63–73. doi: 10.1111/j.0031-9317.2004.0272.x
- Kneeshaw, S., Gelineau, S., Tada, Y., Loake, G. J., and Spoel, S. H. (2014). Selective protein denitrosylation activity of Thioredoxin-h5 modulates plant immunity. *Mol. Cell.* 56, 153–162. doi: 10.1016/j.molcel.2014.08.003
- Kovacic, J., Klejdus, B., Babula, P., and Jarosova, M. (2014). Variation of antioxidants and secondary metabolites in nitrogen-deficient barley plants. *J. Plant Physiol.* 171, 260–268. doi: 10.1016/j.jplph.2013.08.004
- Krapp, A. (2015). Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Curr. Opin. Plant Biol.* 25, 115–122. doi: 10.1016/j.pbi.2015.05.010
- Kubienova, L., Ticha, T., Jahnova, J., Luhova, L., Mieslerova, B., and Petrivalsky, M. (2014). Effect of abiotic stress stimuli on S-nitrosoglutathione reductase in plants. *Planta* 239, 139–146. doi: 10.1007/s00425-013-1970-5
- Kulik, A., Noiro, E., Grandperret, V., Bourque, S., Fromentin, J., Salloignon, P., et al. (2015). Interplays between nitric oxide and reactive oxygen species in cryptogeiin signalling. *Plant Cell Environ.* 38, 331–348. doi: 10.1111/pce.12295
- Leitner, M., Vandelle, E., Gaupels, F., Bellin, D., and Delledonne, M. (2009). NO signals in the haze: nitric oxide signalling in plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 451–458. doi: 10.1016/j.pbi.2009.05.012
- Liu, G., Ji, Y., Bhuiyan, N. H., Pilot, G., Selvaraj, G., Zou, J., et al. (2010). Amino acid homeostasis modulates salicylic acid-associated redox status and defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22, 3845–3863. doi: 10.1105/tpc.110.079392
- Lozano-Juste, J., Colom-Moreno, R., and León, J. (2011). In vivo protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 62, 3501–3517. doi: 10.1093/jxb/err042
- Luna, E., Van Hulst, M., Zhang, Y., Berkowitz, O., Lopez, A., Petriacq, P., et al. (2014). Plant perception of beta-aminobutyric acid is mediated by an aspartyl-tRNA synthetase. *Nat. Chem. Biol.* 10, 450–456. doi: 10.1038/nchembio.1520
- Maldonado-Alconada, A., Echevarría-Zomeño, S., Lindermayr, C., Redondo-López, I., Durner, J., and Jorrin-Novo, J. (2011). Proteomic analysis of *Arabidopsis* protein S-nitrosylation in response to inoculation with *Pseudomonas syringae*. *Acta Physiol. Plant* 33, 1493–1514. doi: 10.1007/s11738-010-0688-2
- Manoli, A., Begheldo, M., Genre, A., Lanfranco, L., Trevisan, S., and Quaggiotti, S. (2014). NO homeostasis is a key regulator of early nitrate perception and root elongation in maize. *J. Exp. Bot.* 65, 185–200. doi: 10.1093/jxb/ert358
- Melo, P. M., Silva, L. S., Ribeiro, I., Seabra, A. R., and Carvalho, H. G. (2011). Glutamine synthetase is a molecular target of nitric oxide in root nodules of *Medicago truncatula* and is regulated by tyrosine nitration. *Plant Physiol.* 157, 1505–1517. doi: 10.1104/pp.111.186056
- Miranda, K. M., Espey, M. G., and Wink, D. A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5, 62–71. doi: 10.1006/niox.2000.0319
- Modolo, L. V., Augusto, O., Almeida, I. M. G., Pinto-Maglio, C. A. F., Oliveira, H. C., Seligman, K., et al. (2006). Decreased arginine and nitrite levels in nitrate reductase-deficient *Arabidopsis thaliana* plants impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Sci.* 171, 34–40. doi: 10.1016/j.plantsci.2006.02.010
- Oliveira, H. C., Justino, G. C., Sodek, L., and Salgado, I. (2009). Amino acid recovery does not prevent susceptibility to *Pseudomonas syringae* in nitrate reductase double-deficient *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant Sci.* 176, 105–111. doi: 10.1016/j.plantsci.2008.09.017
- Perchepped, L., Balague, C., Riou, C., Claudel-Renard, C., Riviere, N., Grezes-Beset, B., et al. (2010). Nitric oxide participates in the complex interplay of defense-related signaling pathways controlling disease resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23, 846–860. doi: 10.1094/mpmi-23-7-0846
- Pietrowska, E., Różalska, S., Kaźmierczak, A., Nawrocka, J., and Małolepsza, U. (2015). Reactive oxygen and nitrogen (ROS and RNS) species generation and cell death in tomato suspension cultures—Botrytis cinerea interaction. *Protoplasma* 252, 307–319. doi: 10.1007/s00709-014-0680-6
- Puyaubert, J., Fares, A., Reze, N., Peltier, J. B., and Baudouin, E. (2014). Identification of endogenously S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis* plantlets: effect of cold stress on cysteine nitrosylation level. *Plant Sci.* 21, 150–156. doi: 10.1016/j.plantsci.2013.10.014
- Quandt, H. J., Puhler, A., and Broer, I. (1993). Transgenic root-nodules of *Vicia-hirsuta* - a fast and efficient system for the study of gene-expression in indeterminate-type nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6, 699–706. doi: 10.1094/mpmi-6-699
- Rasul, S., Dubreuil-Maurizi, C., Lamotte, O., Koen, E., Poinssot, B., Alcaraz, G., et al. (2012). Nitric oxide production mediates oligogalacturonide-triggered immunity and resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 35, 1483–1499. doi: 10.1111/j.1365-3040.2012.02505.x
- Rey, T., Nars, A., Bonhomme, M., Bottin, A., Huguet, S., Balzergue, S., et al. (2013). NFP, a LysM protein controlling Nod factor perception, also intervenes in *Medicago truncatula* resistance to pathogens. *New Phytol.* 198, 875–886. doi: 10.1111/nph.12198
- Rosales, E. P., Iannone, M. F., Groppa, M. D., and Benavides, M. P. (2011). Nitric oxide inhibits nitrate reductase activity in wheat leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 124–130. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.10.009
- Rosales, E. P., Iannone, M. F., Groppa, M. D., and Benavides, M. P. (2012). Polyamines modulate nitrate reductase activity in wheat leaves: involvement of nitric oxide. *Amino Acids* 42, 857–865. doi: 10.1007/s00726-011-1001-4
- Rusterucci, C., Espunya, M. C., Diaz, M., Chabannes, M., and Martinez, M. C. (2007). S-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiol.* 143, 1282–1292. doi: 10.1104/pp.106.091686
- Sanz-Luque, E., Ocana-Calahorra, F., Galvan, A., and Fernandez, E. (2015). THB1 regulates nitrate reductase activity and THB1 and THB2 transcription differentially respond to NO and the nitrate/ammonium balance in *Chlamydomonas*. *Plant Signal. Behav.* 10:e1042638. doi: 10.1080/15592324.2015.1042638
- Sanz-Luque, E., Ocana-Calahorra, F., Llamas, A., Galvan, A., and Fernandez, E. (2013). Nitric oxide controls nitrate and ammonium assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Exp. Bot.* 64, 3373–3383. doi: 10.1093/jxb/ert175
- Schachtman, D. P., and Shin, R. (2007). Nutrient sensing and signaling: NPKS. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 47–69. doi: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103750
- Sedlářová, M., Kubienová, L., Drábková Trojanová, Z., Luhová, L., Lebeda, A., and Petrivalský, M. (2016). “Chapter Thirteen - the role of nitric oxide in development and pathogenesis of biotrophic phytopathogens - downy and powdery mildews,” in *Advances Botanical Research*, ed. W. David (Cambridge, MA: Academic Press), 263–283.
- Slezack, S., Dumas-Gaudot, E., Rosendahl, S., Kjoller, R., Paynot, M., Negrel, J., et al. (1999). Endoproteolytic activities in pea roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and/or *Aphanomyces euteiches*

- in relation to bioprotection. *New Phytol.* 142, 517–529. doi: 10.1046/j.1469-8137.1999.00421.x
- Snoeijers, S., Pérez-García, A., Joosten, M. A. J., and De Wit, P. G. M. (2000). The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal pathogens. *Eur. J. Plant Pathol.* 106, 493–506. doi: 10.1023/a:1008720704105
- Sun, H., Li, J., Song, W., Tao, J., Huang, S., Chen, S., et al. (2015). Nitric oxide generated by nitrate reductase increases nitrogen uptake capacity by inducing lateral root formation and inorganic nitrogen uptake under partial nitrate nutrition in rice. *J. Exp. Bot.* 66, 2449–2459. doi: 10.1093/jxb/erv030
- Tada, Y., Spoel, S. H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., et al. (2008). Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* 321, 952–956. doi: 10.1126/science.1156970
- Trevisan, S., Manoli, A., Ravazzolo, L., Botton, A., Pivato, M., Masi, A., et al. (2015). Nitrate sensing by the maize root apex transition zone: a merged transcriptomic and proteomic survey. *J. Exp. Bot.* 66, 3699–3715. doi: 10.1093/jxb/erv165
- Tun, N. N., Santa-Catarina, C., Begum, T., Silveira, V., Handro, W., Floh, E. I., et al. (2006). Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiol.* 47, 346–354. doi: 10.1093/pcp/pci252
- Vandelle, E., and Delledonne, M. (2011). Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant Sci.* 181, 534–539. doi: 10.1016/j.plantsci.2011.05.002
- Wendehenne, D., Gao, Q. M., Kachroo, A., and Kachroo, P. (2014). Free radical-mediated systemic immunity in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 20C, 127–134. doi: 10.1016/j.pbi.2014.05.012
- Xu, G., Fan, X., and Miller, A. J. (2012). Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 153–182. doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105532
- Xu, S., Guerra, D., Lee, U., and Vierling, E. (2013). S-nitrosoglutathione reductases are low-copy number, cysteine-rich proteins in plants that control multiple developmental and defense responses in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 4:430. doi: 10.3389/fpls.2013.00430
- Yaeno, T., and Iba, K. (2008). BAH1/NLA, a RING-type ubiquitin E3 ligase, regulates the accumulation of salicylic acid and immune responses to *Pseudomonas syringae* DC3000. *Plant Physiol.* 148, 1032–1041. doi: 10.1104/pp.108.124529
- Yamasaki, H., and Sakihama, Y. (2000). Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett.* 468, 89–92. doi: 10.1016/S0014-5793(00)01203-5
- Yun, B. W., Feechan, A., Yin, M., Saidi, N. B., Le Bihan, T., Yu, M., et al. (2011). S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* 478, 264–268. doi: 10.1038/nature10427
- Yun, B. W., Skelly, M. J., Yin, M., Yu, M., Mun, B. G., Lee, S. U., et al. (2016). Nitric oxide and S-nitrosoglutathione function additively during plant immunity. *New Phytol.* doi: 10.1111/nph.13903 [Epub ahead of print].
- Zeier, J. (2013). New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. *Plant Cell Environ.* 36, 2085–2103. doi: 10.1111/pce.12122
- Zeng, F., Sun, F., Li, L., Liu, K., and Zhan, Y. (2014). Genome-scale transcriptome analysis in response to nitric oxide in birch cells: implications of the triterpene biosynthetic pathway. *PLoS ONE* 9:e116157. doi: 10.1371/journal.pone.0116157
- Zhang, G. B., Yi, H. Y., and Gong, J. M. (2014). The *Arabidopsis* ethylene/jasmonic Acid-NRT signaling module coordinates nitrate reallocation and the trade-off between growth and environmental adaptation. *Plant Cell* 26, 3984–3994. doi: 10.1105/tpc.114.129296

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Thalineau, Truong, Berger, Fournier, Boscari, Wendehenne and Jeandroz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

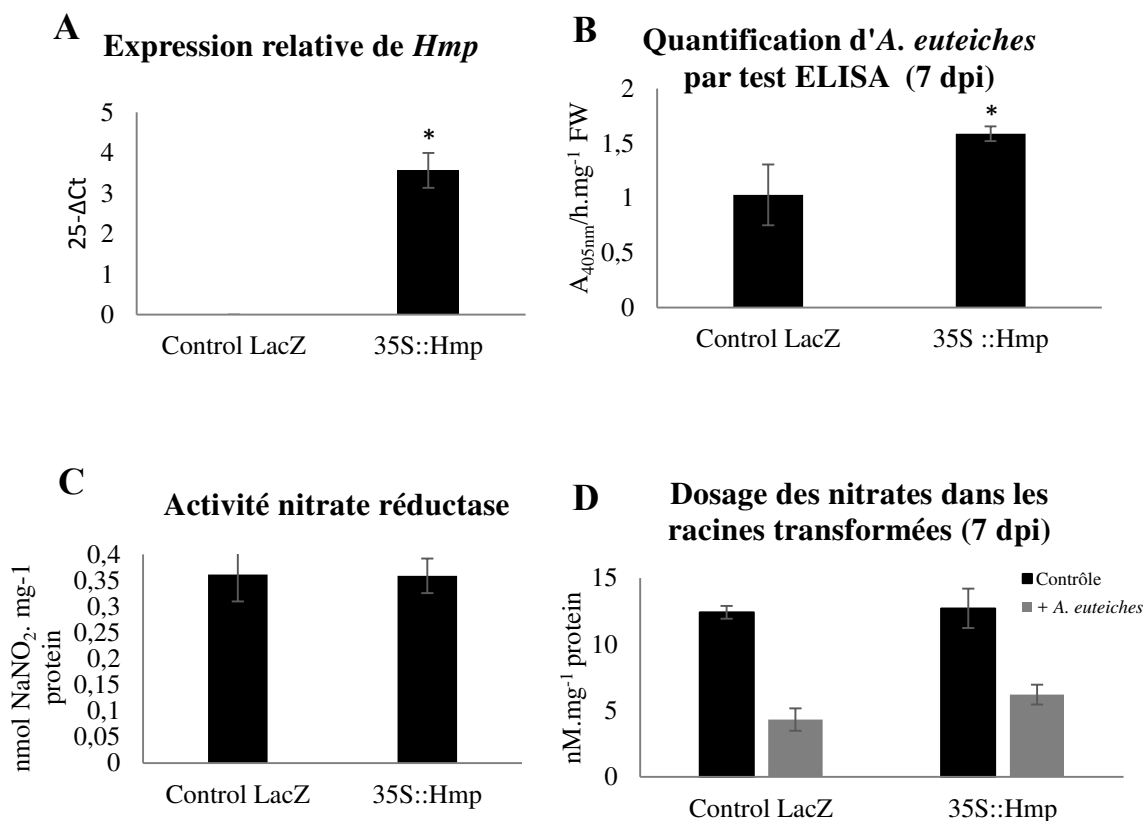


Figure II.12: Racines surexprimant *Hmp*, une hémoglobine bactérienne

(A) Niveaux de transcrits de *Hmp* dans les racines transformées (35S::*Hmp*) comparées aux racines contrôles (Control LacZ). (B) Quantification d'*A. euteiches* dans les extraits de racines transformées inoculées. Les racines ont été cultivées 7 jours sur milieu Fahraeus suite à l'infection par *A. euteiches*. (C) Mesure de l'activité nitrate réductase et (D) des concentrations en nitrates dans les racines contrôles (Control LacZ) et dans les racines surexprimant *Hmp* (35S::*Hmp*). Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard (n = 4) et les asterisques indiquent les différences significatives (ANOVA suivie d'un test de Fisher $p < 0,05$).

2.2 Résultats complémentaires: implication de l'hémoglobine dans la résistance de *M. truncatula* à *A. euteiches*

Nous nous sommes également intéressés au rôle de l'hémoglobine dans l'interaction *M. truncatula/A. euteiches*. En effet, en métabolisant le NO en nitrate, les hémoglobines sont considérées comme des modulateurs des concentrations en NO (Gupta *et al*, 2011b). Les racines de *M. truncatula* ont été transformées pour surexprimer un gène codant une flavohémoglobine (*hmp*) de *S. meliloti*. La quantification des transcrits du gène *Hmp* dans les racines transformées confirme la surexpression de ce gène (Figure II.12A). Nous avons étudié l'impact de cette transformation sur l'interaction *M. truncatula/A. euteiches*. Les racines transformées surexprimant *Hmp* deviennent plus sensibles à *A. euteiches* (Figure II.12B), comme les racines *RNAi::MtNIA1/2*, montrant le rôle positif du NO dans la résistance de la plante à l'oomycète. Ces résultats confirment les études précédentes rapportant que les plantes qui surproduisent l'hémoglobine (Hb1) non symbiotique sont affectées dans la résistance contre les virus, les champignons et les bactéries (Seregélyes *et al*, 2003; Mur *et al*, 2012). Cependant, l'effet de ce surexpresseur sur les niveaux en NO et SNO n'a pas pu être vérifié. Nous observons, un résultat inverse par rapport au surexpresseur *GSNOR*, qui devient plus résistant et voit ses contenus en NO₃⁻ et son activité NR augmentée, à la différence du surexpresseur *Hmp* qui ne montre pas de différence par rapport au contrôle (Figure II.12C-D).

CHAPITRE III

AUTRE CONTRIBUTION



Figure III.1: Plantes sauvage A17 et mutant B9 de *M. truncatula* cultivées pendant 5 semaines

Extrait de Morandi et al, 2009

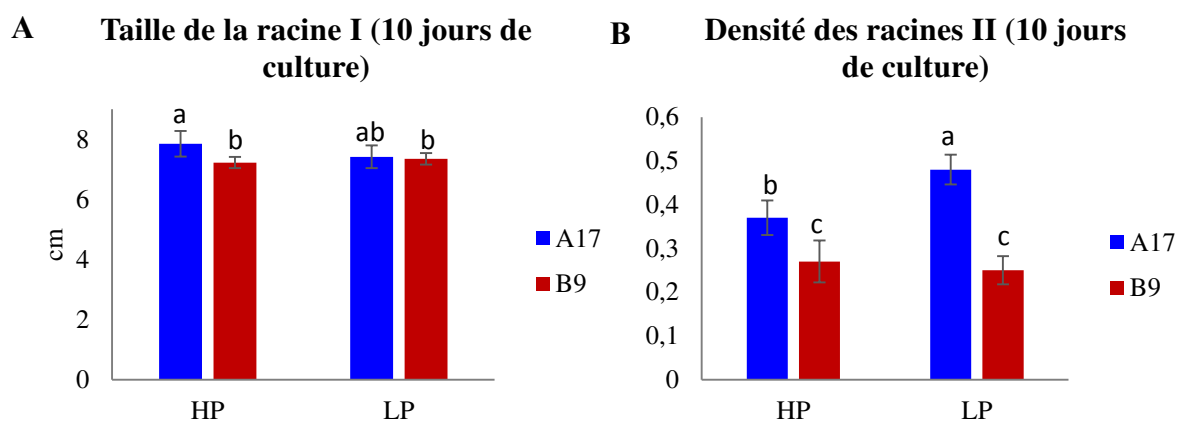


Figure III.2: Architecture racinaire

Mesures de la taille de la racine primaire (cm) (A) et de la densité des racines secondaire (B) sur les génotypes A17 et B9, après 10 jours de culture en présence de 1,3 mM de Pi (HP) ou de 35 μ M de Pi (LP). Les graphiques présentés correspondent à une expérience représentative de quatre expériences indépendantes. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard ($n = 16-20$) et les lettres indiquent les différences significatives ($p < 0,05$).

1. Caractérisation de la réponse du mutant B9 à l'infection par *A. euteiches*

Au cours des premiers mois de la thèse, j'ai participé à la caractérisation du mutant B9 de *M. truncatula*. Ce mutant présente une diminution du développement des parties aériennes ainsi qu'une forte réduction du développement racinaire avec de courtes racines latérales (Figure III.1). Il présente en outre des phénotypes symbiotiques (Morandi *et al*, 2009): il est défectueux pour la nodulation et hypermycorrhizé ($nod^{+/-} myc^{++}$).

Les analyses transcriptomiques et les dosages en phosphate (Pi) ont montré que le mutant B9 se comportait comme une plante carencée en phosphate et qu'il présentait une expression constitutive de nombreux gènes de stress/défense. Ce travail, qui entrainait dans la thématique des liens entre nutrition et défense, m'a permis de me familiariser avec les analyses d'architecture racinaire et le pathosystème. De plus, j'ai évalué la résistance de ce mutant à *A. euteiches* et j'ai ainsi contribué à la publication d'un article (Truong *et al*, 2015) qui valorise entre autres le pathosystème nouvellement mis au point dans l'équipe.

Dans un premier temps, j'ai poursuivi la caractérisation de la réponse au phosphate du mutant B9 en analysant l'impact d'une limitation en Pi sur son architecture racinaire et en comparant cette réponse à celle observée chez le WT (A17). Chez *A. thaliana*, la carence en Pi conduit à une inhibition de l'élongation de la racine primaire ainsi qu'une augmentation de la densité et de la longueur des racines latérales (Williamson *et al*, 2001). Très récemment, il a été montré, chez *M. truncatula*, que la limitation en Pi n'induisait que transitoirement une diminution de la longueur de la racine primaire mais par contre induisait une augmentation du nombre des racines secondaires après une semaine de culture (Volpe *et al*, 2016).

Pour étudier la réponse au Pi, les génotypes A17 et B9 ont été mis en culture *in vitro* en milieu riche en phosphate (HP; 1,3 mM) ou pauvre en phosphate (LP; 35 μ M) pendant 10 jours. Les paramètres d'architecture racinaire (longueur de la racine primaire et des racines secondaires, nombre et densité des racines latérales) ont été mesurés (Figure III.2). Pour quasiment tous les paramètres mesurés, le mutant B9 présente une réduction significative de développement par rapport aux plantes sauvages (Figure III.2), confirmant son phénotype retardé observé lors de la culture en pot (Figure III.1). Nous n'observons pas d'effet de la limitation en Pi sur la longueur de la racine I (Figure III.2A) ni chez les plantes sauvages ni

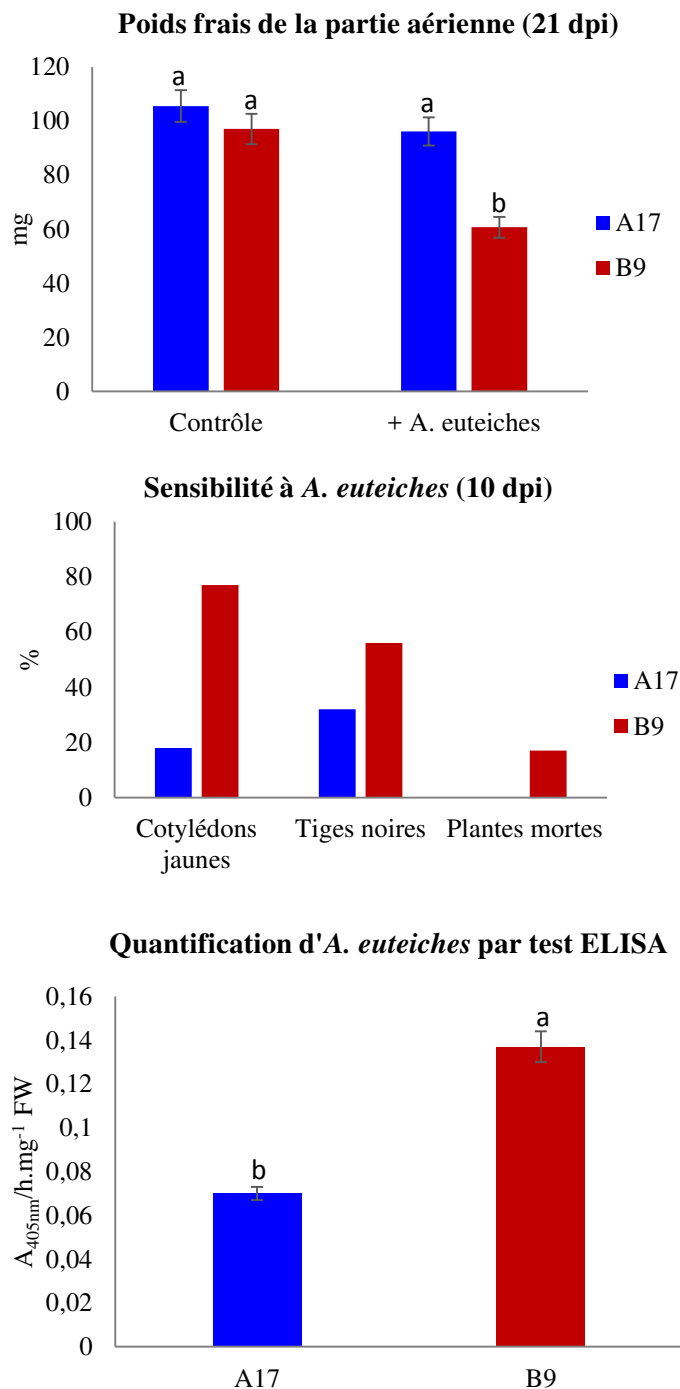


Figure III.3: Symptômes d'infection des génotypes A17 et B9

(A) Mesures du poids frais des parties aériennes (mg), 21 jours après infection (B) Mesure du pourcentage de cotylédons jaunes, de tiges noires et de plantes mortes, 10 jours après infection (C) Détection de la quantité d'*A. euteiches* par test ELISA, 21 jours après infection. Les graphiques présentés correspondent à une expérience représentative de quatre expériences indépendantes. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard (n = 16-20 pour (A), n = 4-5 pour (C)) et les lettres indiquent les différences significatives ($p < 0,05$).

chez le mutant B9. La seule différence liée au Pi dans l'architecture racinaire concerne la densité des racines secondaires. Une augmentation de la densité des racines secondaires est observée chez les plantes sauvages en milieu LP alors qu'aucune différence n'est observée chez le mutant B9 selon le milieu (Figure **III.2B**). Il n'y a donc pas de réponse au Pi de la densité des racines secondaires chez B9. Cela pourrait être dû au faible statut phosphaté du mutant ou également à un problème de développement racinaire.

Les analyses transcriptomiques avaient par ailleurs montré que le mutant B9 présentait une expression constitutive de nombreux gènes de stress/défense qui sont, chez les plantes sauvages, différenciellement exprimés lors de l'inoculation par *A. euteiches*. Il semblait donc intéressant de comparer la sensibilité à cet agent pathogène de plantes sauvages (A17) et de plantes mutantes (B9).

Les différents paramètres de symptômes ont été mesurés (Figure **III.3**) après 3 semaines de culture. En présence d'*A. euteiches*, le mutant B9 présente une diminution significative du poids frais des parties aériennes à la différence des plantes sauvages (Figure **III.3A**). De plus, le phénotype de B9 est fortement affecté avec une augmentation du pourcentage de cotylédons jaunes et de tiges noires par rapport à A17 (Figure **III.3B**). Le test ELISA révèle une quantité d'agent pathogène significativement plus élevée pour B9 que pour A17 (Figure **III.3C**). Ainsi, B9 est plus sensible à *A. euteiches* malgré l'expression constitutive de nombreux gènes de stress/défense observée chez ce mutant.

De façon intéressante, nous avons observé que chez A17, la carence en phosphate pouvait conduire à une plus grande sensibilité à *A. euteiches* (Chapitre I, 2.1). Les résultats obtenus sur le mutant B9 conforteraient l'hypothèse d'un effet négatif de la carence en phosphate sur la résistance à cet oomycète chez A17.

2. Article scientifique: The *Medicago truncatula* hypermycorrhizal B9 mutant displays an altered response to phosphate and more susceptible to *Aphanomyces euteiches*

Original Article

The *Medicago truncatula* hypermycorrhizal B9 mutant displays an altered response to phosphate and is more susceptible to *Aphanomyces euteiches*

Hoai-Nam Truong¹, Elise Thalineau¹, Laurent Bonneau¹, Carine Fournier¹, Sophie Potin¹, Sandrine Balzergue², Diederik van Tuinen¹, Sylvain Jeandroz¹ & Dominique Morandi¹

¹INRA/AgroSup/Université de Bourgogne UMR1347 Agroécologie, ERL CNRS 6300, Dijon F-21065, France and ²Unité de Recherche en Génomique Végétale (URGV), Plateforme Transcriptome, UMR INRA 1165-Université d'Evry Val d'Essonne-ERL CNRS 8196, Evry Cedex F-91057, France

ABSTRACT

Inorganic phosphate (Pi) plays a key role in the development of arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis, which is favoured when Pi is limiting in the environment. We have characterized the *Medicago truncatula* hypermycorrhizal B9 mutant for its response to limiting (P/10) and replete (P2) Pi. On P2, mycorrhization was significantly higher in B9 plants than in wild-type (WT). The B9 mutant displayed hallmarks of Pi-limited plants, including higher levels of anthocyanins and lower concentrations of Pi in shoots than WT plants. Transcriptome analyses of roots of WT and B9 plants cultivated on P2 or on P/10 confirmed the Pi-limited profile of the mutant on P2 and highlighted its altered response to Pi on P/10. Furthermore, the B9 mutant displayed a higher expression of defence/stress-related genes and was more susceptible to infection by the root oomycete pathogen *Aphanomyces euteiches* than WT plants. We propose that the hypermycorrhizal phenotype of the B9 mutant is linked to its Pi-limited status favouring AM symbiosis in contrast to WT plants in Pi-replete conditions, and discuss the possible links between the altered response of the B9 mutant to Pi, mycorrhization and infection by *A. euteiches*.

Key-words: arbuscular mycorrhiza; nutrients; signalling; symbiosis; transcriptome.

INTRODUCTION

Phosphorus (P) is an essential macronutrient for plants. It plays a vital role in metabolism as it is necessary for the synthesis of numerous compounds such as nucleic acids, ATP and phosphorylated intermediates in signalling cascades. Plants acquire P as inorganic phosphate (Pi) which is limiting in most soils due to its low solubility and its low diffusion coefficient in soil (Shen *et al.* 2011). To cope with the low availability of Pi, plants have evolved different adaptive responses including changes in root morphology and

architecture (Abel 2011), solubilization of external Pi by secretion of organic anions or phosphatases, and extensive changes in gene expression to increase the uptake and use of Pi (Yang & Finnegan 2010). In addition, a wide variety of plants form symbiotic associations with arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, which enhance Pi acquisition by hosts through the development of their mycelia, which constitute a wide network for accessing Pi (Javot *et al.* 2007). Thus, AM plants can display a greater biomass, a higher Pi status than non-mycorrhizal (NM) plants in a Pi-limiting environment. In certain cases, though no positive effect on plant biomass or Pi status can be observed in AM plants, the symbiotic Pi acquisition pathway can contribute a major part of total plant Pi acquisition through specific symbiotic Pi transporters rather than the direct Pi acquisition pathway through root epidermal cells (Smith *et al.* 2011).

Considering the importance of the AM symbiosis for plant Pi acquisition and the carbon costs associated with the development of this symbiosis, it is not surprising that host plant Pi status controls the root colonization levels by the AM fungus (Breuillin *et al.* 2010; Gu *et al.* 2011; Balzergue *et al.* 2013). Hence, mycorrhization is stimulated when Pi is limiting in the soil and decreased when it is present at sufficient levels. The suppression of mycorrhization by high Pi affects AM development at both the early and late stages of interaction and acts systemically (Gu *et al.* 2011), but the nature of this high Pi signal is not known (Branscheid *et al.* 2010). In addition to this suppression of AM symbiosis by high Pi fertilization of host plants, regulation by an AM symbiosis-related signal was postulated to be important for maintaining AM symbiosis in plants grown at low Pi supply. Otherwise, in these plants, the higher local Pi status of mycorrhizal roots due to the symbiotic Pi-uptake pathway (Branscheid *et al.* 2010) would suppress AM formation and prevent AM symbiosis from proceeding further. Higher levels of microRNA 399 (miR399) were produced in AM plants compared with NM plants at low Pi fertilization (Branscheid *et al.* 2010). The target of these miRNAs is the *MtPHO2* ubiquitin conjugase mRNA encoding a negative regulator of a subset of Pi starvation responses including possibly the development of AM

Correspondence: H.-N. Truong. E-mail: hntruong@dijon.inra.fr

symbiosis (Branscheid *et al.* 2010). The increased production of miR399 in AM plants was proposed to be important for maintaining a low expression in mycorrhizal roots of their target *MtPHO2* gene which otherwise would increase in response to the higher local Pi levels in AM roots and lead to a suppression of mycorrhization (Branscheid *et al.* 2010). Thus, the regulation of AM symbiosis by Pi is complex with, on the one hand, a high Pi fertilization leading to suppression of mycorrhization and, on the other hand, AM signals through miR399 counteracting the local high Pi signal in roots of AM plants grown at low Pi. A constitutive high expression of miR399 in transgenic AM plants did not, however, prevent the suppression of AM symbiosis by high Pi fertilization of host plants, highlighting that the high Pi suppression signal is epistatic to miRNA399 stimulation of mycorrhization (Branscheid *et al.* 2010).

The ancient widespread AM symbiosis shares a common signalling pathway with the more recent rhizobial symbiosis, which is found in legumes (Oldroyd 2013). In addition, the recognition by the host plant of the rhizobial Nod factors or the mycorrhizal Myc factors or pathogen-derived oligosaccharides involves a common lysin motif receptor-like kinase (LysM-RLK) NFP (in *Medicago truncatula*) and likely one or more other LysM-RLKs specific for Nod or Myc factors or the pathogen-derived oligosaccharides (Gough & Jacquet 2013). Many mutants impaired in rhizobial symbiosis were subsequently characterized as AM-defective (Parniske 2008). Conversely, some supernodulating and nitrate-tolerant mutants were also hypermycorrhizal (Morandi *et al.* 2000), in accordance with the common regulatory components of these symbioses. The development of genetic screens for mutants affected in AM symbiosis led to the isolation of mutants specifically affected in AM symbiosis but displaying normal nodulation levels such as the *stunted arbuscule* (*str*) and the *required for arbuscular mycorrhization 1* (*ram1*) mutants in *M. truncatula* (Zhang *et al.* 2010; Gobbato *et al.* 2012). They enabled also the identification of mutants displaying contrasting phenotypes for rhizobial and AM symbioses such as the *M. truncatula* B9 mutant (Morandi *et al.* 2009). This latter mutant was isolated as a hypermycorrhizal mutant defective for nodulation. In addition, the B9 mutant displayed a poor shoot and a strongly impaired root development with reduced laterals compared with wild-type (WT) plants when grown in soil and accumulated high levels of the isoflavonoid coumestrol (Morandi *et al.* 2009).

With the aim of determining whether the B9 hypermycorrhizal phenotype could be linked to an altered Pi response, we have analysed the growth, root architecture and anthocyanin accumulation, and performed gene expression profiling of WT and mutant plants in response to limiting (P/10) and non-limiting (P2) Pi. In addition, as transcriptome analyses highlighted the up-regulation of numerous defence/stress-related genes in the B9 mutant, and because rhizobial, AM symbioses and interaction with pathogens share common and specific signalling elements, we characterized the response of this hypermycorrhizal but nodulation-deficient mutant to infection by the oomycete pathogen *Aphanomyces euteiches*.

MATERIALS AND METHODS

Biological material and growth conditions

Seeds from the WT *M. truncatula* (Gaertn.) line A17 of the variety Jemalong and the derived ethylmethane sulfonate mutant B9 (Morandi *et al.* 2009) were scarified, rinsed and left to germinate in the dark on moist filter paper as described previously (Morandi *et al.* 2009) for 4 d at 4 °C. After 1 d transfer to room temperature, seedlings were transplanted to pots containing a substrate composed of 20% pure zeolite in gamma-irradiated clay loam soil (Domaine d'Epoisses, Dijon, France) or, depending on the experiments, 20% zeolite-based commercial inoculum (*Rhizophagus sp.*; MycAgro Lab, Dijon, France). Plants were grown in phytochambers with 16 h light 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 23 °C / 8 h night cycle at 21 °C and fertilized three times/week with modified Long Ashton solutions (Hewitt, 1966) containing either 0.13 mM Pi (P/10) or 2.6 mM Pi (P2). At harvest, after 4 weeks of growth, roots were cleaned under tap water, root and shoot fresh weight were measured, and all the tissues frozen in liquid nitrogen before storing at -80 °C. AM colonization was determined on supplemental cultivated *Rhizophagus sp.* inoculated plants. Altogether, three to four independent cultures were performed with 4 to 6 plants per genotype and per nutrient condition.

For *in vitro* experiments to determine root system architecture, seeds, after scarification, were further sterilized as described previously (Bonneau *et al.* 2013) and sown on 0.7% (w/v) agar plates. After 1 d at 4 °C, plates were transferred to culture chambers with the same conditions as described above. One to two days after germination, seedlings were transferred to square plates (12 cm \times 12 cm) containing a modified M medium without sugar (Bécard & Fortin 1988) containing either low Pi (LP, 35 μM Pi) or high Pi (HP, 1.3 mM Pi). After sealing with parafilm, plates were placed vertically in the culture chamber (16 h light 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 23 °C / 8 h night cycle at 21 °C) for 10 d before root architecture analysis.

Assessment of root mycorrhizal colonization

AM colonization was determined after ink staining (Vierheilig *et al.* 1998). Stained root systems (from 4 replicate plants per genotype and nutrient condition) were cut into 1 cm fragments, and 30 randomly collected fragments were used for estimation of mycorrhizal development. A stereomicroscope at $\times 40$ magnification was used to evaluate the global AM intensity of root colonization as described previously (Morandi *et al.* 2000).

Root architecture analyses

Root system architecture was analysed on scans of plates containing WT or mutant seedlings grown for 10 d on LP or HP media using the ImageJ software (Schneider *et al.* 2012) to measure the primary root (RI) length, lateral root (LR) length and density (which is the average number of LRs per cm RI). For each experiment, about 20 seedlings per genotype and per condition were analysed.

Soluble Pi determination

Soluble Pi was extracted from freeze-dried shoots or roots of 4–6 plants per genotype and per nutrient condition as described previously (Bonneau *et al.* 2013). Soluble Pi concentrations were determined spectrophotometrically by measuring absorbance at 650 nm using the BIOMOL Green™ Reagent (Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France) according to the indications of the manufacturer.

Anthocyanin estimation

About 100 mg freshly frozen shoot tissue was used for extraction of anthocyanins in acidic methanol (1% (w/v) HCl) (Mano *et al.* 2007). The optical density was measured at 530 and 657 nm. Subtraction of $0.25A_{650}$ compensated for the overlap in A_{530} by chlorophylls. Thus, quantitation of anthocyanins was performed using the following equation: $Q = (A_{530} - 0.25 A_{657}) \times M^{-1}$, where Q is the concentration of anthocyanins, A_{530} and A_{657} are the absorptions at the wavelengths indicated, and M is the fresh weight (in grams) of the plant tissue used for extraction.

Inoculation by *A. euteiches*, scoring of sensitivity of plants to *A. euteiches* and assessing infection by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

For inoculation with *A. euteiches*, 1-day-old germinated WT or mutant seeds were transferred to M media without sugar (Bécard & Fortin 1988) and cultivated for 1 d (16 h light $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 23 °C / 8 h night cycle at 21 °C), then inoculated on roots with $5 \mu\text{L}$ of a suspension of zoospores (10^5 zoospores/mL) obtained as described in Rey *et al.* (2013) from *A. euteiches* Drechs strain ATCC 201684. Symptoms were scored after 21 d of culture by determining the percentage of symptomatic tissues [percentage of stem browning and of yellow/purple cotyledons (Djebali *et al.* 2009)] and the percentage of dead plants. Altogether, four independent experiments were carried out to analyse plant susceptibility to *A. euteiches*.

Assessment of *A. euteiches* development in roots was performed by ELISA using a rabbit polyclonal serum raised against *A. euteiches* and a mouse anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate as described by Slezack *et al.* (1999) on protein extracts obtained from roots from pooled plants. Alkaline phosphatase activity was monitored by following the increase in absorbance at 405 nm during 2–3 h and is expressed as the slope of the obtained curve per mg root fresh weight.

RNA extraction, reverse transcription and qPCR

RNA extraction and reverse transcription

RNA was extracted from plant roots using the Plant RNeasy kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the recommendations of the manufacturer with an on-column DNase

treatment. For microarray hybridizations, three independent biological replicates were produced from three independent cultures. For each condition, RNA samples were obtained by pooling RNAs from three to five plants.

For qPCR, RNAs (0.5–1 μg) were reverse transcribed in a final volume of 25 μL in the presence of RNasin (Promega, Charbonnières, France) and oligo(dT)₁₅, with MMLV reverse transcriptase (Promega, Charbonnières, France) as recommended by the manufacturer.

Quantitative PCR

Quantitative PCR was performed on reverse-transcribed RNAs on four independent biological replicates per condition for two independent plant cultures. Technical replicates showed a much lower variance than biological replicates. Quantitative PCR reactions were performed in the ABI PRISM 7900 apparatus (Applied Biosystems®, Saint-Aubin, France) in a final volume of 15 μL using Absolute SYBR green ROX Mix (Thermo Scientific, Surrey, UK), 70 nm of gene-specific primers and 5 μL of cDNA template diluted 60-fold. Primers used for qPCR are listed in Supporting Information Table S1. Control qPCR reactions included non-template control and non-reverse-transcribed RNAs. Reference genes used for normalization were *MtEF1 α* and ubiquitin (Supporting Information Table S1). Expression levels were calculated by determining the ΔCt between test and reference gene ($\Delta\text{Ct}_{\text{test gene-reference gene}}$). For *MtEF1 α* , average Ct in all experiments was equal to 22 cycles. As a total of 40 cycles were performed for qPCR analysis, a gene was considered as not expressed if $\Delta\text{Ct}_{\text{test gene-reference gene}} \geq 18$. Therefore, gene expression was quantified by the parameter $18 - \Delta\text{Ct}_{\text{test gene-reference gene}}$, which is higher when test gene is more highly expressed.

Analysis of primary and mature miR399 transcript levels by qPCR

Total RNAs were prepared using the TRIzol® reagent (Life Technologies, Saint-Aubin, France) according to the manufacturer's recommended procedure for isolating RNA. For mature miR399 expression analyses, reverse transcription was performed on 0.5 μg total RNA in a final volume of 20 μL following a stem-loop pulsed reverse transcription protocol (Varkonyi-Gasic *et al.* 2007) with 50 units of SuperScript® III reverse transcriptase (Life Technologies, Saint-Aubin, France) in the presence of 10 mM DTT, 20 units of RNasin® ribonuclease inhibitor (Promega, Charbonnières, France) and 50 nm stem-loop primers based on the primers described by Branscheid *et al.* [listed in Supporting Information Table S1 (Branscheid *et al.* 2010)]. Quantitative PCR was performed with 1 μL of the stem-loop reverse transcription reaction using a forward primer specific to the different mature miR399 sequences and a universal reverse primer (Supporting Information Table S1) on four biological replicates and two to three technical replicates on two independent experiments. Primers used for qPCR analyses of pri-miR399 transcripts were based on those designed by Branscheid *et al.* [Supporting Information Table S1 (Branscheid *et al.* 2010)].

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using one, two or three-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's test. Data were considered as significantly different for $P < 0.05$.

Microarray analysis

Analysis of the integrity of RNA samples, labelling and hybridization to Affymetrix GeneChip® Medicago Genome Array representing approximately 58192 transcripts coming from *M. truncatula*, *M. sativa* or *M. meliloti*, subsequent washes, staining and scanning were performed as described previously (Bonneau *et al.* 2013). The data were normalized with the gcrma algorithm (Irizarry *et al.* 2003). To determine differentially expressed genes, we performed a standard two-group *t*-test that assumes equal variance between groups. The variance of the gene expression per group is a homoscedastic variance, where genes displaying extremes of variance (too small or too large) were excluded. The raw *P*-values were adjusted by the Bonferroni method, which controls the familywise error rate (FWER) (Ge *et al.* 2003). A gene (probe set) is considered as differentially expressed if the Bonferroni *P*-value is < 0.05 and if the \log_2 (fold change) was ≥ 1 or ≤ -1 .

Data deposition

All these steps were performed on Affymetrix platform at INRA-URGV (Evry, France). The raw CEL files were imported in R software for data analysis. All raw and normalized data are available through the CATdb database [AFFY_MED_2011_14 (Gagnot *et al.* 2008)] and from the Gene Expression Omnibus (GEO) repository at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Barrett *et al.* 2007), accession number GSE 44102.

Analysis of public transcriptome data

Public transcriptome data on roots interacting with *A. euteiches* [(Rey *et al.* 2013), ME16, NCBI GEO (GSE20587)] were downloaded from PLEXdb (<http://www.plexdb.org/plex.php?database=Medicago>). Data were normalized with the RMA algorithm and genes significantly (corrected Benjamini–Hochberg *P*-value < 0.05) differentially expressed (\log_2 (fold change) ≥ 1 or \log_2 (fold change) ≤ -1) between test and control conditions were determined using the Agilent GeneSpring software. For transcriptomic data on stringent Pi limitation (Hogekamp *et al.* 2011), differentially expressed genes were extracted from Supporting Information Table S1. Clustering of data using Pearson's correlation metrics was performed using the MultiExperimentViewer software (<http://www.tm4.org/mev.html>).

RESULTS

Repression of AM colonization by high Pi fertilization is not effective in the *M. truncatula* B9 mutant

The *M. truncatula* B9 mutant was initially characterized as displaying ~20% higher global root colonization intensity by

Rhizopagus sp. compared with WT plants on low Pi [P/10, 0.13 mM Pi (Morandi *et al.* 2009)]. In order to highlight the differences in mycorrhization levels between the B9 mutant and WT plants, we cultivated plants on high Pi (P2, 2.6 mM Pi), a nutrient condition that suppresses mycorrhization in WT plants.

Global root colonization intensity was suppressed by high Pi in AM-WT plants cultivated on P2 compared with P/10 (Fig. 1a). For the AM-B9 mutant, however, root colonization remained high on P2 (Fig. 1a), at a level about three times that of AM-WT plants on P2. The expression of AM marker genes [*MtBCP1* and *MtPT4* encoding respectively a blue copper protein and an AM-specific Pi transporter (Hogekamp *et al.* 2011)] confirmed these differences in root colonization levels (Fig. 1b). The levels of expression of both genes were low or undetectable in AM-WT plants grown on P2 and high in AM-WT plants cultivated on P/10 and in AM-B9 mutant plants cultivated on P2 or on P/10.

High Pi fertilization (P2) improved plant growth with an increase in shoot biomass (Fig. 1c) or in the shoot/root biomass ratio (S/R, an indicator of plant nutrient status, Fig. 1d) for both NM-WT and NM-B9 plants compared with NM plants cultivated on P/10. A significant positive mycorrhizal effect on shoot biomass and S/R ratio was detected in WT and B9 plants when cultivated on P/10 (Fig. 1c,d), in line with an enhanced plant nutrient status linked to AM symbiosis. On P2, a mycorrhizal effect was observed for the S/R ratio of the B9 mutant but not for that of WT plants (Fig. 1d).

Altogether, these data confirm the hypermycorrhizal phenotype of the B9 mutant and show that AM formation in the B9 mutant was less suppressed by high fertilization (P2) than in WT, and this was correlated with a mycorrhizal effect on the plant nutrient status as indicated by the higher S/R ratio of AM mutants compared with NM mutants in these conditions.

The B9 mutant has a lower Pi status on P2 but displays normal regulation by AM signals of Pi marker genes

Because Pi is an important regulator of AM symbiosis, we analysed the Pi status of WT and B9 plants cultivated on P2 or on P/10 in the presence or not of *Rhizopagus* sp.

On P2, in line with their higher Pi fertilization on P2, both NM-WT and NM-B9 plants displayed a higher shoot and root soluble Pi concentrations than when cultivated on P/10 (Fig. 2a). On P2, however, the soluble Pi concentrations in shoots and roots of the NM-B9 mutant were significantly lower than those of NM-WT plants. This decrease in soluble Pi concentration was also observed in NM-B9 plants cultivated on P/10 which accumulated less Pi in shoots but not in roots compared with NM-WT plants on P/10 (Fig. 2a). These data indicated therefore a decreased Pi status of the NM-B9 mutant compared with NM-WT plants.

AM formation led to an enhanced soluble Pi concentration of both shoots and roots in the AM-B9 mutant cultivated on P2 or P/10 compared with NM-B9 plants (Fig. 2a). As

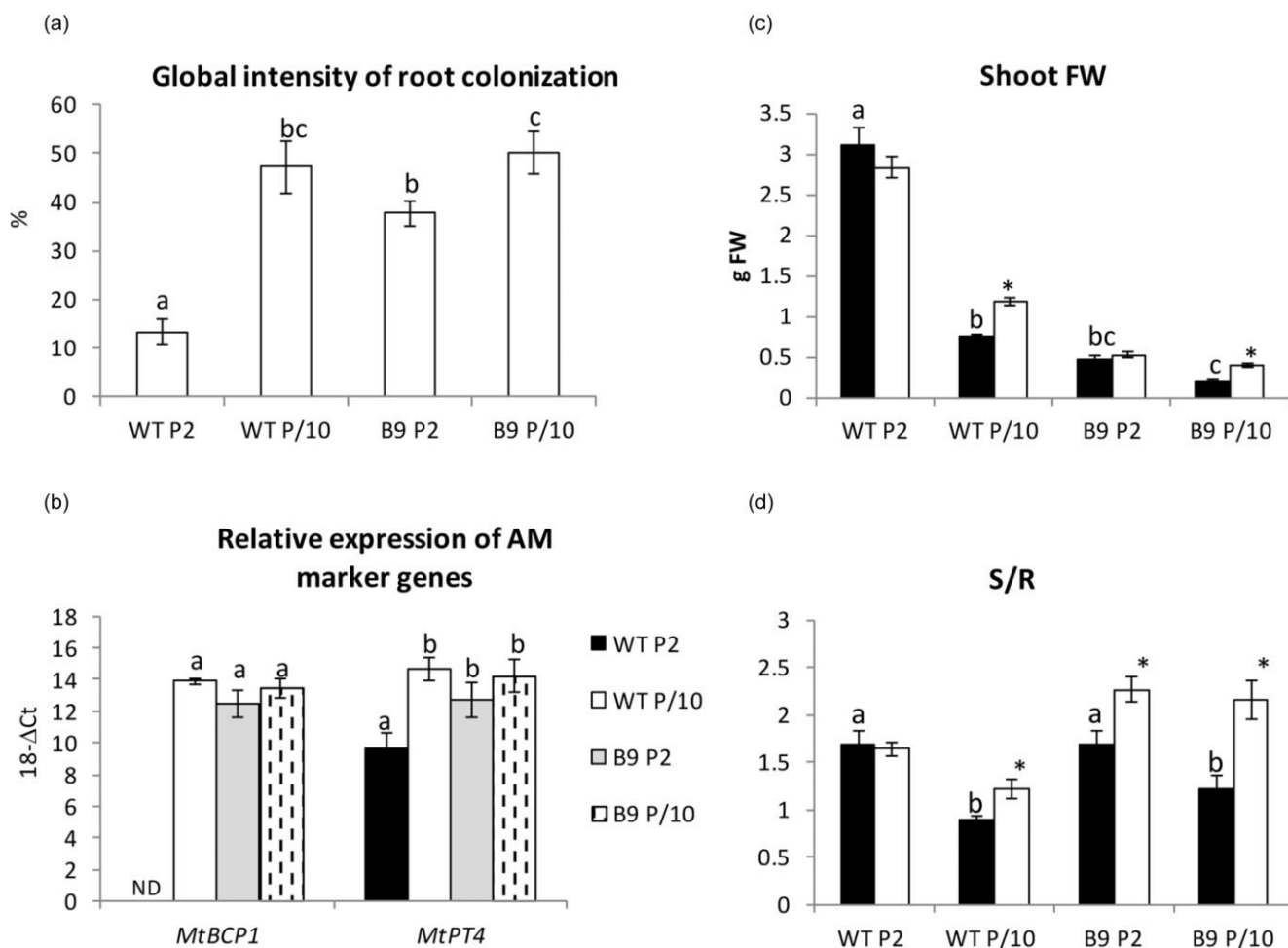


Figure 1. Characterization of wild-type (WT) and B9 mutant plants grown on limiting (P/10) and replete (P2) Pi nutritions in the presence or not of *Rhizophagus sp.* (a) Global intensity of root colonization of inoculated WT and B9 plants. (b) Relative expression compared with the reference *MtEF1 α* gene (expressed as $18-\Delta C_{t_{\text{test gene}} - \text{reference gene}}$, see Materials and Methods) of the AM marker genes *MtBCP1* and *MtPT4*. (c) Shoot fresh weight (FW). (d) Shoot/root FW ratio (S/R). Data from a representative experiment are shown. WT and B9 mutants were cultivated in the presence [white bars in (a), (c) and (d)] or not [black bars in (c), (d)] of *Rhizophagus sp.* for 4 weeks on P2 (2.6 mM Pi) or P/10 (0.13 mM Pi). Error bars represent standard errors ($n = 4-6$). Letters indicate significant differences ($P < 0.05$) between inoculated plants for mycorrhization parameters in (a) and for relative gene expression in (b), and between shoot FW and S/R for non-inoculated (NM) plants. Asterisks denote significant differences ($P < 0.05$) between inoculated and non-inoculated plants in (c) and (d). ND, non-detected.

expected, in AM-WT plants this AM-linked positive effect on Pi concentration was only observed on P/10. Thus, when a positive mycorrhizal effect was observed on S/R (Fig. 1d), it was correlated with a higher Pi status of AM plants.

To further analyse the Pi status of the B9 mutant, we studied the expression of two Pi marker genes displaying different regulation by Pi and mycorrhization. The Pi stress gene *MtPLD* encoding a phospholipase D enzyme is induced in Pi-limited plants and repressed in Pi-replete plants (Branscheid *et al.* 2010). Conversely, the Pi status gene *MtPHO2*, encoding a ubiquitin E2 conjugase that negatively controls a subset of Pi-starvation-induced (PSI) genes, is more highly expressed in Pi-replete than in Pi-limited plants (Branscheid *et al.* 2010).

Analysis of the expression of these two Pi marker genes in the WT and B9 mutant cultivated on P2 or on P/10 in the

presence or not of *Rhizophagus sp.* is presented in Fig. 2b. As expected, cultivation of NM-WT plants on P2 (high fertilization) led to a significantly lower expression of the Pi stress gene *MtPLD* and a significantly higher expression of the high Pi status gene *MtPHO2* than in low fertilization (P/10). In the NM-B9 mutant, however, the *MtPID* gene was less repressed than in NM-WT plants on P2 and the *MtPHO2* gene was not up-regulated by high Pi nutrition. These analyses confirmed therefore the lower Pi status of NM-B9 mutants compared with NM-WT plants on P2.

AM-WT plants cultivated on P/10 and AM-B9 mutants cultivated on P/10 or on P2 displayed a lower expression of *MtPLD* compared with their respective NM controls (Fig. 2b), in agreement with the higher Pi status of these AM plants (Fig. 2a) compared with their NM counterparts. By contrast, *MtPHO2* gene expression remained low in these AM plants (Fig. 2b) despite their higher Pi status compared

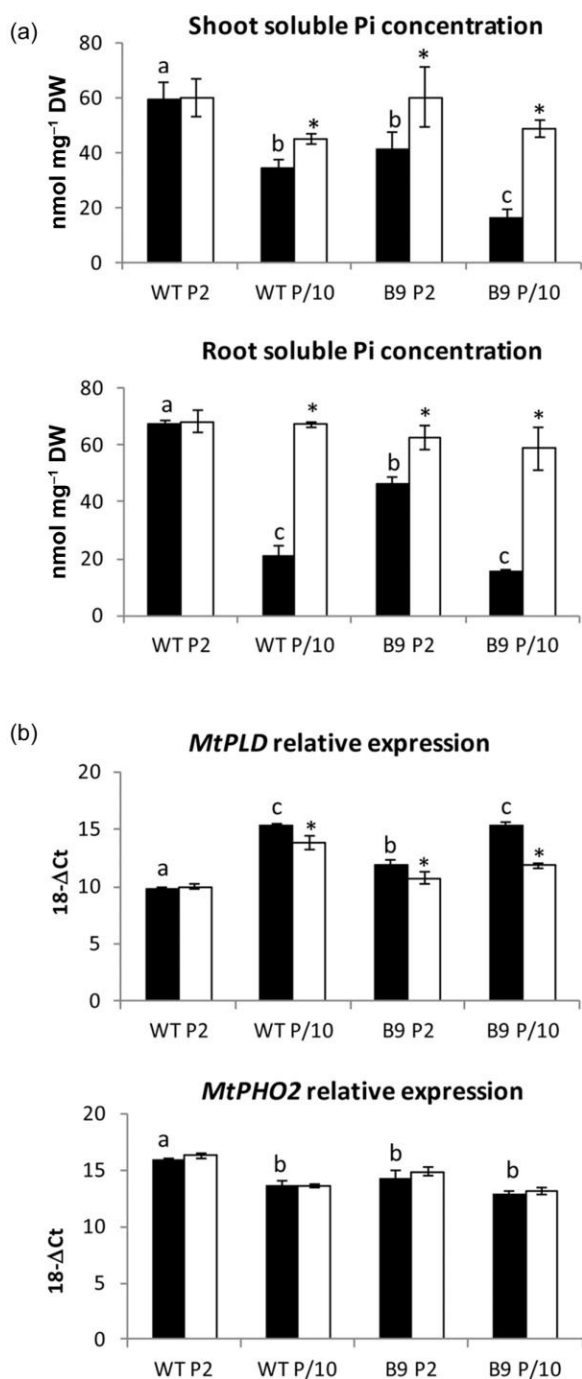


Figure 2. Analysis of the Pi status of wild-type (WT) and B9 plants grown on limiting (P/10) or replete (P2) Pi in the presence or not of *Rhizophagus sp.* (a) Shoot and root soluble inorganic phosphate (Pi) concentrations in WT and mutant plants. (b) Relative expression compared with the reference *MtEFL1* gene (expressed as $18-\Delta C_{\text{test gene-reference gene}}$, see Materials and Methods) of the Pi stress gene *MtPLD* and the high Pi status marker gene *MtPHO2*. Data from a representative experiment are shown. WT and B9 mutants were cultivated in the presence (white bars) or not (black bars) of *Rhizophagus sp.* for 4 weeks on P2 (2.6 mM Pi) or P/10 (0.13 mM Pi). Error bars represent standard errors ($n = 4-6$). Letters indicate significant differences ($P < 0.05$) between non-inoculated plants. Asterisks denote significant differences ($P < 0.05$) between inoculated and non-inoculated plants.

with NM plants (Fig. 2a). This observation was in accordance with the proposed necessary maintenance of *MtPHO2* at low levels by AM signals to prevent suppression of AM formation by the higher local Pi in AM roots [see Introduction (Branscheid *et al.* 2010)]. Thus, these expression analyses showed on the one hand that AM regulation of *MtPHO2* gene expression was normal in AM-B9 plants, but that the NM mutant Pi status on P2 was lower than that of NM-WT plants. This suggests that the hypermycorrhizal phenotype of the B9 mutant could be due to the Pi-limited status of NM-B9 plants on P2 which would favour higher root colonization by the AM fungus. We therefore undertook to compare more in depth the response to Pi of NM-WT and NM-B9 plants, hereafter referred to as WT and B9 plants, respectively.

The B9 mutant overaccumulates anthocyanins and does not alter its root architecture in response to Pi limitation

Accumulation of anthocyanins in shoots constitutes one of the long-term responses of plants to Pi limitation. We measured levels of anthocyanins in shoots of WT and mutant plants cultivated on P2 and on P/10. Pi limitation induced accumulation of anthocyanins in WT and mutant plants (Fig. 3a). The B9 plants, however, displayed always higher levels of anthocyanins in shoots than WT plants, whether cultivated on P2 or P/10 (Fig. 3a).

Hallmarks of Pi starvation include changes in root architecture including an inhibition of primary root (RI) growth, a longer length and a higher density of lateral roots (LRs) in *Arabidopsis thaliana* (Péret *et al.* 2011). We analysed the root architecture of WT and mutant plants *in vitro* on a medium containing high Pi (HP, 1.3 mM Pi, a concentration in the range of the P2 fertilization which contains 2.6 mM Pi) or containing low levels of Pi (LP media, 35 μ M Pi, a much lower Pi concentration than the P/10 fertilization solution which contains 130 μ M Pi). We chose a stringent LP media so that Pi limitation could be effective *in vitro*, where plants develop much less than in pots. Indeed, in these conditions, WT and B9 plants accumulated lower soluble Pi levels in shoots on LP than on HP (data not shown). We did not observe any significant effect of Pi limitation on RI length, average LR length nor on the number of LR in WT *M. truncatula* plants (Fig. 3b) after 10 d of culture *in vitro*. The B9 mutant, however, displayed always a lower value of these different root parameters than WT (Fig. 3b), in line with the originally described poor root development of the mutant (Morandi *et al.* 2009). The only root architecture parameter that changed in WT plants in response to Pi nutrition was LR density (the number of LR per cm of RI) which was significantly higher on LP than on HP (Fig. 3b). In the B9 mutant, LR density was significantly lower than in WT plants grown on HP or LP and did not increase in response to Pi limitation (Fig. 3b). Therefore, the root architecture of the B9 mutant was altered, with a shorter RI and shorter and lower number and density of LR, and did not respond to changes in Pi nutrition.

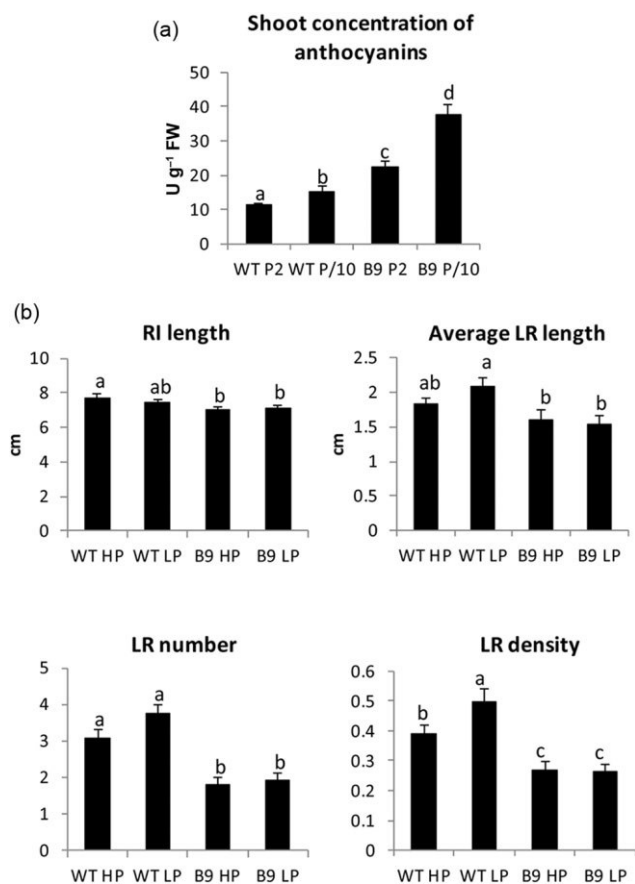


Figure 3. Analysis of wild-type (WT) and B9 mutant responses to inorganic phosphate (Pi). (a) Shoot concentrations of anthocyanins of WT and B9 mutant plants cultivated on P2 (2.6 mM Pi) or P/10 (0.13 mM Pi) for 4 weeks. (b) Root architecture of *in vitro* grown WT and B9 plants grown on high Pi (HP, 1.3 mM Pi) or low Pi (LP, 35 μ M Pi) media for 10 d. RI length, primary root length; LR length, lateral root length; LR density, lateral root density (number of lateral roots per cm RI). Error bars indicate standard errors ($n = 5$ for anthocyanin measurements; $n = 40$ – 50 for root architecture analyses). Letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

The B9 mutant displays alterations in the expression of Pi transporter genes and of members of the *MtPHO1* gene family

Because the B9 mutant accumulated lower levels of Pi in shoots and roots than WT plants on P2, we analysed by qPCR the expression of genes involved in Pi transport or potentially in Pi allocation within the plant. The *MtPT1*, *MtPT2*, *MtPT3* and *MtPT5* genes encoding low- or high-affinity Pi transporters of the *PHT1* family are induced, whereas *MtPT6* is repressed by Pi limitation (Liu *et al.* 2008; Grunwald *et al.* 2009; Bonneau *et al.* 2013). As shown in Fig. 4a, the B9 mutant displayed for all these genes a significantly different expression level compared with WT plants on P2, but not on P/10. The expression levels for *MtPT1*–3 and *MtPT6* in the B9 mutant grown on P2 reached levels equal to or close to those in WT plants cultivated on P/10 (Fig. 4a). Hence, Pi

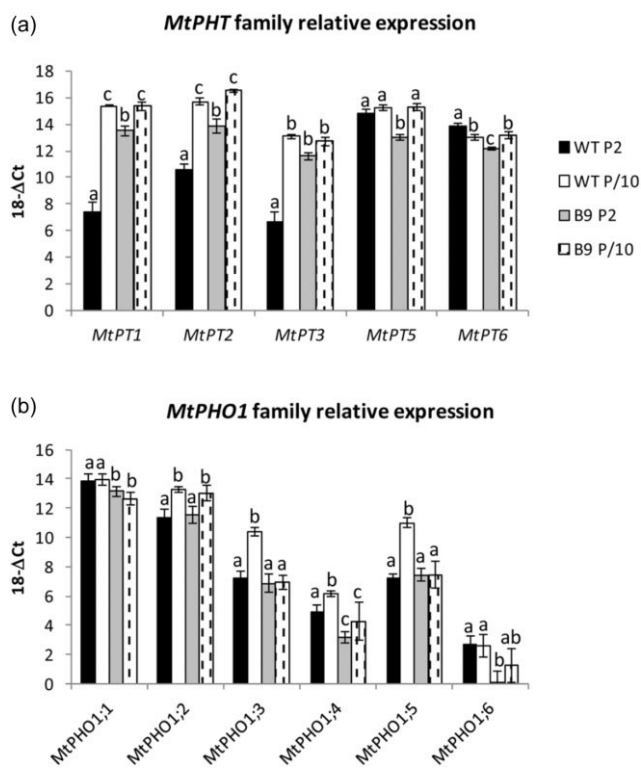


Figure 4. Relative expression of genes involved in inorganic phosphate (Pi) transport or potentially in Pi allocation in roots of wild-type (WT) plants and B9 mutants cultivated on limiting (P/10) and replete (P2) Pi nutrition. (a) Relative expression of members of the *MtPHT1* gene family. (b) Relative expression of members of the *MtPHO1* gene family. Data from a representative experiment are shown. WT and B9 mutants were cultivated for 4 weeks on P2 (2.6 mM Pi) or on P/10 (0.13 mM Pi). Relative expression is expressed as $18\text{-}\Delta\text{Ct}_{\text{test gene}} - \text{reference gene}$ (see Materials and Methods) compared with the reference *MtEF1 α* gene. Error bars represent standard errors ($n = 4$). Letters indicate significant differences ($P < 0.05$) in relative expression levels.

transporter-expression analyses supported the hypothesis that the B9 mutant experienced Pi limitation on P2 in contrast to WT plants.

In *Arabidopsis* and rice, specific members of the *PHO1* gene family (*AtPHO1*, *AtPHO1;H1* in *Arabidopsis* and *OsPHO1;2* in rice) were shown to be important for the transfer of Pi from roots to shoots (Stefanovic *et al.* 2007; Secco *et al.* 2010). Mutants affected in some of these specific *PHO1* genes display reduced shoot Pi concentration. In *M. truncatula*, six members of the *PHO1* multigenic family were identified in the genome (<http://plantgrn.noble.org/LegumeIPv2/>), two of which (*MtPHO1;1* and *MtPHO1;2*) are phylogenetically close to *AtPHO1* (Supporting Information Fig. S1). The expression of all the *MtPHO1* genes was induced by Pi limitation in WT plants except for *MtPHO1;1*. Expression of the *MtPHO1* genes in the mutant roots was either normal in plants grown on P2 and P/10 (*MtPHO1;2*), or significantly reduced for both nutrient conditions (*MtPHO1;1*; *1;4* and *1;6*), or significantly reduced compared with WT plants on P/10 but normal on P2 (*MtPHO1;3* and

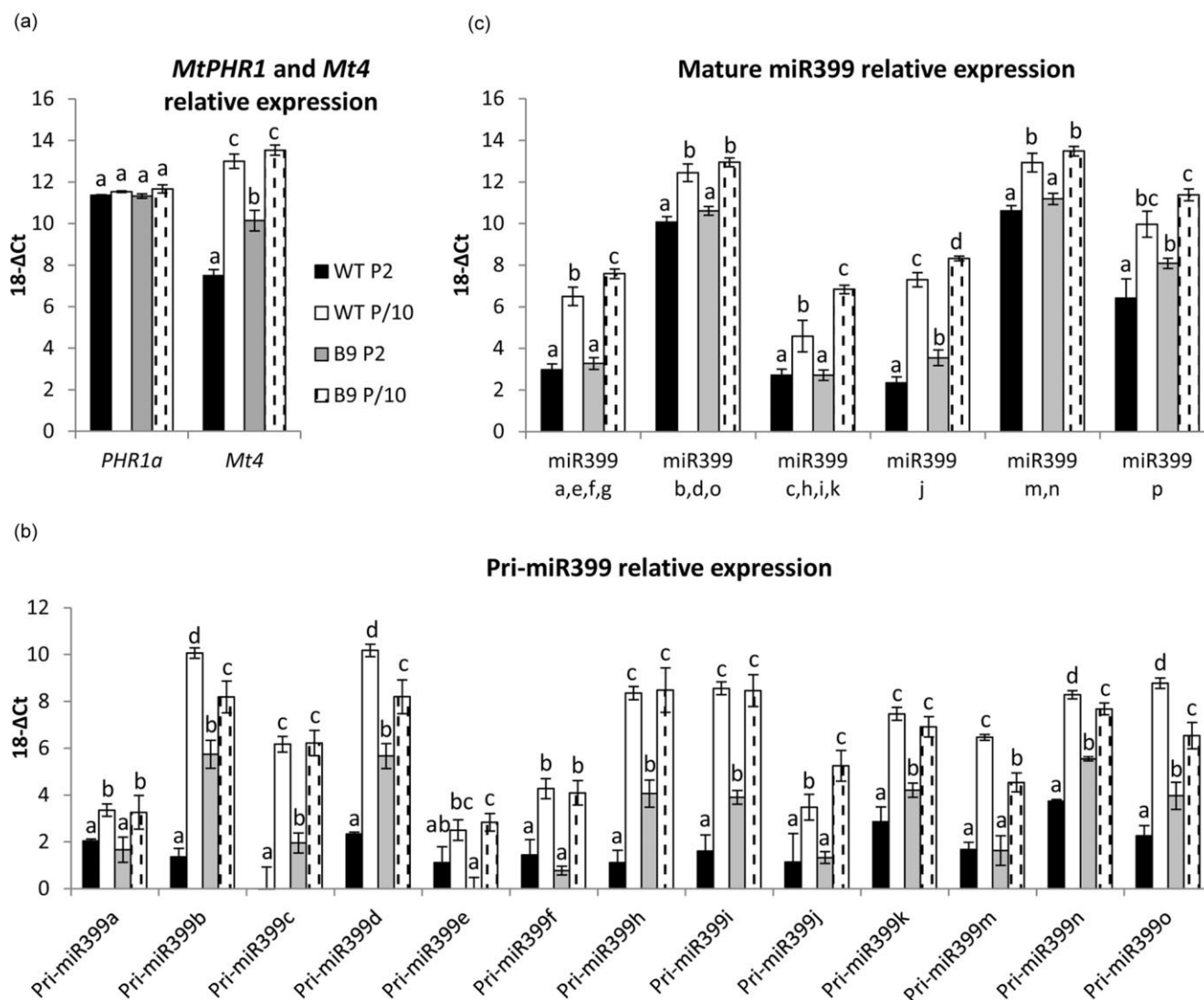


Figure 5. Expression analysis of genes of the PHR1-PHO2 Pi signalling pathway in roots of wild-type (WT) plants and B9 mutants cultivated on limiting (P/10) and replete (P2) Pi nutrition. (a) Relative expression of *At4* and *MtPHR1* genes. (b) Relative expression of the primary miR399 transcripts (pri-miR399, Branscheid *et al.* 2010) detected in our experiments. (c) Relative expression of mature miR399 families. WT and B9 mutants were cultivated for 4 weeks on P2 (2.6 mM Pi) or on P/10 (0.13 mM Pi). Relative expression is expressed as $18\text{-}\Delta\text{Ct}_{\text{test gene}} - \text{reference gene}$ (see Materials and Methods) compared with the reference *MtEF1a* gene. Error bars represent standard errors [$n = 4\text{--}8$ in (a) and (b); $n = 7\text{--}11$ in (c)]. Letters indicate significant differences ($P < 0.05$) in relative expression levels.

MtPHO1;5). Thus, in contrast to what had been observed for members of the *MtPT* Pi transporter gene family whose expression levels were affected in the mutant solely on P2 (Fig. 4a), the expression of some of the *MtPHO1* genes was also affected on P/10 in the mutant (Fig. 4b). Therefore, the analysis of the expression of the *MtPT* and *MtPHO1* genes confirmed the altered response to Pi and highlighted the complex transcriptional changes occurring in the B9 mutant.

The B9 mutant displays alterations in the PHR1-PHO2 Pi signalling pathway

In *Arabidopsis*, the AtPHO2 ubiquitin conjugase down-regulates a subset of PSI genes including several members of the *AtPHT1* gene family and the non-protein-coding

mRNAs *At4* and *AtIPS1* (Bari *et al.* 2006). Because the *MtPHO2* gene was down-regulated in the B9 mutant at high Pi fertilization (Fig. 2b), we tested whether, in addition to the Pi transporters up-regulated in B9 (Fig. 4a) *Mt4*, the *M. truncatula* orthologue of *At4* (Burleigh & Harrison 1999) was up-regulated in the B9 mutant on P2. These analyses (Fig. 5a) showed that *Mt4* was up-regulated by Pi limitation in both WT and B9 roots, and that indeed on P2 *Mt4* was more highly expressed in the mutant compared with WT. This confirmed the lower Pi status and low *MtPHO2* expression in the B9 mutant when cultivated on P2.

We then analysed the expression of genes of the Pi signalling pathway acting upstream of *MtPHO2*. In *A. thaliana* the MYB coiled coil (MYB-CC) transcription factor AtPHR1 and the closely related AtPHL1 protein act as central

positive regulators controlling directly numerous PSI genes through the binding of the PHR1 binding sequence P1BS (Rubio *et al.* 2001; Bustos *et al.* 2010). One branch of the Pi signalling pathway downstream from PHR1 involves the AtPHO2 E2 ubiquitin conjugase (Bari *et al.* 2006). AtPHR1 controls the expression of the *AtPHO2* gene (PHR1-PHO2 Pi signalling pathway) by inducing the expression of the miR399 family during Pi starvation leading to the degradation of their target *AtPHO2* mRNA and, as a result, up-regulation of the small subset of PSI genes controlled by AtPHO2.

In *M. truncatula* genome (Mt4.0), we identified the Medtr7g098250 gene as a potential orthologue of *AtPHR1*. Indeed, phylogenetic analyses showed that the protein encoded by this gene, hereafter referred to as *MtPHR1*, belonged to the same clade as AtPHR1 and AtPHL1 (data not shown), and displayed overall the highest homology among the different *M. truncatula* MYB-CC transcription factors with the AtPHR1 protein (*P*-value: $1.7e^{-76}$ with 48% identity and 58% similarity out of 398 amino acids). In particular, this homology with AtPHR1 raised to 95% identity in the 46 amino acids of the MYB-CC domain (pfam14379) and 94% identity in the 55 amino acids of the MYB-like DNA-binding domain (TIGR01557, Supporting Information Fig. S2). Expression analysis of *MtPHR1* showed that its expression did not depend on Pi fertilization levels as observed for *AtPHR1* in *Arabidopsis*, and that it was expressed at the same levels in roots of WT and B9 mutants (Fig. 5a). Downstream from *MtPHR1*, we analysed the expression of the miR399 primary (pri-miR399) and mature transcripts. Altogether, 15 pri-miR399 transcripts giving rise to a few families of mature miR399 have been described in *M. truncatula* (Branscheid *et al.* 2010). The expression levels of the 13 pri-miR399 detected in our experiments and of the mature miR399 families were all higher on P/10 than on P2 in WT or in B9 plants, in accordance with their induction during Pi limitation. In the B9 mutant cultivated on P2, however, a significantly higher expression of pri-miR399 b, c, d, h, i, k, n, o and of mature miR399j and p was observed compared with WT plants on P2, stressing the fact that the B9 mutant behaved as partially Pi limited on P2. In the roots of the B9 mutant cultivated on P/10, a lower expression of pri-miR399 b, d, m and o and a higher expression of pri-miR399 j were observed compared with WT plants on P/10 accompanied by a significantly higher expression of mature miR399 a, e, f, g, miR399 c, h, i, k and miR399 j families. Therefore, these analyses confirmed the complex perturbations in the PHR1-PHO2 Pi signalling pathway of the B9 mutant with, in general, a Pi-limited profile of the mutant on P2 and a complex profile on P/10 (either more induced or less induced than WT plants).

Transcriptome analyses highlight extensive alterations in the root response to Pi limitation and the deregulation of numerous stress/defence-related genes in the B9 mutant

To get a broader view on the processes affected in the B9 mutant, we performed transcriptome analyses on RNAs iso-

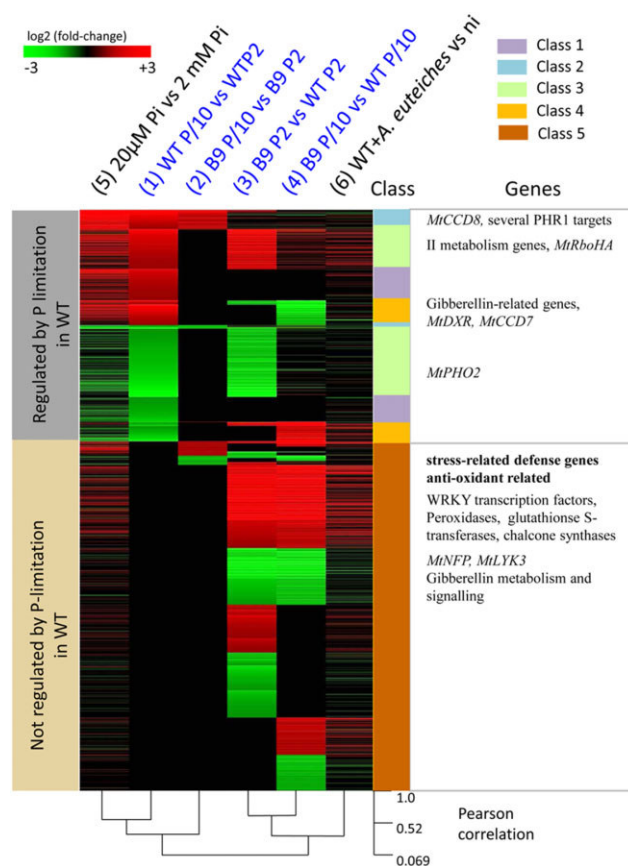


Figure 6. Profiles and clustering analysis of transcriptome experiments analysing the response to Pi limitation of roots of wild-type (WT) plants [WT P/10 versus WT P2, comparison (1)] and roots of B9 plants [B9 P/10 versus B9 P2, comparison (2)], comparing roots from WT and B9 plants grown on P2 [B9 P2 versus WT P2, comparison (3)] or on P/10 [B9 P/10 versus WT P/10, comparison (4)] and of experiments analysing the response of WT plants to stringent Pi limitation [20 µM Pi versus 2 mM Pi, Hogekamp *et al.* (2011), comparison (5)] or to inoculation by *A. euteiches* for 1 d [inoculated by *Aphanomyces euteiches* versus non-inoculated (ni), comparison (6), Rey *et al.* (2013)]. Only genes whose differential expression could be assessed statistically in comparisons (1)–(4) were retained in this analysis. Genes significantly differentially expressed (corrected Bonferroni *P*-value < 0.05, $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$) are highlighted in red when induced, and in green when repressed. Genes displaying no significant change in expression or significant changes but below the $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ threshold are in black. Clustering analysis was performed using the MultiExperimentViewer software (<http://www.tm4.org/mev.html>) using Pearson's correlation metrics. Comparisons indicate test condition versus control condition. The different classes of genes (1–5) are indicated on the right side of the figure as well as examples of genes belonging to the different classes. Comparisons resulting from our transcriptome experiments are typed in blue, those from published experiments are in black.

lated from roots of WT and B9 plants cultivated for 4 weeks on P2 or on P/10. Three independent replicate experiments were done and four comparisons were performed: (1) WT P/10 versus WT P2 (Fig. 6, column 2) and (2) B9 P/10 versus B9 P2 (Fig. 6, column 3) to analyse, respectively, the response

Table 1. Number of genes significantly differentially expressed (corrected Bonferroni P -value < 0.05 , $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$) in the different transcriptome comparisons in roots of WT and B9 plants cultivated on P2 or P/10. Only genes whose differential expression could be assessed statistically in all four comparisons were retained in this table

Comparison (test versus control)	Up-regulated genes	Down-regulated genes	Total
WT P/10 versus WT P2	768	773	1541
B9 P/10 versus B9 P2	229	86	315
B9 P2 versus WT P2	1216	1349	2565
B9 P/10 versus WT P/10	1059	868	1927

of WT and B9 plants to Pi limitation; (3) B9 P2 versus WT P2 (Fig. 6, column 4) and (4) B9 P/10 versus WT P/10 (Fig. 6, column 5). These last two comparisons were performed to uncover profile differences between the B9 mutant and WT plants at sufficient and limiting Pi supply. Quantitative PCR profiling on 10–14 genes significantly differentially expressed in each of the four comparisons validated our transcriptomic data (Supporting Information Fig. S3).

Numerous genes were significantly differentially expressed in each comparison (between ~1500 and 2500 genes, see Table 1 and Supporting Information Table S2) with a similar number of genes up-regulated and down-regulated except in comparison 2, where only ~300 genes (about fivefold less than in the other comparisons) were significantly differentially expressed with about three times more up-regulated genes than down-regulated genes. Clustering analysis showed that comparisons (1) and (2) highlighting the effects of Pi limitation in WT or B9 plants grouped together, while those highlighting the differences between B9 and WT plants [comparisons (3) and (4)] clustered together in a distinct branch (Fig. 6).

To better understand the response of the B9 mutant to Pi limitation, we first focused on the set of Pi-limitation-responsive genes in WT plants (highlighted in grey in the left of Fig. 6) corresponding to comparison (1), where 1541 genes were significantly differentially expressed (Table 1): 768 were up-regulated and 773 were down-regulated. Among the genes induced by Pi limitation were genes encoding proteins with an SPX domain involved possibly in Pi transport or sensing, phosphatases and ribonucleases necessary for the release of Pi from plant metabolites or from the root environment (Supporting Information Table S2), as noted by different transcriptome analyses on Pi deprivation (Misson *et al.* 2005; Morcuende *et al.* 2007). Functional categories containing genes that responded differently compared with others were identified using MapMan [Benjamini–Hochberg-corrected P -value < 0.05 (Usadel *et al.* 2005)]. These categories were lipid metabolism, hormone metabolism and responses to biotic stress. This was in accordance with the lipid metabolism reprogramming during Pi deficiency and the noted overlap between the transcriptional response to Pi starvation and responses to numerous biotic and abiotic stresses (Bustos *et al.* 2010). Comparison with published transcriptome data on stringent Pi limitation in *Medicago*

[20 μM Pi versus 2 mM Pi (Hogekamp *et al.* 2011)] confirmed the relevance of our microarray data. Indeed, comparison (1) profile clustered with the stringent Pi limitation profile [comparison (5), Fig. 6, column 1].

The 1541 Pi-limitation-responsive genes in WT [comparison (1)] were then analysed for their profile in the comparisons involving the B9 mutant [Fig. 6, comparisons (2), (3), (4)]. Approximately 25% of these genes were not differentially expressed in any of these latter three comparisons (Fig. 6, class 1 genes). Comparison (2) highlighting Pi-limitation-responsive genes in the B9 mutant (Fig. 6, column 3) revealed that only a small fraction (10%) of the Pi-limitation-responsive genes in WT was significantly differentially expressed in the B9 mutant in response to Pi limitation (Fig. 6, class 2 genes). Their profile (induced or repressed by Pi limitation), however, was quite similar in WT and mutant plants, in line with the clustering of comparisons (1), (2) and the stringent Pi limitation profile [comparison (5)]. Among these class 2 genes were genes involved (or potentially involved due to their homology with *Arabidopsis* genes) in strigolactone synthesis (*MtCCD8*: *Mtr.37123.1.S1_s_at*, *Mtr.1606.1.S1_at*) and in Pi scavenging, and genes involved in sulfolipid synthesis (purple acid phosphatases: *Mtr.10868.1.S1_at*, *Mtr.28560.1.S1_at*, *Mtr.43918.1.S1_at*; *MtSQD2*: *Mtr.34708.1.S1_at*, *Mtr.44760.1.S1_at*). Importantly, the class 2 genes included several *M. truncatula* genes homologous to *Arabidopsis* genes regulated by AtPHR1 but not by AtPHO2 (Bari *et al.* 2006), or homologous to *Arabidopsis* genes identified as direct targets of AtPHR1 (Bustos *et al.* 2010) and induced by Pi starvation in *Arabidopsis* roots (Supporting Information Table S3). These PSI genes displayed, for most, a normal regulation by Pi limitation in the B9 mutant roots compared with WT. This indicated that at least part of the PHR1 Pi signalling pathway was functioning correctly in the B9 mutant.

Comparison (3) (Fig. 6, column 4) highlighted the fact that many Pi-limitation-regulated genes in WT (~50% of the 1541 genes, Fig. 6, column 2) were significantly differentially expressed between the B9 mutant and WT plants when grown on P2. This included many genes (class 3 genes) that were not differentially regulated by Pi in the B9 mutant. The profile (induced or repressed) was similar for the vast majority (>90%) of the common differentially expressed genes in comparisons (1) and (3) (Fig. 6). This pointed out that the B9 mutant displayed a partially Pi-limited profile compared with Pi-replete WT plants when grown on P2. Noteworthy, about 20% of the genes differentially expressed between the B9 and WT plants grown on P2 [comparison (3)] were also differentially expressed between the B9 and WT plants when these plants were grown on P/10 [Fig. 6, comparison (4)], and they displayed the same profile (induced or repressed) in this case. Thus, for this subset of genes that included specific genes involved in flavonoid and isoflavonoid biosynthesis (Supporting Information Fig. S4), the B9 mutant behaved as experiencing exaggerated Pi limitation compared with WT plants both on P2 and P/10. However, this was not the case for the majority (80%) of the genes differentially expressed in comparison (3), so for these latter genes the B9 mutant

experienced a stronger Pi limitation than WT plants on P2, but was similarly limited on P/10 as WT plants. The low number of genes responding to Pi limitation in the B9 mutant [Fig. 6, comparison (2)] can thus be due to the fact that numerous Pi-regulated genes were already induced (or repressed) on P2, and were not further up-regulated (or down-regulated) by Pi limitation (P/10) in the mutant.

The 1541 Pi-limitation-responsive genes in WT [Fig. 6, comparison (1)] were then analysed for their expression profile in comparison (4) (Fig. 6, column 5). About 30 % of these genes (427 genes) were also differentially expressed between the B9 and WT plants when cultivated on P/10. These genes (class 4 genes) were mainly distinct from the subset of Pi-limitation-responsive genes deregulated in the B9 mutant roots on P2 [Fig. 6, comparison (3)]. In this case, however, the profile was in general reverse from that observed during Pi limitation in WT plants for most (~75%) of these genes: genes induced by Pi limitation in WT plants were less expressed in the B9 mutant than in WT plants on P/10. This was the case for genes involved (or potentially involved) in the methyl-erythritol phosphate (MEP) pathway and apocarotenoid synthesis (*MtDXR*: *Mtr.37824.1.S1_at*; *MtCCD7*: *Mtr.32038.1.S1_at*) and related to gibberellins (*MtGA3*: *Mtr.44757.1.S1_at*, *Mtr.38633.1.S1_at*; *MtGASA1*: *Mtr.18228.1.S1_at*; *MtSCR*: *Mtr.31955.1.S1_at*). Conversely, genes from this subset which were repressed by Pi limitation in WT plants were more highly expressed in the B9 mutant than in WT on P/10. This indicated that for this set of genes the B9 mutant was less Pi-limited than WT plants on P/10.

In summary, the analysis of the profile in the B9 mutant of Pi-limitation-responsive genes of WT plants revealed that on P2, the B9 mutant displayed a partially Pi-limited profile. By contrast, on P/10, the B9 mutant appeared to be less Pi-limited than WT plants, at least for a major part of the genes differentially expressed in these conditions. This was in line with the data obtained on the absence of induction on P/10 of the expression of specific members of the *MtPHOI* gene family (Fig. 4b). Therefore, transcriptome analyses confirmed the altered response to Pi of the B9 mutant and highlighted the extensive and complex deregulation of the mutant's response to Pi occurring both on P2 and on P/10.

Comparisons (3) and (4) highlighted also numerous genes differentially expressed between WT and mutant plants on P2 or on P/10 which were not regulated by Pi limitation in WT plants (highlighted in beige on the left of Fig. 6 and corresponding to class 5 genes, 2285 genes). This included genes significantly differentially expressed both in comparisons (3) and (4) (969 genes) and genes specifically differentially expressed between the B9 mutant and WT plants on P2 solely (785 genes) or on P/10 solely (531 genes). The 969 genes not regulated by Pi limitation in WT and differentially expressed between the B9 and WT plants whatever the Pi nutrient condition displayed a similar profile on P2 and on P/10 (for all except one gene, Fig. 6, columns 4 and 5). The Parametric Analysis of Gene Set Enrichment (PAGE, <http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/analysis.php?method=PAGE>) of these class 5 genes using their differential expression levels in comparison (3) or in comparison (4) revealed that these

genes were enriched in the gene ontology (GO) processes related to defence response, peroxidase reaction, and response to stress, and enriched in the GO molecular functions linked to antioxidant activity. Among these genes were numerous genes involved in defence signalling including the receptor-like kinase *MtNFP* and *MtLYK3* genes important respectively for early signalling upon Nod factor perception and for rhizobacterial infection (Gough & Jacquet 2013). These two genes were strongly repressed in the B9 mutant compared with WT plants (Supporting Information Table S2).

Most strikingly, many of these class 5 genes were differentially expressed during interaction of *M. truncatula* roots with *A. euteiches* [Fig. 6, column 6, comparison (6) (Rey *et al.* 2013)] and displayed a same profile [induced or repressed, compare in Fig. 6 class 5 genes profile in comparisons (3) and (6), or in comparisons (4) and (6)]. This was highlighted by the clustering of comparisons (3) and (4) with comparison (6).

The B9 mutant displays enhanced sensitivity to infection by *A. euteiches* and shares a common set of differentially expressed genes with the *Medicago nfp* mutant

Because the B9 mutant displayed in part a profile similar to WT roots responding to *A. euteiches*, we tested how the B9 mutant responded to infection to this oomycete. WT plants [genotype A17, which is partially resistant to *A. euteiches* (Djebali *et al.* 2009)] did not display a significant reduction in shoot biomass and showed a low percentage of yellow cotyledons and stem browning in response to the pathogen (Fig. 7a,b) after 3 weeks of infection *in vitro*. In contrast, the B9 mutant was more severely affected by *A. euteiches*: inoculated mutant plants displayed a significant decrease in shoot biomass (Fig. 7a) compared with non-inoculated mutants. In addition, infected mutants displayed often yellow and even purple cotyledons linked to anthocyanin accumulation, a phenotype that was only observed in inoculated mutants and never in inoculated WT plants nor in non-inoculated B9 and WT plants. Thus, the B9 mutant displayed a higher percentage of symptomatic tissues (yellow or purple cotyledons as well as stem browning) and a higher percentage of dead plants after 3 weeks of infection by *A. euteiches* (Fig. 7b) than WT plants, and thus was more susceptible to *A. euteiches*. The increased sensitivity of the B9 mutant was correlated in general (3 out of 4 experiments) with significantly higher levels of *A. euteiches* in roots of the B9 mutant compared with WT plants as detected by ELISA (Fig. 7c) using polyclonal antibodies raised against *A. euteiches* (Slezack *et al.* 1999).

Thus, despite the induction of numerous defence genes, the B9 mutant was more sensitive to *A. euteiches*. This was partly reminiscent of the *M. truncatula nfp* mutant, which displayed a classical defence response upon infection by *A. euteiches* but, however, was more sensitive than WT (A17) plants to this oomycete (Rey *et al.* 2013). Our transcriptome analyses highlighted the repression of the *MtNFP* gene in the B9 mutant compared with WT plants (Supporting Information

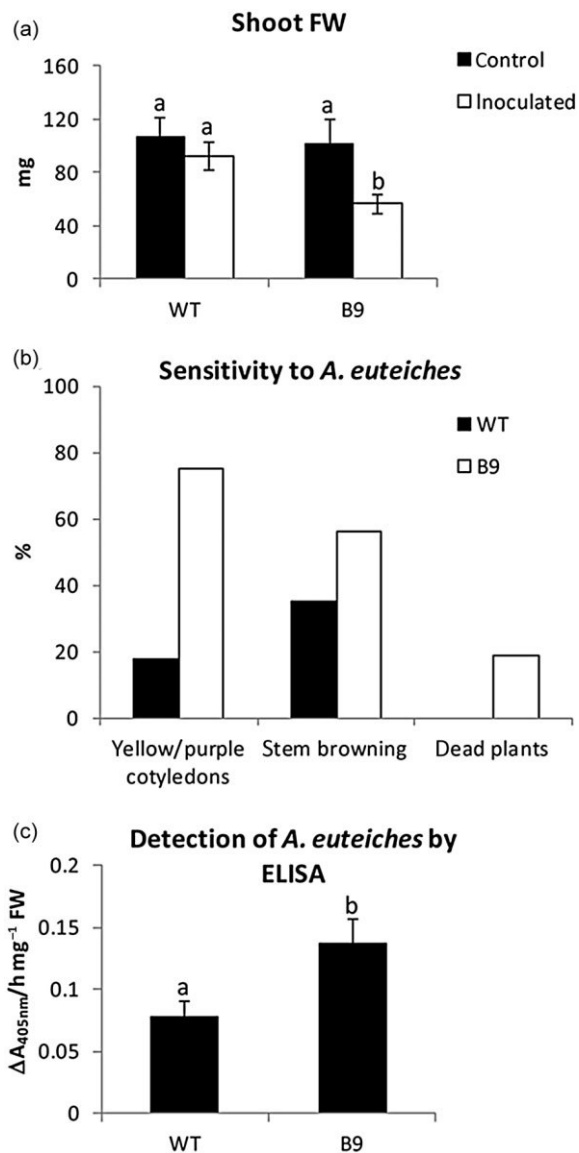


Figure 7. Susceptibility of wild-type (WT) and B9 plants to infection by *Aphanomyces euteiches* *in vitro*. (a) Shoot fresh weight (FW) of WT and B9 mutant inoculated (white bars) or not (black bars) with *A. euteiches*. (b) Sensitivity to *A. euteiches* as scored by the percentage of symptomatic tissues (yellow cotyledons for inoculated WT plants or yellow/purple cotyledons for inoculated B9 plants, stem browning) and of dead plants of inoculated WT and B9 plants after 3 weeks of culture ($n = 16\text{--}20$ plants). (c) Quantification by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of *A. euteiches* in root extracts of inoculated WT and B9 mutant. Plants were cultivated *in vitro* for 3 weeks on M media and inoculated or not with *A. euteiches*. Error bars indicate standard error ($n = 10\text{--}20$ for shoot FW; $n = 4\text{--}5$ for ELISA tests) and letters indicate significant differences ($P < 0.05$). Data from a representative experiment out of four independent experiments are shown.

Table S2), suggesting that the B9 mutant could behave as a partial knock-down *nfp* mutant. Transcriptome analyses (Rey *et al.* 2013) had highlighted a differential expression between *nfp* and WT plants of about 180 genes in non-inoculated

roots. Comparing our transcriptome of the B9 mutant versus WT plants to the published transcriptome of the non-inoculated *nfp* mutant versus non-inoculated WT plants revealed that the profile of the B9 mutant shared some common features with that of the *nfp* mutant: out of the 105 genes found to be induced in *nfp* versus WT roots, 91 were found to be significantly differentially expressed in either B9 P/10 versus WT P/10 or in B9 P2 versus WT P2, and 83 of these 91 genes (90%) were induced in one or the other of these conditions (Supporting Information Table S4). This included genes involved in signalling, secondary metabolism and PR proteins. In the same line, out of the 77 genes that were repressed in non-inoculated *nfp* versus WT roots, 27 were differentially expressed in either B9 P/10 versus WT P/10 or in B9 P2 versus WT P2 comparisons, and 25 of these 27 genes were also repressed in these conditions (Supporting Information Table S4). These genes repressed in both the *nfp* and the B9 mutant compared with WT plants included in particular the *MtLYK3* LysM-RLK, which was strongly repressed at both Pi fertilizations ($\log_2(\text{fold change}) = -3.4$). Thus, the B9 mutant behaved in part like a *nfp* knock-down mutant particularly on P/10 with a profile similar to the *nfp* mutant for a subset of differentially regulated genes between the mutant and WT plants (Supporting Information Table S4).

DISCUSSION

The B9 mutant was initially isolated as a mutant hyper-responsive to AM fungi when inoculated with *Rhizophagus sp.* at a low Pi supply. This hypermycorrhizal phenotype was not, however, systematically observed in subsequent experiments (Fig. 1a,b) when we changed the source of our inoculum and the harvest date (4 weeks versus 5 weeks previously). In our study, we found that the hypermycorrhizal phenotype of the mutant was more clear-cut when both WT and mutants were grown on P2. In these conditions, root colonization by the AM fungus was repressed in WT plants, while in mutant root colonization proceeded, albeit at lower levels than on P/10. This suggested a possible alteration in Pi regulation of AM formation in the B9 mutant. Experiments performed with the B9 mutant aimed to better characterize the response to Pi of this mutant and confirmed that beyond its role as a nutrient, Pi controls processes such as the regulation of symbiotic interactions through transcriptome reprogramming.

Lowered Pi status of the B9 mutant on P2

The Pi status of the NM-B9 plants was lower than that of NM-WT on P2. In line with this possible Pi limitation experienced by the NM-B9 mutant in Pi-replete conditions, the Pi status marker *MtPHO2* gene was expressed less in the NM mutant compared with NM-WT plants in these nutrient conditions. More broadly, our expression (Figs 4 & 5) and transcriptome analyses (Fig. 6) highlighted changes in the expression of genes of the PHR1-PHO2 Pi signalling pathway, but not a general deregulation of all the PSI genes

controlled by the central regulator PHR1 (Supporting Information Table S3). The up-regulation on P2 of several pri-miR399 transcripts, of several mature miR399 families, and the resulting down-regulation of *MtPHO2* and up-regulation of several Pi transporter genes, as well as of the *Mt4* gene all pointed to a Pi limitation experienced by the mutant on P2. Transcriptome studies confirmed the low Pi status of the B9 mutant on P2 and highlighted the extensive changes in Pi-starvation-regulated genes' expression: the response of *Medicago* genes homologous to *Arabidopsis* genes induced either systemically (Pi-uptake genes, lipid metabolism genes) or locally (stress genes including peroxidases, glutathione-S-transferases and osmotin genes) by Pi starvation (Thibaud *et al.* 2010) was affected. *Arabidopsis* mutants displaying an altered Pi status and response to Pi starvation have been identified affected in numerous genes, including genes encoding Pi transporters, genes involved in Pi allocation between shoots and roots, or regulatory genes (Poirier *et al.* 1991; Franco-Zorrilla *et al.* 2005; Shin *et al.* 2006; Stefanovic *et al.* 2007; Lin *et al.* 2009; Smith *et al.* 2010; Nagarajan *et al.* 2011). Interestingly, *Arabidopsis* mutants affected in the *AtPHT1;1* gene or in the accumulation of proteins of the PHT1 family at the plasma membrane (like the *Arabidopsis phf1* mutant) overexpress Pi-starvation-induced genes such as *At4* and *AtPHT1;1* in roots in Pi-replete conditions and display lower shoot Pi concentrations (González *et al.* 2005). Yet in Pi-limiting conditions, they show a lower induction of some Pi-starvation-induced genes than WT plants. The reason for this reduced Pi starvation response in the *Arabidopsis pht1;1* and *phf1* mutants at low Pi supply is unknown but is strongly reminiscent of the B9 mutant, which displayed attenuated response to Pi limitation for a subset of Pi-regulated genes on P/10 (Fig. 6, class 4 genes), but a Pi-limited profile (Fig. 6, class 3 genes) in Pi-replete conditions.

Specific members of the *PHO1* gene family such as the *Arabidopsis AtPHO1* gene participate also in the transfer of Pi to shoots (Poirier *et al.* 1991; Stefanovic *et al.* 2007; Secco *et al.* 2010). Gene expression analyses (Fig. 4b) showed that one of the two *Medicago* genes that were most closely related to the *AtPHO1* gene (*MtPHO1;1*, Supporting Information Fig. S1) displayed a twofold lower expression in the B9 mutant both in P2 and P/10 nutrient conditions (Fig. 4b). The B9 mutant shared several common traits with the null *Atpho1-2* mutant such as a strongly reduced shoot development which could not be rescued by growth at a high Pi supply (Poirier *et al.* 1991) and accumulation of high levels of anthocyanins. However, reduced *AtPHO1* expression led to much more drastic changes in shoot Pi (three- to fourfold lower concentration than WT) even in plants with only two- to fourfold lower *AtPHO1* expression (Rouached *et al.* 2011). Furthermore, though the null *pho1* mutant displayed a Pi-limited profile in leaves in Pi-sufficient conditions, very few PSI genes were induced in these conditions in the mutant's roots in contrast to the Pi-limited profile of the B9 roots on P2. Thus, though some aspects of the B9 mutant were reminiscent of those of null *Atpho1* mutants, altered expression of several *MtPHO1* genes does not likely explain the Pi limitation experienced by the B9 roots on P2.

The hypermycorrhizal phenotype of B9 could be linked to its altered Pi status on P2

The lowered Pi status of the NM-B9 mutant on P2 could explain its hypermycorrhizal phenotype on P2, as plant Pi status is an important factor controlling AM symbiosis (Nagy *et al.* 2009; Balzergue *et al.* 2011). Indeed, high Pi suppression of AM symbiosis was shown to be epistatic to different signals such as strigolactones, lysophosphatidylcholine and miR399 favouring AM symbiosis or AM-specific gene expression (Nagy *et al.* 2009; Branscheid *et al.* 2010; Balzergue *et al.* 2011). Thus, a lower plant Pi status would favour root colonization by AM fungi by derepression of genes involved in stimulating mycorrhizal symbiosis. Indeed, the enhanced expression in the B9 mutant of the *MtCYP711A1* gene (Mtr.46408.1.S1_at, Mtr.42782.1.S1_s_at) homologous to the *Arabidopsis MAX1* gene involved in strigolactone synthesis indicated possibly an enhanced strigolactone synthesis in the B9 mutant on P2. This, in addition to the enhanced root concentrations of the isoflavonoid coumestrol in the B9 mutant, could contribute to the increased mycorrhizal colonization of this mutant (Morandi *et al.* 2009). In *Arabidopsis*, the *MAX1* gene acts as a positive regulator of the expression of numerous genes involved in flavonoid synthesis (Lazar & Goodman 2006). The overexpression of the *MtCYP711A1* gene in the B9 mutant could therefore explain the enhanced expression in the B9 mutant of chalcone synthase genes (Supporting Information Fig. S4) and possibly the increased anthocyanin concentrations of mutant shoots (Fig. 3a).

Altered root architecture and Pi status of the B9 mutant: what is the primary defect?

Analysis of root architecture response to Pi limitation of the B9 mutant revealed that LR density (the number of LR per cm of RI) did not respond to changes in Pi supply in contrast to WT plants. This could be due to the low Pi status of the mutant leading to a Pi-limited root architecture on both HP and LP, and resulting in an increased expression of Pi-limitation-induced secondary metabolism genes (Supporting Information Fig. S4). The stimulation of genes encoding enzymes involved in secondary metabolism in the B9 mutant compared with WT plants both on P2 and P/10, in particular genes involved in isoflavonoid synthesis highlighted by transcriptomics (Supporting Information Fig. S4) and the accumulation of the isoflavonoid coumestrol detected by high-performance liquid chromatography (HPLC) in mutant roots (Morandi *et al.* 2009), could explain the altered root architecture of the mutant. Indeed, flavonoids including the flavanone naringenin and the isoflavone formononetin were shown to inhibit auxin transport in *Arabidopsis* and in *M. truncatula* and are correlated with defects in root elongation (Brown *et al.* 2001; Laffont *et al.* 2010). Alternatively, it is possible that primary defects in root growth of the B9 mutant resulted secondarily in defects in Pi uptake and response as described for *Arabidopsis* plants overexpressing the

Pi-starvation-induced transcription factor ZAT6 (Devaiah *et al.* 2007). In favour of the hypothesis that the B9 mutant is primarily affected in root architecture, the reduced development of the B9 mutant could not be restored by providing even higher Pi fertilization than P2 (Morandi, unpublished data). In addition, the S/R ratio of the NM-B9 mutant on P2 was identical to that of Pi-replete WT plants grown on P2 (Fig. 1d), despite the mutant being Pi limited (a condition inducing a lower S/R ratio in WT plants, Fig. 1d). This could indicate altered root growth of the mutant, independent of Pi supply and bypassing the Pi limitation repression of S/R. Hence, whether the B9 mutant is primarily affected in its Pi status and secondarily in its root architecture or the reverse remains to be determined.

Enhanced susceptibility to *A. euteiches* may be linked to repression of *MtNFP* in the B9 mutant

Transcriptome analyses highlighted the numerous stress/defence-related genes not regulated by Pi limitation in WT plants which were differentially expressed between the B9 mutant and WT plants either on P2 and/or on P/10 fertilization. Classical defence genes that were induced upon interaction with pathogens were induced in the mutant in the absence of biotic stress leading to a mutant profile similar to WT plants 1 d after inoculation with *A. euteiches*. Yet mutant plants were more susceptible to *A. euteiches* than WT plants. This was reminiscent of the recent study on *M. truncatula* mutant affected in the LysM-RLK *MtNFP* gene (Rey *et al.* 2013). Transcriptome profiling of this mutant 1 d after inoculation by *A. euteiches* revealed that it shared many common classical defence-related genes with WT plants. This mutant was, however, more susceptible to *A. euteiches* than WT plants, and displayed differences in the profile of transcription factor genes and of genes affecting cell dynamic processes (Rey *et al.* 2013). *MtNFP* (Mtr.15789.1.S1_at) was strongly repressed in the B9 mutant compared with WT on P/10 ($\log_2(\text{fold change}) = -2.9$) and somewhat less repressed on P2 ($\log_2(\text{fold change}) = -1.7$). Thus, it is possible that the B9 mutant responded in part like a *nfp* knock-down mutant, a hypothesis that is supported by our transcriptome analyses (Supporting Information Table S4), and as a result was more susceptible to *A. euteiches*. The *nfp* mutants are affected in nodulation because *MtNFP* is involved in early steps of Nod signalling (Amor *et al.* 2003), but are not affected in mycorrhization possibly because other LysM receptors control also the perception of Myc factors (Gough & Jacquet 2013). Therefore, it is possible that the strong repression of *MtNFP* and of the LysM-RLK *MtLYK3* involved in rhizobial infection caused the nod \pm phenotype of the B9 mutant without, however, affecting mycorrhization. Alternatively, recently cutin monomers were shown to be common signalling components favouring both mycorrhizal colonization and infection by an oomycete (Wang *et al.* 2012). It is possible that the hypermycorrhizal B9 mutant is affected in some other common signalling process to both symbiotic and pathogenic interactions.

Is the pleiotropic phenotype of the B9 mutant linked to its altered Pi response?

The B9 mutant displayed an altered response to Pi and a pleiotropic phenotype including altered root architecture, the induction of numerous stress/defence-related genes compared with WT plants, and enhanced sensitivity to pathogen infection and reduced nodulation. One may wonder whether all these traits are linked to its altered response to Pi. As discussed above, the altered Pi status of the B9 mutant could result in reduced root growth through the stimulation of secondary metabolism. The resulting higher levels of coumestrol present in the B9 mutant roots could impair nodulation by *Sinorhizobium meliloti* as discussed previously (Morandi *et al.* 2009) due to the repressive effect of this isoflavonoid on nodulation gene activity (Zuanazzi *et al.* 1998). In the same way, a fraction (16%) of the stress genes of class 5 (Fig. 6) which were not induced by Pi limitation in WT under our conditions was differentially expressed during stringent Pi limitation (Fig. 6, columns 1, 4, 5). This suggested they could be induced in the B9 mutant due to its altered response to Pi. Indeed, mutants affected in a Golgi phosphate exporter displayed a dwarf phenotype, Pi starvation symptoms, as well as constitutively activated defence responses (Hassler *et al.* 2012). Genetic analyses and map-based cloning may help to better understand the different phenotypes of the B9 mutant and their possible interconnections and hierarchy.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by fundings from the Burgundy Regional Council (Grant FABER 2009-9201AAO036500681 and PARI Agrale 8). E.T. is funded by a PhD contract (2013-32) from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. We thank S. Huguet (URGV, Evry) for performing microarray experiments, A. Nars for help with setting up the pathosystem, J. Disson for help with Pi measurements and G. Recorbet for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Abel S. (2011) Phosphate sensing in root development. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 303–309.
- Amor B.B., Shaw S.L., Oldroyd G.E., Maillat F., Penmetsa R.V., Cook D., Gough C. (2003) The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *The Plant Journal* **34**, 495–506.
- Balzergue C., Puech-Pages V., Becard G. & Rochange S.F. (2011) The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1049–1060.
- Balzergue C., Chabaud M., Barker D.G., Becard G. & Rochange S.F. (2013) High phosphate reduces host ability to develop arbuscular mycorrhizal symbiosis without affecting root calcium spiking responses to the fungus. *Frontiers in Plant Science* **4**, Article426.
- Bari R., Datt Pant B., Stitt M. & Scheible W.R. (2006) PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiology* **141**, 988–999.
- Barrett T., Troup D.B., Wilhite S.E., Ledoux P., Rudnev D., Evangelista C., Edgar R. (2007) NCBI GEO: mining tens of millions of expression profiles—database and tools update. *Nucleic Acids Research* **35**, D760–D765.

- Bécard G. & Fortin J.A. (1988) Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *The New Phytologist* **108**, 211–218.
- Bonneau L., Huguet S., Wipf D., Pauly N. & Truong H.N. (2013) Combined phosphate and nitrogen limitation generates a nutrient stress transcriptome favorable for arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Medicago truncatula*. *The New Phytologist* **199**, 188–202.
- Branscheid A., Sieh D., Pant B.D., May P., Devers E.A., Elkrog A., Krajinski F. (2010) Expression pattern suggests a role of MiR399 in the regulation of the cellular response to local Pi increase during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 915–926.
- Breuilin F., Schramm J., Hajirezaei M., Ahkami A., Favre P., Druege U., Reinhardt D. (2010) Phosphate systemically inhibits development of arbuscular mycorrhiza in *Petunia hybrida* and represses genes involved in mycorrhizal functioning. *The Plant Journal* **64**, 1002–1017.
- Brown D.E., Rashotte A.M., Murphy A.S., Normanly J., Tague B.W., Peer W.A., Muday G.K. (2001) Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126**, 524–535.
- Burleigh S.H. & Harrison M.J. (1999) The down-regulation of Mt4-like genes by phosphate fertilization occurs systemically and involves phosphate translocation to the shoots. *Plant Physiology* **119**, 241–248.
- Bustos R., Castrillo G., Linhares F., Puga M.I., Rubio V., Perez-Perez J., Paz-Ares J. (2010) A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* **6**, e1001102.
- Devaiah B.N., Nagarajan V.K. & Raghothama K.G. (2007) Phosphate homeostasis and root development in *Arabidopsis* are synchronized by the zinc finger transcription factor ZAT6. *Plant Physiology* **145**, 147–159.
- Djebali N., Jauneau A., Ameline-Torregrosa C., Chardon F., Jaulneau V., Mathe C., Jacquet C. (2009) Partial resistance of *Medicago truncatula* to *Aphanomyces euteiches* is associated with protection of the root stele and is controlled by a major QTL rich in proteasome-related genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**, 1043–1055.
- Franco-Zorrilla J.M., Martin A.C., Leyva A. & Paz-Ares J. (2005) Interaction between phosphate-starvation, sugar, and cytokinin signaling in *Arabidopsis* and the roles of cytokinin receptors CRE1/AHK4 and AHK3. *Plant Physiology* **138**, 847–857.
- Gagnot S., Tamby J.P., Martin-Magniette M.L., Bitton F., Taconnat L., Balzergue S., Brunaud V. (2008) CATdb: a public access to *Arabidopsis* transcriptome data from the URGV-CATMA platform. *Nucleic Acids Research* **36**, D986–D990.
- Ge Y., Dudoit S. & Speed T. (2003) Resampling-based multiple testing for microarray data analysis. *Test* **12**, 1–44.
- Gobbato E., Marsh J.F., Vernie T., Wang E., Maillet F., Kim J., Oldroyd G.E. (2012) A GRAS-type transcription factor with a specific function in mycorrhizal signaling. *Current Biology* **22**, 2236–2241.
- González E., Solano R., Rubio V., Leyva A. & Paz-Ares J. (2005) Phosphate transporter traffic facilitator1 is a plant-specific SEC12-related protein that enables the endoplasmic reticulum exit of a high-affinity phosphate transporter in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **17**, 3500–3512.
- Gough C. & Jacquet C. (2013) Nod factor perception protein carries weight in biotic interactions. *Trends in Plant Science* **18**, 566–574.
- Grunwald U., Guo W., Fischer K., Isayenkov S., Ludwig-Muller J., Hause B., Franken P. (2009) Overlapping expression patterns and differential transcript levels of phosphate transporter genes in arbuscular mycorrhizal, Pi-fertilised and phytohormone-regulated *Medicago truncatula* roots. *Planta* **229**, 1023–1034.
- Gu M., Chen A., Dai X., Liu W. & Xu G. (2011) How does phosphate status influence the development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis? *Plant Signaling & Behavior* **6**, 1300–1304.
- Hassler S., Lemke L., Jung B., Mohlmann T., Kruger F., Schumacher K., Neuhaus H.E. (2012) Lack of the Golgi phosphate transporter PHT4:6 causes strong developmental defects, constitutively activated disease resistance mechanisms and altered intracellular phosphate compartmentation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **72**, 732–744.
- Hewitt E. (1966) Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. *Technical communications* **22**, 430–434.
- Hogekamp C., Arndt D., Pereira P., Becker J.D., Hohnjec N. & Kuster H. (2011) Laser-microdissection unravels cell-type specific transcription in arbuscular mycorrhizal roots, including CAAT-box TF gene expression correlating with fungal contact and spread. *Plant Physiology* **157**, 2023–2043.
- Irizarry R., Ooi S., Wu Z. & Boeke J. (2003) Use of mixture models in a microarray based screening procedure for detecting differentially represented yeast mutants. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* **2**, Article1.
- Javot H., Pumplin N. & Harrison M.J. (2007) Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant, Cell & Environment* **30**, 310–322.
- Laffont C., Blanchet S., Lapiere C., Brocard L., Ratet P., Crespi M., Frugier F. (2010) The compact root architecture1 gene regulates lignification, flavonoid production, and polar auxin transport in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **153**, 1597–1607.
- Lazar G. & Goodman H.M. (2006) MAX1, a regulator of the flavonoid pathway, controls vegetative axillary bud outgrowth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **103**, 472–476.
- Lin W.Y., Lin S.I. & Chiou T.J. (2009) Molecular regulators of phosphate homeostasis in plants. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1427–1438.
- Liu J., Versaw W.K., Pumplin N., Gomez S.K., Blaylock L.A. & Harrison M.J. (2008) Closely related members of the *Medicago truncatula* PHT1 phosphate transporter gene family encode phosphate transporters with distinct biochemical activities. *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 24673–24681.
- Mano H., Ogasawara F., Sato K., Higo H. & Minobe Y. (2007) Isolation of a regulatory gene of anthocyanin biosynthesis in tuberous roots of purple-fleshed sweet potato. *Plant Physiology* **143**, 1252–1268.
- Misson J., Raghothama K.G., Jain A., Jouhet J., Block M.A., Bligny R., Thibaud M.C. (2005) A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **102**, 11934–11939.
- Morandi D., Sagan M., Prado-Vivant E. & Duc G.R. (2000) Influence of genes determining supernodulation on root colonization by the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* in *Pisum sativum* and *Medicago truncatula* mutants. *Mycorrhiza* **10**, 37–42.
- Morandi D., le Signor C., Gianinazzi-Pearson V. & Duc G. (2009) A *Medicago truncatula* mutant hyper-responsive to mycorrhiza and defective for nodulation. *Mycorrhiza* **19**, 435–441.
- Morcuende R., Bari R., Gibon Y., Zheng W., Pant B.D., Blasing O., Scheible W.R. (2007) Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus. *Plant, Cell & Environment* **30**, 85–112.
- Nagarajan V.K., Jain A., Poling M.D., Lewis A.J., Raghothama K.G. & Smith A.P. (2011) *Arabidopsis* Pht1:5 mobilizes phosphate between source and sink organs and influences the interaction between phosphate homeostasis and ethylene signaling. *Plant Physiology* **156**, 1149–1163.
- Nagy R., Drissner D., Amrhein N., Jakobsen I. & Bucher M. (2009) Mycorrhizal phosphate uptake pathway in tomato is phosphorus-repressible and transcriptionally regulated. *The New Phytologist* **181**, 950–959.
- Naoumkina M., Farag M.A., Sumner L.W., Tang Y., Liu C.J. & Dixon R.A. (2007) Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **104**, 17909–17915.
- Oldroyd G.E. (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews. Microbiology* **11**, 252–263.
- Parniske M. (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews. Microbiology* **6**, 763–775.
- Péret B., Clément M., Nussaume L. & Desnos T. (2011) Root developmental adaptation to phosphate starvation: better safe than sorry. *Trends in Plant Science* **16**, 442–450.
- Poirier Y., Thoma S., Somerville C. & Schiefelbein J. (1991) Mutant of *Arabidopsis* deficient in xylem loading of phosphate. *Plant Physiology* **97**, 1087–1093.
- Rey T., Nars A., Bonhomme M., Bottin A., Huguet S., Balzergue S., Jacquet C. (2013) NFP, a LysM protein controlling Nod factor perception, also intervenes in *Medicago truncatula* resistance to pathogens. *The New Phytologist* **198**, 875–886.
- Rouached H., Stefanovic A., Secco D., Bulak Arpat A., Gout E., Bligny R. & Poirier Y. (2011) Uncoupling phosphate deficiency from its major effects on growth and transcriptome via PHO1 expression in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **65**, 557–570.

- Rubio V., Linhares F., Solano R., Martin A.C., Iglesias J., Leyva A. & Paz-Ares J. (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes & Development* **15**, 2122–2133.
- Schneider C.A., Rasband W.S. & Eliceiri K.W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **9**, 671–675.
- Secco D., Baumann A. & Poirier Y. (2010) Characterization of the rice PHO1 gene family reveals a key role for OsPHO1;2 in phosphate homeostasis and the evolution of a distinct clade in dicotyledons. *Plant Physiology* **152**, 1693–1704.
- Shen J., Yuan L., Zhang J., Li H., Bai Z., Chen X., Zhang F. (2011) Phosphorus Dynamics: From Soil to Plant. *Plant Physiology* **156**, 997–1005.
- Shin H., Shin H.S., Chen R. & Harrison M.J. (2006) Loss of At4 function impacts phosphate distribution between the roots and the shoots during phosphate starvation. *The Plant Journal* **45**, 712–726.
- Slezacek S., Dumas-Gaudot E., Rosendahl S., KjØLLer R., Paynot M., Negrel J. & Gianinazzi S. (1999) Endoproteolytic activities in pea roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and/or *Aphanomyces euteiches* in relation to bioprotection. *The New Phytologist* **142**, 517–529.
- Smith A.P., Jain A., Deal R.B., Nagarajan V.K., Poling M.D., Raghothama K.G. & Meagher R.B. (2010) Histone H2A.Z regulates the expression of several classes of phosphate starvation response genes but not as a transcriptional activator. *Plant Physiology* **152**, 217–225.
- Smith S.E., Jakobsen I., Gronlund M. & Smith F.A. (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiology* **156**, 1050–1057.
- Stefanovic A., Ribot C., Rouached H., Wang Y., Chong J., Belbahri L., Poirier Y. (2007) Members of the PHO1 gene family show limited functional redundancy in phosphate transfer to the shoot, and are regulated by phosphate deficiency via distinct pathways. *The Plant Journal* **50**, 982–994.
- Thibaud M.C., Arrighi J.F., Bayle V., Chiarenza S., Creff A., Bustos R., Nussaume L. (2010) Dissection of local and systemic transcriptional responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **64**, 775–789.
- Usadel B., Nagel A., Thimm O., Redestig H., Blaesing O.E., Palacios-Rojas N., Stitt M. (2005) Extension of the visualization tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of corresponding genes, and comparison with known responses. *Plant Physiology* **138**, 1195–1204.
- Varkonyi-Gasic E., Wu R., Wood M., Walton E.F. & Hellens R.P. (2007) Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods* **3**, 12.
- Vierheilig H., Coughlan A.P., Wyss U., & Piche Y. (1998) Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 5004–5007.
- Wang E., Schornack S., Marsh J.F., Gobbato E., Schwessinger B., Eastmond P., Oldroyd G.E. (2012) A common signaling process that promotes mycorrhizal and oomycete colonization of plants. *Current Biology* **22**, 2242–2246.
- Yang X.J. & Finnegan P.M. (2010) Regulation of phosphate starvation responses in higher plants. *Annals of Botany* **105**, 513–526.
- Zhang Q., Blaylock L.A. & Harrison M.J. (2010) Two *Medicago truncatula* half-ABC transporters are essential for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Cell* **22**, 1483–1497.
- Zhou J., Jiao F.C., Wu Z., Li Y., Wang X., He X.-H., Wu P. (2008) OsPHR2 is involved in phosphate-starvation signaling and excessive phosphate accumulation in shoots of plants. *Plant Physiology* **146**, 1673–1686.
- Zuanazzi J.A.S., Clergeot P.H., Quirion J.-C., Husson H.-P., Kondorosi A. & Ratet P. (1998) Production of *Sinorhizobium meliloti* nod gene activator and repressor flavonoids from *Medicago sativa* roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**, 784–794.

Received 20 February 2014; received in revised form 29 April 2014; accepted for publication 30 April 2014

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Figure S1. Maximum parsimony (MP) consensus tree of the PHO1 family from *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula* and *Oryza sativa* after alignment of the amino acid sequences.

Figure S2. Sequence comparison of members from the MYB coiled coil (MYB-CC) transcription factor family from *Arabidopsis* including AtPHR1 [encoded by the At4g28610 gene (Bustos *et al.* 2010)] and AtPHL1 (At5g29000) with the rice OsPHR1 and OsPHR2 proteins (Zhou *et al.* 2008), the *Chlamydomonas reinhardtii* CrPSR1 (Rubio *et al.* 2001) and the three *Medicago truncatula* MYB-CC transcription factors displaying the highest homology with AtPHR1.

Figure S3. qPCR validation of microarray data.

Figure S4. Expression profile of the genes involved in flavonoid and isoflavonoid synthesis in the different transcriptome experiments comparing roots of WT and B9 mutant plants cultivated on P2 or on P/10, and in the transcriptome analysing the effect of stringent Pi limitation in *Medicago truncatula* (Hogekamp *et al.* 2011).

Table S1. Primers used for qPCR experiments.

Table S2. Genes significantly (corrected Bonferroni P -value < 0.05) differentially expressed ($|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$) in at least one of the four comparisons performed in the transcriptome experiments on roots of wild-type (WT) and B9 mutant plants cultivated on P2 (2.6 mM Pi) or P/10 (0.13 mM Pi).

Table S3. Profile of genes homologous to *Arabidopsis thaliana* Pi-starvation-induced genes regulated by AtPHR1 and differentially expressed in our transcriptome experiments.

Table S4. Profile of genes significantly up-regulated (or down-regulated) in non-inoculated *nfp* mutant roots compared with non-inoculated WT roots (Rey *et al.* 2013) and significantly differentially expressed (corrected Bonferroni P -value < 0.05) in at least one of our comparisons.

CONCLUSIONS
&
PERSPECTIVES

Dans cette dernière partie du manuscrit, nous rappellerons tout d'abord les grandes conclusions des travaux réalisés. Ces conclusions seront ensuite discutées de manière globale en essayant d'établir des liens entre nos deux études mais également, d'évaluer les limites de nos approches, tant au point de vue méthodologique que scientifique. Enfin, nous terminerons par les perspectives envisagées, appuyées par quelques résultats préliminaires.

1. Conclusions

Nos travaux ont permis de montrer l'effet de la disponibilité en azote, d'une part, sur la résistance de *M. truncatula* à *A. euteiches* et ce de façon dépendante du génotype, et d'autre part sur l'homéostasie du NO, phénomène impliqué dans la signalisation immunitaire.

*1.1 Effet de la carence azotée sur la résistance de *M. truncatula**

La nutrition azotée, quantitativement et qualitativement, est connue pour moduler les interactions plantes/microorganismes pathogènes et ainsi augmenter ou réduire la sensibilité des plantes aux agressions. Nous avons pu vérifier ces effets dans notre modèle d'étude. Un point important de nos travaux a été alors de prendre en compte la variabilité génétique de l'espèce hôte, *M. truncatula*, en étudiant l'effet de la carence azotée sur une collection de 10 génotypes représentatifs de l'espèce. A l'issue de nos premières investigations, qui ont permis de mettre en évidence une variabilité de réponse de la plante lors de l'infection en situation de carence, nous avons retenu quatre génotypes aux réponses contrastées. F83005.5 et SA022322 dont la susceptibilité à *A. euteiches* est augmentée en carence en azote et A17 et DZA045-6 dont la résistance est augmentée en milieu carencé en azote. Par analogie avec les études réalisées sur le riz (Ballini *et al*, 2013), l'augmentation de la sensibilité ou de la résistance a été appelée respectivement NØ-IS pour « NØ-induced susceptibility » et NØ-IR pour « NØ-induced resistance ». La limitation de l'étude à quatre génotypes nous a permis de réaliser des analyses morphologiques, biochimiques et moléculaires plus complexes et ainsi de tester plusieurs hypothèses pour expliquer cette modulation différente de la résistance de ces génotypes par l'azote.

Une première hypothèse était que ces deux groupes de génotypes (NØ-IS et NØ-IR) pouvaient percevoir la carence azotée différemment et que les réponses de défense des individus les plus affectés par la carence en azote étaient induites par ce stress nutritionnel. L'analyse des transcrits de gènes impliqués dans le métabolisme azoté et les analyses de la biomasse et des concentrations en azote total des parties aériennes ne permettent pas de distinguer clairement les deux groupes de génotypes (NØ-IS et NØ-IR) entre eux sur la base de leur réponse à la carence azotée. Ainsi, ces résultats ne valident pas cette première hypothèse. Cependant, les analyses moléculaires et celles des teneurs en acides aminés (*voir plus loin*) ont mis en évidence la réponse altérée au nitrate et à la carence azotée du génotype DZA045-6.

Une seconde hypothèse était que les réponses de défenses (évaluées par l'analyse de l'activation de l'expression de gènes candidats) pouvaient être modulées de façon différentielle en milieu NØ entre les deux groupes de génotypes. En milieu complet, les gènes du métabolisme secondaire et de défense tels que *PAL1*, *PAL2*, *COMT1*, *CCNBS*, *LOX* et *PR10* sont, pour la plupart, plus exprimés chez les génotypes plus résistants et montrant une NØ-IR. Cependant, en milieu NØ, alors que la susceptibilité des génotypes NØ-IS augmente, l'expression de ces gènes augmente et donc n'est plus corrélée à la résistance. Ce n'est donc pas l'expression différentielle de ces gènes entre les deux groupes qui expliquerait l'effet de la carence azotée sur la résistance.

La modulation de la résistance en milieu NØ semble donc liée à une interaction fine entre la capacité de la plante à mobiliser l'azote et les réponses de défense. Les résultats dans la littérature nous ont conduits à étudier si la modulation de la résistance en milieu NØ pouvait être corrélée avec les teneurs en acides aminés. Ces analyses ont confirmé que le génotype DZA045-6 reste, lui, très différent des autres génotypes par la faible modulation par la carence azotée des teneurs racinaires en acides aminés mineurs. La glutamine (Gln) a retenu notre attention parmi les différents acides aminés. En effet, en présence de l'agent pathogène, en milieu complet ou carencé en azote, les concentrations de cet acide aminé augmentent chez les génotypes les plus sensibles et NØ-IS et sont significativement supérieures à ceux des génotypes les plus résistants et NØ-IR. La teneur en Gln dans les racines inoculées permet ainsi de discriminer les deux groupes NØ-IS et NØ-IR. Nous avons ainsi mis en évidence une corrélation entre des teneurs élevées en Gln dans les racines inoculées et une susceptibilité plus importante à *A. euteiches*. L'analyse de la modification du taux de Gln pourrait donc être un élément important pour comprendre le phénomène de résistance à *A. euteiches* mais également

les effets de la carence azotée sur la résistance. De plus, ces résultats sont confortés par deux autres expériences. Premièrement, l'addition de Gln dans un milieu NØ rend le génotype A17, considéré comme tolérant, plus sensible que sur milieu NØ seul et sur milieu complet. Deuxièmement la protection du génotype F83005.5 induite par le BABA est corrélée à une baisse des teneurs en Gln des racines inoculées et est partiellement annulée par la Gln. Cette réversion de la protection du BABA par la Gln chez les génotypes sensibles pourrait être le même phénomène que l'augmentation de la sensibilité du génotype résistant A17 en présence de Gln. En effet, le BABA induit une réponse morphogénétique liée au stress (*SIMR, stress-induced morphogenic response*) (Wu *et al*, 2010) et la carence azotée entraîne également un stress (*cf Chapitre I 1.4 b*). Nous avons alors regardé si le BABA avait le même effet que la carence azotée sur les teneurs en acides aminés, autres que la Gln. La comparaison des différentes concentrations en acides aminés chez le génotype F83005.5 en présence de BABA et chez le génotype A17 en milieu NØ ne montre aucune corrélation entre ces deux conditions. Ainsi, l'analyse des acides aminés ne permet pas d'affirmer que la réversion de la protection du BABA par la Gln correspond au même phénomène que l'augmentation de la sensibilité du génotype A17 en présence de Gln.

Pour des problèmes pratiques, en vue de nombre d'échantillons à traiter (4 génotypes, 4 conditions, répétitions biologiques), les différentes analyses ont seulement été réalisées à un temps fixe (généralement 10 dpi). Ceci pourrait ne pas être optimal pour détecter des réponses différentielles des génotypes à la carence azotée et à l'infection. Pour la poursuite des travaux, une cinétique pourra être réalisée (3-6-10 dpi).

1.2 Effet de la carence azotée sur la signalisation immunitaire régulée par le NO

L'effet de la carence azotée a également été observé sur des événements impliqués dans la signalisation immunitaire chez le génotype A17. Cette carence module en effet les niveaux de ROS et l'homéostasie du NO dont nous avons démontré l'importance grâce aux expériences sur les racines transformées. Effectivement, la carence entraîne une baisse des niveaux d'H₂O₂ et de NO et une augmentation de ONOO⁻ et de SNO. Par ailleurs, l'homéostasie du NO affecte la résistance à *A. euteiches* et ce de façon différente selon que l'on module le NO ou le GSNO

et donc indirectement les SNO. En effet, les racines mutantes *nia1/nia2*, et surexprimant *Hmp* dont les niveaux de NO sont diminués (non démontré dans cette étude pour les mutants *Hmp*), deviennent plus sensibles à *A. euteiches* alors que celles surexprimant la *GSNOR*, dont les niveaux de SNO sont augmentés, montrent une résistance accrue contre l'agent pathogène. Ces résultats confirment le rôle non redondant du NO et du SNO dans l'immunité des plantes (Yun *et al*, 2016).

Nous avons identifié deux limites potentielles à nos approches. D'une part, il serait intéressant de confirmer ces résultats par une autre méthode de dosage des ROS et RNS. En effet, l'analyse de la variation des niveaux de ROS et RNS par des sondes fluorescentes nous ont paru assez délicats. En effet, ils ont demandé de très nombreuses répétitions afin de bien standardiser le protocole et maîtriser la variabilité des mesures; cette variabilité pouvant être liée entre autre à un problème de stabilité des molécules à doser, de spécificité des sondes (Planchet *et al*, 2005) ou due aux limites de détection des méthodes de mesure. Il faut noter d'autre part, que si le système de transformation utilisé présente l'avantage d'être rapide à mettre en œuvre (ne nécessite pas d'obtenir des transformations de plantes stables), son utilisation peut être discutée. En effet, dans ce système les racines sont dépourvues de partie aérienne ce qui nous éloigne des conditions physiologiques de la plante et limite leur champ d'utilisation (symbiose, mesure des flux de nutriments...).

1.3 Lien entre résistance et signalisation immunitaire au cours de la modulation de la résistance par la carence azotée

Dans cette partie, nous proposons de confronter les résultats obtenus entre les deux publications.

Nous avons tout d'abord comparé les situations où la résistance des plantes était modifiée, soit liée à une modification de la disponibilité en azote soit à une modification génétique (racines transformées).

Nous avons établi que des racines transformées, qui surexpriment la *GSNOR* et dont l'activité *GSNOR* et les niveaux de SNO sont plus élevés, deviennent plus résistantes à *A. euteiches*. De manière intéressante, nous avons montré que le génotype A17, qui devient plus

résistant sur milieu carencé en azote, montre également une augmentation de l'activité GSNOR et des niveaux de SNO en milieu NØ. La GSNOR et les SNO sembleraient donc jouer un rôle dans l'augmentation de la résistance de A17 en milieu NØ. Il faut noter, cependant, un résultat plutôt inattendu, à savoir que des racines surexprimant le gène codant pour la GSNOR ont révélé des niveaux de SNO plus élevés. En effet, même si une étude chez le pois avait montré une corrélation positive entre niveaux de SNO et activité GSNOR (Corpas *et al*, 2008), dans la majorité des modèles étudiés, une corrélation négative est décrite: l'augmentation de l'activité GSNOR diminue le pool de GSNO et donc indirectement celui de SNO (Feechan *et al*, 2005; Rustérucchi *et al*, 2007; Yun *et al*, 2011). Nos résultats indiqueraient que les niveaux de SNO ne sont pas uniquement contrôlés par l'activité GSNOR, mais aussi par une autre voie comme le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase NADPH-dépendante (Kneeshaw *et al*, 2014; Correa-Aragunde *et al*, 2015).

A l'inverse, nous avons aussi montré que les racines transformées *nia1/nia2* deviennent plus sensibles à *A. euteiches*. L'hypothèse suggérée pour expliquer les résultats obtenus grâce à ce double mutant *nia1/nia2* serait que la faible activité NR entraînerait une baisse de la production de NO qui ne permettrait pas à la plante d'induire ses réponses de défense de manière optimale et rendrait ainsi le mutant plus sensible à l'agent pathogène comme cela a déjà été observé dans d'autres pathosystèmes (Modolo *et al*, 2005, 2006, Rasul *et al*. 2012). Un effet direct d'une perturbation de l'activité NR (réduction des nitrates en nitrites) et donc du métabolisme azoté sur la résistance doit également être pris en compte. Il semble alors intéressant de mettre en relation les données obtenues pour le double mutant *nia1/nia2* et le génotype A17 cultivé en milieu NØ. En effet, ce dernier devient plus résistant en milieu NØ. Si l'on considère qu'un mutant affecté dans les gènes codant pour la NR assimile peu de nitrate, il pourrait de ce fait ressembler à une plante carencée en azote. Cependant, A17 voit également ses niveaux de NO diminuer en milieu NØ sans toutefois devenir plus sensible à *A. euteiches*. La différence de résistance entre *nia1/nia2* et A17 pourrait alors s'expliquer par rapport au NO₃⁻. Effectivement, A17 en milieu NØ est dépourvu de nitrate alors que le double mutant est cultivé sur un milieu en présence de nitrate et l'accumule. Le nitrate pourrait donc justifier la différence de résistance entre *nia1/nia2* et A17. Dans ce cas, l'hypothèse ici serait que le nitrate jouerait un rôle en tant que molécule signal dans l'immunité de *M. truncatula* plutôt que par sa métabolisation. Par exemple, le nitrate en tant que signal réprime le métabolisme secondaire et pourrait affecter ainsi les réponses de défense des plantes (Fritz *et al*, 2006). Cette hypothèse

est confortée par le fait que le génotype DZA045-6, dont la réponse au nitrate est altérée, est le génotype le plus résistant des quatre génotypes sélectionnés.

Enfin, nous avons montré que les racines transformées surexprimant le gène codant pour *Hmp* deviennent plus sensibles à *A. euteiches*. Les hémoglobines métabolisent le NO en nitrate. Une hypothèse alors émise était que la surexpression de *Hmp* pouvait diminuer les concentrations en NO et donc expliquer l'augmentation de la sensibilité chez ces plantes transformées comme chez le double mutant *nia1/nia2*. Nous n'avons cependant pas réussi à doser le NO dans les racines transformées *Hmp*. Cependant, l'augmentation de sensibilité chez les racines surexprimant *Hmp* ne peut être expliquée par le nitrate. Les dosages du contenu en nitrate ne montrent pas de différence entre les racines contrôles et celles surexprimant *Hmp*. Ainsi, dans le cas des racines surexprimant *Hmp*, la perturbation de l'homéostasie du NO serait vraisemblablement à l'origine de la baisse de résistance observée comme ce qui a été analysé chez les plantes d'*A. thaliana* surexprimant le gène *GLB1* codant pour une hémoglobine non symbiotique (Mur *et al*, 2012).

Enfin, les racines transformées surexprimant *Hmp* ou *GSNOR* sont affectées de manière opposée dans leur résistance à *A. euteiches*. Ceci pourrait s'expliquer par la spécificité de leur rôle dans l'homéostasie du NO. En effet, les hémoglobines piègent directement le NO et produisent du nitrate alors que le premier effet de la *GSNOR* est la régulation des contenus en GSNO. L'ensemble des résultats obtenus indiquerait un rôle spécifique des nitrates, NO et GSNO dans l'immunité.

2. Perspectives

Nos différentes investigations (analyses de la production de métabolites secondaires, de l'expression de gènes candidats liés aux réponses de défense ou au métabolisme azoté, ou encore de la modification des teneurs en acides aminés) ne nous ont pas permis de mettre clairement en évidence les mécanismes moléculaires pouvant expliquer la modulation, génotype dépendante, de la résistance en condition de carence azotée.

Plusieurs perspectives seraient alors envisageables pour identifier les bases moléculaires de ce phénomène.

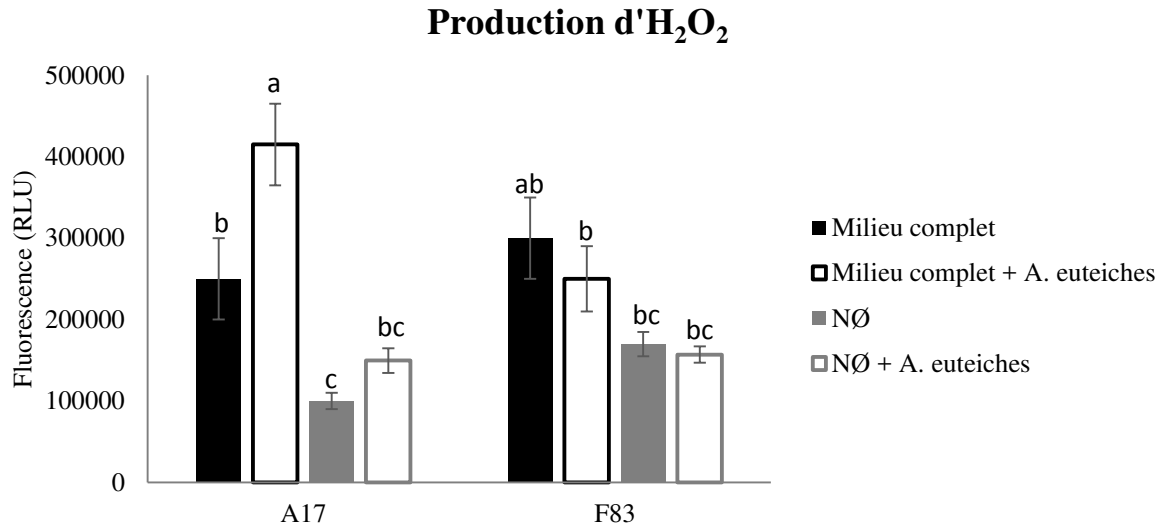


Figure CP.1: Mesure des teneurs en H₂O₂ 1h après inoculation des racines des génotypes A17 et F83005.5 de *M. truncatula* par les zoospores d'*A. euteiches*

Les résultats semblent indiquer (i) une production d'H₂O₂ pour le génotype A17 en milieu complet mais pas pour le génotype F83005.5 et (ii) des niveaux de base plus faibles en milieu NØ pour les deux génotypes mais seulement de manière significative pour le génotype A17.

Le graphique présenté correspond à une expérience représentative de 3 expériences indépendantes. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard (n = 4) et les lettres indiquent les différences significatives (ANOVA suivie d'un test de Fisher $p < 0,05$).

2.1 Poursuivre la piste des RNS et de leur homéostasie

a. Intégrer la dimension « variabilité génotypique »

Pour conforter l'hypothèse que l'augmentation d'activité GSNOR et des niveaux de SNO jouent un rôle important dans l'augmentation de résistance de A17 en milieu NØ, il serait intéressant de tester si, dans les génotypes NØ-IS, la carence en azote n'induit pas au contraire une baisse d'activité GSNOR et des niveaux de SNO qui pourrait expliquer leur sensibilité accrue dans ces conditions (en comparaison avec les génotypes NØ-IR). Des premières expériences ont été entreprises mais la détection des SNO est délicate et les très faibles variations de concentration entre génotypes rendent l'interprétation des résultats difficile. La méthode de Saville-Griess, utilisée pour nos expériences, est basée sur la détection d'ions nitrites. Cette méthode peut être contestée par le fait qu'en système biologique, il y a nettement plus de nitrites que de SNO (Diers *et al*, 2014), ce qui fait que les niveaux de SNO sont proches de la limite de détection avec cette méthode. D'autres méthodes plus sensibles de détection du SNO pourraient être envisagées comme par exemple l'utilisation de sonde fluorescente (Alexa fluor 488 Hg-link phenylmercury) (Valderrama *et al*, 2007) ou la méthode de Photolyse-chemiluminescence (Mannick *et al*, 1999).

b. Mesure des ROS et RNS sur des temps courts d'infection

Les dosages des ROS et des RNS publiés dans Thalineau *et al*, (2016) ont été réalisés à 7 jours après infection. La production de ces molécules est, cependant, considérée comme un événement moléculaire précoce de défense et dont les concentrations évoluent au cours du temps. En effet, Djébali *et al*, (2011) ont montré une diminution rapide d'H₂O₂ chez le génotype A17 après infection par *A. euteiches* alors que cette diminution est observée seulement au bout de 3 jours chez F83005.5. Une analyse cinétique de la réponse à *A. euteiches* sur des temps très courts des niveaux de ces molécules nous paraît alors intéressante.

Une première étude de la production d'H₂O₂ a été réalisée durant la phase précoce de réponse de défense. Pour cela, les plantes des génotypes A17 (NØ-IR) et F83005.5 (NØ-IS) ont été cultivées pendant une semaine en milieu complet ou NØ. Ces plantes ont été élicitées par des zoospores d'*A. euteiches* et une mesure de la production de ROS a été réalisée au bout d'une heure. Les résultats obtenus (Figure CP.1) pour le génotype A17 ressemblent à ceux observés à 7 jours d'infection dans l'article (Thalineau *et al*, 2016) et montrent de plus qu'il pourrait y avoir un effet génotypique dans la signalisation. En milieu complet, la différence de production

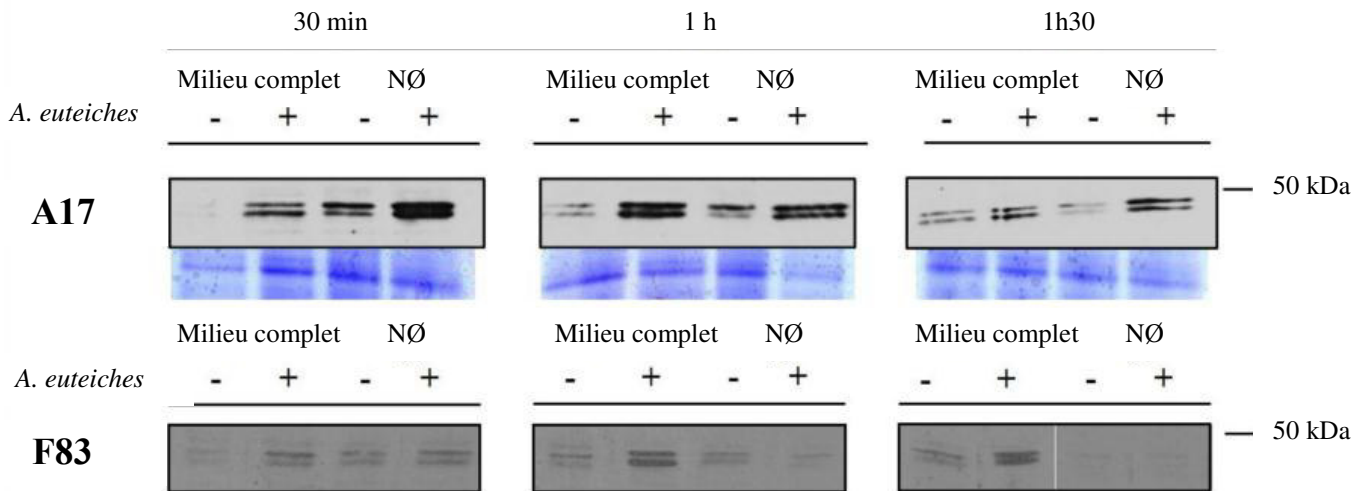


Figure CP.2: Cinétique d'activation des MAPKs dans les racines des génotypes A17 et F83005.5 en réponse à la carence en nitrate et à *A. euteiches*

Les résultats montrent la présence de deux bandes à environ 45 et 49 kDa, qui pourraient correspondre respectivement aux orthologues des MPK3 et MPK6 chez *A. thaliana*. Chez le génotype A17, la carence en nitrate semble induire l'activation de MPK6 entre 30 min et 1 h. La présence d'*A. euteiches* induit l'activation des MAPKs durant toute la durée de l'expérience pour le génotype A17 et quel que soit le milieu nutritif. Un pic d'intensité est cependant observé en fonction du temps. En milieu complet, le pic se situe à 1 h après inoculation et, en milieu NØ, à partir de 30 min après inoculation. Chez le génotype F83005.5, une activation des MAPKs est observée en milieu complet en présence d'*A. euteiches*. En milieu NØ, l'activation est observée à 30 min en présence d'*A. euteiches* et semble diminuer progressivement au cours de l'expérience. Ces résultats montrent l'activation des MAPKs en milieu complet quel que soit le génotype. L'activation des MAPKs par *A. euteiches* en milieu NØ est seulement observée chez A17.

L'expérience présentée a été réalisée sur le génotype tolérant (A17) et sur le génotype sensible (F83005.5) cultivés pendant 1 semaine en milieux complet ou carencé en nitrate (NØ) et en présence (+) ou en absence (-) d'*A. euteiches*. L'expérience correspond à une expérience représentative de trois expériences indépendantes (n = 8). Pour le génotype A17, la coloration au Bleu de Coomassie est présentée en-dessous des signaux issus d'immunodétection, comme témoin de charge des gels.

de ROS en présence de l'agent pathogène pourrait expliquer la différence de résistance entre les deux génotypes, avec une production plus importante de ROS dans le génotype le plus résistant (A17). En carence azotée, les niveaux de ROS en présence d'*A. euteiches* ne sont plus corrélés à l'augmentation de résistance de A17 et la baisse de celle de F83005.5. Il reste ainsi à mieux comprendre les liens entre les niveaux d'H₂O₂ et la résistance à *A. euteiches*.

c. Etudier les modifications post-traductionnelles induites par le NO

L'analyse de profils de protéines modifiées post-traductionnellement par le NO pourrait être utilisée afin d'identifier ces cibles et ainsi de mieux comprendre son rôle dans la signalisation. Cette analyse nous paraît d'autant plus pertinente dans la mesure où la détection du NO est difficile. L'étude de la tyrosine-nitration et de la S-nitrosylation comme MPT de protéines racinaires est envisagée dans des conditions de culture des plantes en milieu complet ou carencé en azote qui modulent les teneurs en NO, SNO et ONOO⁻ (Thalineau *et al*, 2016). Si la présence de protéines S-nitrosylées et/ou tyrosine-nitrées est confirmée, celles-ci pourront être identifiées par une immunoprécipitation et par des analyses en spectrométrie de masse. L'analyse qualitative des protéines pouvant être S-nitrosylées et/ou tyrosine-nitrées permettrait d'approfondir la modulation de la résistance par le NO.

d. Etudier le rôle des MAPKs en lien avec NO

En raison de son impact majeur dans les réponses aux stress, la voie des MAPKs pourrait également être une piste à étudier. En effet, l'activation des MAPKs par phosphorylation est un événement classique des réponses précoces des plantes en condition de stress biotique (Garcia-Brugger *et al*, 2006). De plus, il a été montré que le traitement de feuilles ou de suspensions cellulaires par du NO entraîne l'induction de la MAPK SIPK ((SA)-induced protein kinase) (Kumar & Klessig, 2000; Besson-Bard *et al*, 2008a). Les MAPKs sont connues pour être également importantes dans la réponse nutritionnelle. Par exemple, les MPK3 et 6 sont activées lors d'une carence en Pi (Lei *et al*, 2014). Wang *et al*, (2010) ont montré que la production d'H₂O₂ entraîne une phosphorylation de nia2 par MPK6 conduisant à une augmentation de l'activité NR et ainsi à une production de NO. En raison de son impact majeur dans les réponses au stress, et de son lien avec la signalisation NO, la voie des MAPKs nous semble également importante à regarder.

Une analyse préliminaire de l'activation des MAPKs a été réalisée à partir des plantes A17 et F83005.5 cultivées pendant une semaine en milieu complet ou NØ et inoculées par *A. euteiches*. Nos premiers résultats (Figure CP.2) indiquent que les MAPKs semblent être un

élément intéressant à prendre en compte dans la modulation de la résistance par l'azote. Les liens entre les productions de ROS et RNS et l'activation des MAPK pourront être étudiés en utilisant des inhibiteurs de synthèse ou des donneurs de ces molécules et également en utilisant les mutants dont l'homéostasie du NO est perturbée (racines transformées).

2.2. Poursuivre l'étude du rôle de la glutamine

a. Etendre les dosages de la glutamine et des acides aminés à d'autres génotypes

Nous pourrions doser les teneurs en Gln et autres acides aminés dans les racines inoculées des 10 génotypes dont nous avons étudié la modulation de la résistance par la carence azotée. Dans cette collection de génotypes, certains sont plus résistants en milieu complet que A17 (NØ-IR) tout en présentant un comportement NØ-IS (par exemple R108) et d'autres sont plus sensibles (DZA315-16) tout en étant plus résistants en milieu NØ que A17. Il est donc possible de dissocier la résistance en milieu NØ (NØ-IS et NØ-IR) de celle sur milieu complet. Si les teneurs en Gln des racines inoculées sont corrélées aux niveaux de résistance sur milieu complet et sont modifiées en milieu NØ en fonction de la résistance, cela permettrait d'affirmer que cet acide aminé permet de distinguer les lignées NØ-IS et NØ-IR.

b. Etudier les liens glutamine et statut redox

La Gln pourrait avoir une influence sur le statut redox des plantes sensibles. En effet, Liu *et al.*, (2010) ont montré que la Gln jouait un rôle inhibiteur sur l'accumulation d'H₂O₂ dans les feuilles infectées et pourrait ainsi rendre les plantes plus sensibles aux agents pathogènes. L'originalité de notre étude est que les acides aminés ont été dosés dans les racines de la plante et ceci laisse supposer que cet effet de la Gln pourrait être étendu à la régulation du statut redox racinaire. L'étude du statut redox (dosages d'H₂O₂ et de GSH, mesures d'activités des enzymes antioxydantes) nous semble intéressante à poursuivre d'autant plus que l'analyse préliminaire des ROS chez F83005.5 (Figure CP.1) ne montre pas de production d'H₂O₂ en réponse précoce à *A. euteiches* contrairement au génotype A17 en milieu complet.

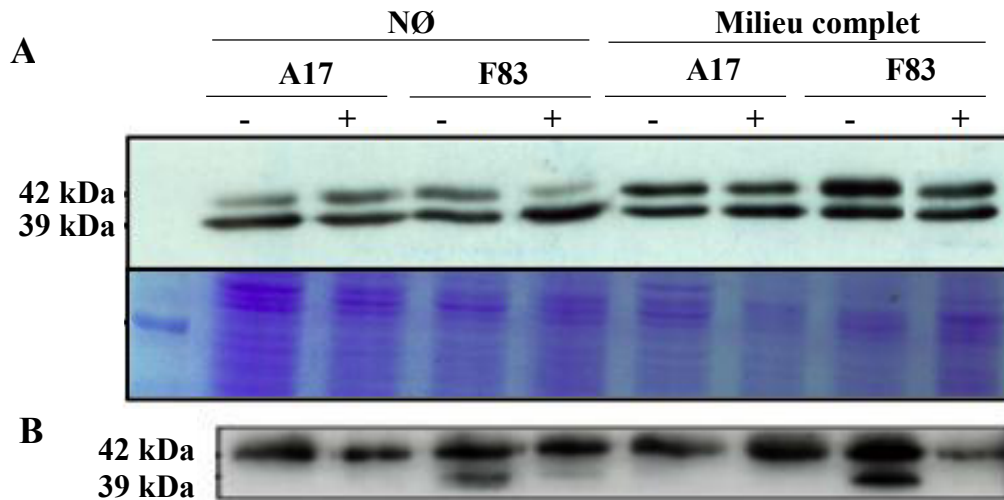


Figure CP.3: Tyrosine nitration de la glutamine synthétase

(A) Détection des deux isoformes de la glutamine synthétase par Western blot ciblé contre les deux isoformes de la GS. L'expérience présentée a été réalisée sur les deux génotypes A17 et F83005.5 cultivés pendant une semaine en milieu complet ou carencé en nitrate (NØ) et en présence (+) ou en absence (-) d'*A. euteiches*. Le signal obtenu à 39 kDa correspond à l'isoforme cytoplasmique GS1 et la bande à 42 kDa correspond à l'isoforme plastidique GS2. (B) Détection de la GS grâce à un anticorps ciblé contre les tyrosine-nitrées.

Expériences réalisées par A. Berger

c. Etudier le rôle et la régulation de la glutamine synthétase

La Gln pourrait être un acide aminé préférentiellement utilisé par *A. euteiches*. Effectivement, cet acide aminé peut servir de source azotée pour *A. euteiches* (Lumsden *et al*, 1970) et est une source préférentielle d'azote pour de nombreux champignons (Tudzynski, 2014). Cet agent pathogène pourrait manipuler le métabolisme de la plante (biosynthèse de Gln) pour favoriser son développement comme cela a été décrit pour d'autres agents pathogènes (Seifi *et al*, 2014).

L'analyse de transcrits de glutamine synthétase a montré que l'expression de *MtGS1a* et *MtGS1b* était augmentée au cours de l'infection en milieu complet chez les génotypes NØ-IS seulement (*cf Chapitre I Figure 5B article*) et en milieu NØ chez le génotype NØ-IS F83005.5 mais pas chez SA022322. Cette augmentation des niveaux de transcrits de gènes codant pour des GS1 a déjà été constatée dans d'autres pathosystèmes (Tavernier *et al*, 2007) et est corrélée à une augmentation des teneurs en Gln liée à l'activation de la remobilisation de l'azote comme réponse de défense de la plante infectée. Il serait alors intéressant de tester le niveau d'expression des GS dans les racines à différents temps après inoculation et d'analyser si ces expressions sont corrélées au développement de l'agent pathogène et à l'expression de certains effecteurs ainsi qu'aux niveaux de Gln racinaires. Ceci permettrait de mieux appréhender les liens entre Gln et pathogénicité d'*A. euteiches*.

Sachant que les GS peuvent être régulées post-traductionnellement, il serait intéressant d'étudier les MPT des GS dans des conditions où les teneurs en Gln dans les racines inoculées augmentent sans qu'il n'y ait augmentation de l'expression des *GS1a* et *GS1b*. En effet, nous avons observé que le niveau de ONOO⁻ augmente en milieu NØ chez A17. Le ONOO⁻ peut induire une MPT appelée tyrosine nitration, pouvant conduire à l'inactivation de protéines cibles du métabolisme azoté, telle que la GS1a (Melo *et al*, 2011). L'inactivation de cette GS par tyrosine nitration aboutirait à l'augmentation de la concentration en glutamate et en GSH (dont le glutamate est précurseur) et ainsi modulerait les capacités antioxydantes dans les nodosités lors de la mise en place de la symbiose. Une analyse préliminaire de la régulation de la GS a été réalisée chez les génotypes A17 et F83005.5 en milieu complet ou NØ infectés ou non par l'agent pathogène. Une diminution de la teneur en GS2 suite à la carence azotée est observée chez les deux génotypes (Figure **CP.3A**). Une première expérience a révélé que la GS2 était tyrosine-nitrée dans toutes les conditions alors que les GS1 semblent seulement l'être chez le génotype F83005.5 en absence d'*A. euteiches* (Figure **CP.3B**). Ces résultats, qui restent

à confirmer, indiqueraient que les MPT des GS sont dépendantes du génotype de la plante mais les liens entre ces MPT et l'accumulation de la Gln doivent être clarifiés.

L'analyse de phosphorylation de protéines, autre MPT, nous semble également être une piste à étudier. Effectivement, chez le colza, la GS1, active dans les feuilles sénescents, peut être phosphorylée par des protéines kinases et phosphatases. Cette phosphorylation permet à la GS d'interagir avec les protéines 14-3-3, augmentant ainsi son activité (Finnemann & Schjoerring, 2000). Nous pourrions alors nous intéresser à cette MPT et également à l'interaction avec les protéines 14-3-3.

2.3. Développer une approche plus globale et intégrée

Contrairement aux approches ciblées mises en œuvre dans cette thèse (étude du niveau d'expression de gènes candidats, de l'accumulation de composés phénoliques solubles des différents acides aminés), il conviendrait d'aborder cette étude par des approches plus globales.

La génétique d'association (GWAS, genome wide association study) est une méthodologie relativement récente qui permet d'accéder aux régions génomiques contrôlant ces caractères complexes mais à des échelles plus fines puisqu'elle permettrait d'identifier des gènes candidats ou les régions régulatrices potentiellement importants pour l'adaptation des plantes au stress azoté et pour leur résistance à *A. euteiches*, ainsi que les liens entre ces deux traits d'importance agronomique. Le génome d'environ 200 lignées différentes de *M. truncatula* est aujourd'hui séquencé ce qui rendrait cette méthode utilisable dans notre étude (Bonhomme *et al*, 2014). Cependant, cette méthode nécessite un phénotypage précis de près de 200 lignées dans 4 conditions (plantes cultivées sur milieu complet ou carencé et en présence d'*A. euteiches*) et au moins 2 expériences indépendantes soit environ 30 000 plantes. Une robotisation de ce phénotypage, par la plateforme de phénotypage à haut débit, est actuellement testée.

Une approche par analyse transcriptomique/métabolomique permettrait de nous renseigner sur les voies métaboliques dérégulées dans nos conditions expérimentales. Par exemple, nous pourrions comparer le transcriptome/métabolome des racines du génotype NØ-IS F83005.5 cultivé sur milieu complet ou NØ en présence ou non d'*A. euteiches* avec celui des

racines du génotype NØ-IR A17 cultivé dans les mêmes conditions. Il pourrait être aussi intéressant de comparer le transcriptome/métabolome du génotype F83005.5 cultivé en présence de BABA avec celui du génotype A17 en milieu NØ en présence ou non de l'agent pathogène afin de voir s'il existe des gènes dont l'expression est corrélée dans ces différents traitements. L'inconvénient de ces analyses est qu'elles risquent de mettre en évidence de nombreux gènes/voies métaboliques différentiellement régulés entre ces génotypes (A17 et F83005.5). Nous nous focaliserons de préférence sur les gènes et voies connues pour jouer un rôle important dans les réponses de défense liées au stress redox ou à la remobilisation de l'azote et dont l'expression différentielle entre les deux lignées est fortement marquée. Un premier tri des gènes candidats pourra être fait sur la base de leur expression différentielle étendue aux autres lignées NØ-IS SA022322 et NØ-IR DZA045-6.

Le rôle de gènes nouvellement identifiés pourra alors être étudié dans un premier temps par l'utilisation de racines transformées. Il serait également intéressant de travailler ensuite avec des plantes composites, des mutants tilling (Le Signor *et al*, 2009) ou Tnt1, d'autant plus qu'une collection de ces mutants est disponible (<http://bioinfo4.noble.org/mutant/database.php>).

2.4 Etudier l'impact de la carence azotée sur la résistance à *A. euteiches* en conditions « naturelles »

Les différentes expériences de la thèse ont été réalisées *in vitro*. Cependant, dans leur environnement naturel, les plantes sont en contact avec différents microorganismes. Parmi ces microorganismes, on retrouve des bactéries (symbiotiques ou libres) qui peuvent améliorer la nutrition azotée de la plante par fixation de l'azote atmosphérique. Il serait donc intéressant d'étudier si ces microorganismes bénéfiques peuvent impacter la résistance de la plante par leur contribution à la nutrition azotée. L'utilisation de bactéries fixatrices d'azote, symbiotiques (*Rhizobium*) et libres (*Azotobacter* et *Azospirillum*) en même temps que l'infection permettra de mettre en évidence si la disponibilité en azote par fixation joue un rôle sur la résistance et si les effets bénéfiques des microorganismes fixateurs d'azote peuvent être expliqués par leur effet sur la nutrition des plantes.

La réponse à toutes ces questions permettrait de générer des connaissances concernant les relations entre nutrition azotée, microorganismes bénéfiques et immunité des plantes. Des génotypes résistants en condition de nutrition azotée optimisée pourront être identifiés et des stratégies d'amélioration de la résistance en agissant sur les sources d'azote et la gestion de microorganismes bénéfiques pourront être proposées, ce qui participerait à la réduction des intrants.

Activités scientifiques

Publications

- **E. Thalineau**, HN. Truong, A. Berger, C. Fournier, A. Boscari, D. Wendehenne and S. Jeandroz. Cross-regulation between N metabolism and nitric oxide (NO) signaling during plant immunity. **Frontiers in Plant Science (2016)**
- HN. Truong, **E. Thalineau**, L. Bonneau, C. Fournier, S. Potin, S. Balzergue, D. van Tuinen, S. Jeandroz & D. Morandi. The *Medicago truncatula* hypermycorrhizal B9 mutant displays an altered response to phosphate and is more susceptible to *Aphanomyces euteiches*. **Plant, Cell and Environment (2015)**

Communications orales

1. Thalineau E, Fournier C, Wendehenne D, Truong HN, Jeandroz S. Effets de la nutrition azotée et du génotype de la plante sur la résistance de *Medicago truncatula* à *Aphanomyces euteiches*, 1^{ères} rencontres francophones des légumineuses, 31 Mai – 1^{er} Juin 2016, Dijon
2. Thalineau E, Fournier C, Wendehenne D, Truong HN, Jeandroz S. Effets de la nutrition et du génotype de la plante sur la résistance de *Medicago truncatula* à *Aphanomyces euteiches*. Journée des doctorants, Mars 2016, Dijon
3. Thalineau E. Interaction between *Medicago truncatula* and the pathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*: effects of nitrogen nutrition and plant genotype. 7^{èmes} journées des doctorants Santé des Plantes et Environnement, 1 – 3 Juillet 2015, Rennes
4. Thalineau E., Fournier C., Wendehenne D., Truong HN. et Jeandroz S. Interaction between *Medicago truncatula* and the pathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*: effects of nitrogen nutrition and plant genotype. International Symposium on Plant Signaling and Behavior, 29 – 30 Juin 2015, Paris

5. Thalineau E. Interaction between *Medicago truncatula* and the pathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*: effects of nitrogen nutrition and plant genotype. [Forum des jeunes chercheurs](#), 18 – 19 Juin 2015, Dijon

Communications affichées

1. Thalineau E., Fournier C, Wendehenne D, Truong HN, Jeandroz S. Effects of nitrogen nutrition and plant genotype on *Medicago truncatula* resistance against *Aphanomyces euteiches*. [Natural Products and Biocontrol](#), 21-23 Septembre 2016, Perpignan
2. Thalineau E., Fournier C, Wendehenne D, Truong HN, Jeandroz S. Effects of nitrogen nutrition and plant genotype on *Medicago truncatula* resistance against *Aphanomyces euteiches*. [EMBO conference: The nitrogen nutrition of plants](#), 22-26 Août 2016, Montpellier
3. Thalineau E., Fournier C, Wendehenne D, Truong HN, Jeandroz S. Effects of plant nutrition and genotype on *Medicago truncatula* defense responses against *Aphanomyces euteiches*. [The second Adam Kondorosi Symposium](#), 11-12 Décembre 2014, Gif sur Yvette
4. Truong HN., Thalineau E, Bonneau L, Fournier C, Potin S, Balzergue S, van Tuinen D, Jeandroz S, Morandi D. The *Medicago truncatula* hypermycorrhizal B9 mutant displays an altered response to phosphate and is more susceptible to *Aphanomyces euteiches*. [The second Adam Kondorosi Symposium](#), 11-12 Décembre 2014, Gif sur Yvette
5. Thalineau E, Fournier C, Wendehenne D, Jeandroz S, Truong-Cellier HN. Effects of plant nutrition and plant genotype on defense responses in *Medicago truncatula*. [Forum des jeunes chercheurs](#), 23-24 Juin 2014, Besançon
6. Thalineau Elise. Effet de la nutrition et du génotype sur les réponses de défense chez *Medicago truncatula*. [Journée des Doctorants](#), 24 Mars 2014, Dijon

Enseignements

3^{ème} année de thèse: 64 h d'enseignements en biologie végétale (L1)

- Travaux pratiques:
 - La structure primaire de la tige, de la feuille et de la racine des Angiospermes
 - La structure secondaire des Angiospermes et des Gymnospermes
 - Le développement du fruit

2^{ème} année de thèse: 64 h d'enseignements en biologie cellulaire (L1).

- Travaux dirigés:
 - Le cycle cellulaire
 - Les virus
- Travaux pratiques:
 - Noyau interphasique et division cellulaire chez les Eucaryotes
 - Méiose
 - Echanges d'eau et de substances dissoutes: diffusion et osmose

1^{ère} année de thèse: 32 h d'enseignements en biochimie (L1)

- Travaux pratiques:
 - Les acides aminés: analyse par électrophorèse et par chromatographie de partage sur couche mince
 - Les acides nucléiques: purification de plasmide et amplification

Formations

- Formations générales:
 - Logique de la thèse dans son environnement académique
 - Analyse de données
 - Initiation au logiciel R
 - TOEIC
 - Module de grammaire Anglais
 - Module de présentation professionnelle Anglais

- Formation préparant à l'insertion professionnelle:
 - Communication interpersonnelle et gestion d'équipe
 - Leadership et encadrement d'équipe
- Stages:
 - Formation à la transgénèse chez *M. truncatula* (UMR 1355 INRA Sophia Antipolis)
 - Formation au dosage par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse des acides aminés (UMR 6249 Chrono-environnement Montbéliard)

Co-encadrement d'étudiants

- **A. Berger (Master 2):** Liens entre le nitrate et le monoxyde d'azote dans la réponse immunitaire de *Medicago truncatula*.
- **C. Pitre (BTS):**
 - 1^{er} stage :** Caractérisation de la réponse à une carence en azote de quatre géotypes de *Medicago truncatula* présentant des degrés de résistance différents à l'agent pathogène *Aphanomyces euteiches* : dosages de nitrates, d'anthocyanes, de composés phénoliques solubles, et étude microscopique.
 - 2^{ème} stage :** Etude de l'homéostasie du NO dans différentes conditions (milieu complet ou carencé en nitrate) dans les racines de *M. truncatula* transformées ou non: dosages Bradford, de SNO, de l'activité GSNOR.
- **L. Milachon (BTS):** Validation des conditions de culture et analyse par PCR quantitative relative de l'impact de la nutrition et de l'inoculation par un agent pathogène sur l'expression de gènes chez *Medicago truncatula*.
- **J. Disson (BTS):** Impact de la nutrition sur la réponse de *M. truncatula* à l'élicitation et à *A. euteiches*: tests d'infection de *M. truncatula*, test ELISA, dosages des ROS et du NO.

RÉFÉRENCES

- Abello N, Kerstjens HAM, Postma DS & Bischoff R (2009) Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins. *J. Proteome Res.* **8**: 3222–3238
- Ahlfors R, Brosché M, Kollist H & Kangasjärvi J (2009) Nitric oxide modulates ozone-induced cell death, hormone biosynthesis and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **58**: 1–12
- Ahuja I, Kissen R & Bones AM (2012) Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci.* **17**: 73–90
- Albertos P, Romero-Puertas MC, Tatematsu K, Mateos I, Sánchez-Vicente I, Nambara E & Lorenzo O (2015) S-nitrosylation triggers ABI5 degradation to promote seed germination and seedling growth. *Nat. Commun.* **6**: 8669
- Alderman DJ (1996) Geographical spread of bacterial and fungal diseases of crustaceans. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* **15**: 603–632
- Ali GS & Reddy A (2008) PAMP-triggered immunity. *Plant Signal. Behav.* **3**: 423–426
- Allaway D, Lodwig EM, Crompton LA, Wood M, Parsons R, Wheeler TR & Poole PS (2000) Identification of alanine dehydrogenase and its role in mixed secretion of ammonium and alanine by pea bacteroids. *Mol. Microbiol.* **36**: 508–515
- Allen SE, Grimshaw HM, Parkinson JA & Quarmby C (1974) Chemical analysis of ecological materials. : x + 565pp.
- Apel K & Hirt H (2004) REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 373–399
- Apostol I, Heinsteinst PF & Low PS (1989) Rapid Stimulation of an Oxidative Burst during Elicitation of Cultured Plant Cells 1. *Plant Physiol.* **90**: 109–116
- Ashtamker C, Kiss V, Sagi M, Davydov O & Fluhr R (2007) Diverse Subcellular Locations of Cryptogein-Induced Reactive Oxygen Species Production in Tobacco Bright Yellow-2 Cells. *Plant Physiol.* **143**: 1817–1826
- Astier J, Kulik A, Koen E, Besson-Bard A, Bourque S, Jeandroz S, Lamotte O & Wendehenne D (2012) Protein S-nitrosylation: What's going on in plants? *Free Radic. Biol. Med.* **53**: 1101–1110
- Astier J & Lindermayr C (2012) Nitric oxide-dependent posttranslational modification in plants: an update. *Int. J. Mol. Sci.* **13**: 15193–15208
- Aubert S, Baligny R, Douce R, Gout E, Ratcliffe RG & Roberts JK (2001) Contribution of glutamate dehydrogenase to mitochondrial glutamate metabolism studied by ¹³C and ³¹P nuclear magnetic resonance. *J. Exp. Bot.* **52**: 37–45
- Badis Y, Bonhomme M, Lafitte C, Hugué S, Balzergue S, Dumas B & Jacquet C (2015) Transcriptome analysis highlights preformed defences and signalling pathways

- controlled by the prAe1 quantitative trait locus (QTL), conferring partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant Pathol.*: n/a-n/a
- Badreddine I, Lafitte C, Heux L, Skandalis N, Spanou Z, Martinez Y, Esquerré-Tugayé M-T, Bulone V, Dumas B & Bottin A (2008) Cell wall chitosaccharides are essential components and exposed patterns of the phytopathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Eukaryot. Cell* **7**: 1980–1993
- Badri DV, Loyola-Vargas VM, Du J, Stermitz FR, Broeckling CD, Iglesias-Andreu L & Vivanco JM (2008) Transcriptome analysis of *Arabidopsis* roots treated with signaling compounds: a focus on signal transduction, metabolic regulation and secretion. *New Phytol.* **179**: 209–223
- Bagchi R, Salehin M, Adeyemo OS, Salazar C, Shulaev V, Sherrier DJ & Dickstein R (2012) Functional assessment of the *Medicago truncatula* NIP/LATD protein demonstrates that it is a high-affinity nitrate transporter. *Plant Physiol.* **160**: 906–916
- Ballini E, Nguyen TT & Morel J-B (2013) Diversity and genetics of nitrogen-induced susceptibility to the blast fungus in rice and wheat. *Rice N. Y. N* **6**: 32
- Baudouin E, Pieuchot L, Engler G, Pauly N & Puppo A (2006) Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* functional nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **19**: 970–975
- Bayden AS, Yakovlev VA, Graves PR, Mikkelsen RB & Kellogg GE (2011) Factors influencing protein tyrosine nitration – structure-based predictive models. *Free Radic. Biol. Med.* **50**: 749–762
- Bécard G & Fortin JA (1988) Early events of vesicular–arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* **108**: 211–218
- Beck KF, Eberhardt W, Frank S, Huwiler A, Messmer UK, Muhl H & Pfeilschifter J (1999) Inducible NO synthase: role in cellular signalling. *J. Exp. Biol.* **202**: 645–653
- Begara-Morales JC, Chaki M, Sánchez-Calvo B, Mata-Pérez C, Leterrier M, Palma JM, Barroso JB & Corpas FJ (2013) Protein tyrosine nitration in pea roots during development and senescence. *J. Exp. Bot.* **64**: 1121–1134
- Begum AA, Leibovitch S, Migner P & Zhang F (2001) Specific flavonoids induced nod gene expression and pre-activated nod genes of *Rhizobium leguminosarum* increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. *J. Exp. Bot.* **52**: 1537–1543
- Belmondo S, Calcagno C, Genre A, Puppo A, Pauly N & Lanfranco L (2015) The *Medicago truncatula* *MtRbohE* gene is activated in arbusculated cells and is involved in root cortex colonization. *Planta* **243**: 251–262
- Benedito VA, Li H, Dai X, Wandrey M, He J, Kaundal R, Torres-Jerez I, Gomez SK, Harrison MJ, Tang Y, Zhao PX & Udvardi MK (2010) Genomic Inventory and Transcriptional Analysis of *Medicago truncatula* Transporters. *Plant Physiol.* **152**: 1716–1730

- Benhar M, Forrester MT & Stamler JS (2009) Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**: 721–732
- Bergelson J, Kreitman M, Stahl EA & Tian D (2001) Evolutionary dynamics of plant R-genes. *Science* **292**: 2281–2285
- Besson-Bard A, Courtois C, Gauthier A, Dahan J, Dobrowolska G, Jeandroz S, Pugin A & Wendehenne D (2008a) Nitric oxide in plants: production and cross-talk with Ca²⁺ signaling. *Mol. Plant* **1**: 218–228
- Besson-Bard A, Gravot A, Richaud P, Auroy P, Duc C, Gaymard F, Taconnat L, Renou J-P, Pugin A & Wendehenne D (2009) Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiol.* **149**: 1302–1315
- Besson-Bard A, Griveau S, Bedioui F & Wendehenne D (2008b) Real-time electrochemical detection of extracellular nitric oxide in tobacco cells exposed to cryptogein, an elicitor of defence responses. *J. Exp. Bot.* **59**: 3407–3414
- Besson-Bard A, Pugin A & Wendehenne D (2008c) New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 21–39
- Bethke PC, Badger MR & Jones RL (2004) Apoplastic Synthesis of Nitric Oxide by Plant Tissues. *Plant Cell* **16**: 332–341
- Bethke PC, Libourel IGL, Reinöhl V & Jones RL (2006) Sodium nitroprusside, cyanide, nitrite, and nitrate break *Arabidopsis* seed dormancy in a nitric oxide-dependent manner. *Planta* **223**: 805–812
- Bieker S & Zentgraf U (2013) Plant Senescence and Nitrogen Mobilization and Signaling. In *Senescence and Senescence-Related Disorders*, Zhiwei W (ed) InTech
- Blachinski D, Shtienberg D, Dinoor A, Kafkafi U, Sujkowski LS, Zitter TA & Fry WE (1996) Influence of foliar application of nitrogen and potassium on *Alternaria* diseases in potato, tomato and cotton. *Phytoparasitica* **24**: 281
- Blondon F, Marie D, Brown S & Kondorosi A (1994) Genome size and base composition in *Medicago sativa* and *M. truncatula* species. *Genome* **37**: 264–270
- Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, Bécard G, Rosenberg C & Barker DG (2001) *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **14**: 695–700
- Bolton MD & Thomma BPHJ (2008) The complexity of nitrogen metabolism and nitrogen-regulated gene expression in plant pathogenic fungi. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **72**: 104–110
- Bonhomme M, André O, Badis Y, Ronfort J, Burgarella C, Chantret N, Prosperi J-M, Briskine R, Mudge J, Debéllé F, Navier H, Miteul H, Hajri A, Baranger A, Tiffin P, Dumas B, Pilet-Nayel M-L, Young ND & Jacquet C (2014) High-density genome-wide

- association mapping implicates an F-box encoding gene in *Medicago truncatula* resistance to *Aphanomyces euteiches*. *New Phytol.* **201**: 1328–1342
- Bonnefoy N. Rapport d'information fait au nom de la mission commune d'information sur les pesticides et leur impact sur la santé et l'environnement. N°42 Sénat. Session ordinaire de 2012-2013. Enregistré à la présidence du Sénat le 10 octobre 2012.
- Boscari A, del Giudice J, Ferrarini A, Venturini L, Zaffini A-L, Delledonne M & Puppo A (2013) Expression Dynamics of the *Medicago truncatula* Transcriptome during the Symbiotic Interaction with *Sinorhizobium meliloti*: Which Role for Nitric Oxide?. *Plant Physiol.* **161**: 425–439
- Bradley DJ, Kjellbom P & Lamb CJ (1992) Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* **70**: 21–30
- Breullin-Sessoms F, Floss DS, Gomez SK, Pumplin N, Ding Y, Levesque-Tremblay V, Noar RD, Daniels DA, Bravo A, Eaglesham JB, Benedito VA, Udvardi MK & Harrison MJ (2015) Suppression of Arbuscule Degeneration in *Medicago truncatula* phosphate transporter4 Mutants Is Dependent on the Ammonium Transporter 2 Family Protein AMT2;3. *Plant Cell*: tpc.114.131144
- Buchanan BB., Gruissem W., Jones RL. 2000 Biochemistry and molecular biology of plants, Second Edition
- Bücking H & Kafle A (2015) Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Nitrogen Uptake of Plants: Current Knowledge and Research Gaps. *Agronomy* **5**: 587–612
- Caddick MX, Arst HN, Taylor LH, Johnson RI & Brownlee AG (1986) Cloning of the regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* **5**: 1087–1090
- Calcagno C, Novero M, Genre A, Bonfante P & Lanfranco L (2012) The exudate from an arbuscular mycorrhizal fungus induces nitric oxide accumulation in *Medicago truncatula* roots. *Mycorrhiza* **22**: 259–269
- Camañes G, Pastor V, Cerezo M, García-Andrade J, Vicedo B, García-Agustín P & Flors V (2012a) A deletion in NRT2.1 attenuates *Pseudomonas syringae*-induced hormonal perturbation, resulting in primed plant defenses. *Plant Physiol.* **158**: 1054–1066
- Camañes G, Victoria P, Cerezo M, García-Agustín P & Flors V (2012b) A deletion in the nitrate high affinity transporter NRT2.1 alters metabolomic and transcriptomic responses to *Pseudomonas syringae*. *Plant Signal. Behav.* **7**: 619–622
- Camargo JA & Alonso A (2006) Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environ. Int.* **32**: 831–849
- Cantrel C, Vazquez T, Puyaubert J, Rezé N, Lesch M, Kaiser WM, Dutilleul C, Guillas I, Zachowski A & Baudouin E (2011) Nitric oxide participates in cold-responsive phosphosphingolipid formation and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* **189**: 415–427

- Carimi F, Zottini M, Costa A, Cattelan I, De Michele R, Terzi M & Lo Schiavo F (2005) NO signalling in cytokinin-induced programmed cell death. *Plant Cell Environ.* **28**: 1171–1178
- Carley H E 1969 Factors affecting the epidemiology of pea (*Pisum sativum*L.) root rot caused by *Aphanomyces euteiches* Drechs. Ph D Thesis University of Minnesota, St. Paul, MN. 120 p.
- Carlström M, Liu M, Yang T, Zollbrecht C, Huang L, Peleli M, Borniquel S, Kishikawa H, Hezel M, Persson AEG, Weitzberg E & Lundberg JO (2015) Cross-talk Between Nitrate-Nitrite-NO and NO Synthase Pathways in Control of Vascular NO Homeostasis. *Antioxid. Redox Signal.* **23**: 295–306
- Carvalho H, Lescure N, Billy F de, Chabaud M, Lima L, Salema R & Cullimore J (2000a) Cellular expression and regulation of the *Medicago truncatula* cytosolic glutamine synthetase genes in root nodules. *Plant Mol. Biol.* **42**: 741–756
- Carvalho H, Lima L, Lescure N, Camut S, Salema R & Cullimore J (2000b) Differential expression of the two cytosolic glutamine synthetase genes in various organs of *Medicago truncatula*. *Plant Sci.* **159**: 301–312
- Castillo M-C, Lozano-Juste J, González-Guzmán M, Rodríguez L, Rodríguez PL & León J (2015) Inactivation of PYR/PYL/RCAR ABA receptors by tyrosine nitration may enable rapid inhibition of ABA signaling by nitric oxide in plants. *Sci Signal* **8**: ra89-ra89
- Cecconi D, Orzetti S, Vandelle E, Rinalducci S, Zolla L & Delledonne M (2009) Protein nitration during defense response in *Arabidopsis thaliana*. *ELECTROPHORESIS* **30**: 2460–2468
- Chaki M, Shekariesfahlan A, Ageeva A, Mengel A, von Toerne C, Durner J & Lindermayr C (2015) Identification of nuclear target proteins for S-nitrosylation in pathogen-treated *Arabidopsis thaliana* cell cultures. *Plant Sci.* **238**: 115–126
- Chardon F, Noël V & Masclaux-Daubresse C (2012) Exploring NUE in crops and in *Arabidopsis* ideotypes to improve yield and seed quality. *J. Exp. Bot.*: err353
- Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JDG, Felix G & Boller T (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**: 497–500
- Choi H-K, Mun J-H, Kim D-J, Zhu H, Baek J-M, Mudge J, Roe B, Ellis N, Doyle J, Kiss GB, Young ND & Cook DR (2004) Estimating genome conservation between crop and model legume species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 15289–15294
- Cohen YR (2002) β -aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens. *Plant Dis.* **86**: 448–457
- Colditz F, Braun H-P, Jacquet C, Niehaus K & Krajinski F (2005) Proteomic Profiling Unravels Insights into the Molecular Background Underlying Increased *Aphanomyces euteiches*. *Plant Mol. Biol.* **59**: 387–406

- Colditz F, Niehaus K & Krajinski F (2007) Silencing of PR-10-like proteins in *Medicago truncatula*. *Planta* **226**: 57–71
- Colditz F, Nyamsuren O, Niehaus K, Eubel H, Braun H-P & Krajinski F (2004) Proteomic approach: identification of *Medicago truncatula* proteins induced in roots after infection with the pathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Plant Mol. Biol.* **55**: 109–120
- Conrath U, Pieterse CM & Mauch-Mani B (2002) Priming in plant–pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* **7**: 210–216
- Copeland C, Woloshen V, Huang Y & Li X (2016) AtCDC48A is involved in the turnover of an NLR immune receptor. *Plant J.*
- Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Valderrama R, Palma JM, León AM, Sandalio LM & del Río LA (2006) Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta* **224**: 246–254
- Corpas FJ, Chaki M, Fernández-Ocaña A, Valderrama R, Palma JM, Carreras A, Begara-Morales JC, Airaki M, del Río LA & Barroso JB (2008) Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant Cell Physiol.* **49**: 1711–1722
- Corpas FJ, Palma JM, Del Río LA & Barroso JB (2009) Evidence supporting the existence of l-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytol.* **184**: 9–14
- Correa-Aragunde N, Cejudo FJ & Lamattina L (2015) Nitric oxide is required for the auxin-induced activation of NADPH-dependent thioredoxin reductase and protein denitrosylation during root growth responses in *Arabidopsis*. *Ann. Bot.* **116**: 695–702
- Coruzzi GM (2003) Primary N-assimilation into Amino Acids in *Arabidopsis*. *Arab. Book Am. Soc. Plant Biol.*
- Crane BR, Sudhamsu J & Patel BA (2010) Bacterial nitric oxide synthases. *Annu. Rev. Biochem.* **79**: 445–470
- Crawford NM (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* **7**: 859–868
- Crawford NM & Forde BG (2002) Molecular and Developmental Biology of Inorganic Nitrogen Nutrition. *Arab. Book Am. Soc. Plant Biol.*
- Cutruzzolà F (1999) Bacterial nitric oxide synthesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1411**: 231–249
- Huber DM & Watson RD (1974) Nitrogen Form and Plant Disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **12**: 139–165
- Das AK & Mitra DK (1993) The effect of little leaf disease on nitrogen metabolism in brinjal. *Int. J. Trop. Plant Dis.* **11**: 196
- De Faria SM, Lewis GP, Sprent JI & Sutherland JM (1989) Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *New Phytol.* **111**: 607–619

- De Virgilio C & Loewith R (2006) Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. *Oncogene* **25**: 6392–6415
- Dechorgnat J, Patrit O, Krapp A, Fagard M & Daniel-Vedele F (2012) Characterization of the Nrt2.6 Gene in *Arabidopsis thaliana*: A Link with Plant Response to Biotic and Abiotic Stress. *PLoS ONE*
- Deeb RS, Nuriel T, Cheung C, Summers B, Lamon BD, Gross SS & Hajjar DP (2013) Characterization of a cellular denitrase activity that reverses nitration of cyclooxygenase. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **305**: H687-698
- Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward E & Ryals J (1994) A central role of salicylic Acid in plant disease resistance. *Science* **266**: 1247–1250
- Delay C, Imin N & Djordjevic MA (2013) CEP genes regulate root and shoot development in response to environmental cues and are specific to seed plants. *J. Exp. Bot.* **64**: 5383–5394
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA & Lamb C (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585–588
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A & Lamb C (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 13454–13459
- Deslandes L, Olivier J, Theulieres F, Hirsch J, Feng DX, Bittner-Eddy P, Beynon J & Marco Y (2002) Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 2404–2409
- Diers AR, Keszler A & Hogg N (2014) Detection of S-Nitrosothiols. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**: 892–900
- Dietrich R, Ploss K & Heil M (2004) Constitutive and induced resistance to pathogens in *Arabidopsis thaliana* depends on nitrogen supply. *Plant Cell Environ.* **27**: 896–906
- Djéballi N, Aribi S, Taamalli W, Arraouadi S, Aouani ME & Badri M (2012) Natural variation of *Medicago truncatula* resistance to *Aphanomyces euteiches*. *Eur. J. Plant Pathol.* **135**: 831–843
- Djéballi N, Jauneau A, Ameline-Torregrosa C, Chardon F, Jaulneau V, Mathé C, Bottin A, Cazaux M, Pilet-Nayel M-L, Baranger A, Aouani ME, Esquerré-Tugayé M-T, Dumas B, Huguet T & Jacquet C (2009) Partial Resistance of *Medicago truncatula* to *Aphanomyces euteiches* Is Associated with Protection of the Root Stele and Is Controlled by a Major QTL Rich in Proteasome-Related Genes. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **22**: 1043–1055
- Djéballi N, Mhadhbi H, Lafitte C, Dumas B, Esquerré-Tugayé M-T, Aouani ME & Jacquet C (2011) Hydrogen peroxide scavenging mechanisms are components of *Medicago truncatula* partial resistance to *Aphanomyces euteiches*. *Eur. J. Plant Pathol.* **131**: 559–571

- Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti A-M, Teh T, Wang C-IA, Ayliffe MA, Kobe B & Ellis JG (2006) Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 8888–8893
- Dordas C (2008) Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **28**: 33–46
- Dordas C, Hasinoff BB, Igamberdiev AU, Manac'h N, Rivoal J & Hill RD (2003) Expression of a stress-induced hemoglobin affects NO levels produced by alfalfa root cultures under hypoxic stress. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **35**: 763–770
- Doyle JJ & Luckow MA (2003) The Rest of the Iceberg. Legume Diversity and Evolution in a Phylogenetic Context. *Plant Physiol.* **131**: 900–910
- Durner J, Wendehenne D & Klessig DF (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 10328–10333
- Ellis J, Dodds P & Pryor T (2000) Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**: 278–284
- Engelsdorf T, Horst RJ, Pröls R, Pröschel M, Dietz F, Hückelhoven R & Voll LM (2013) Reduced carbohydrate availability enhances the susceptibility of *Arabidopsis* toward *Colletotrichum higginsianum*. *Plant Physiol.* **162**: 225–238
- Evans, L.T., 1998. Feeding the ten billion, Cambridge, UK, Cambridge University Press
- Erzberger JP & Berger JM (2006) Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **35**: 93–114
- Fabro G, Kovács I, Pavet V, Szabados L & Alvarez ME (2004) Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **17**: 343–350
- Fagard M, Launay A, Clément G, Courtial J, Dellagi A, Farjad M, Krapp A, Soulié M-C & Masclaux-Daubresse C (2014) Nitrogen metabolism meets phytopathology. *J. Exp. Bot.*
- Fan H, Cai Y, Xie P, Xiao W, Chen J, Ji W & Zhao S (2014) Microcystin-LR stabilizes c-myc protein by inhibiting protein phosphatase 2A in HEK293 cells. *Toxicology* **319**: 69–74
- Feechan A, Kwon E, Yun B, Liu Y, Pallas J & Loake G (2005) A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 8054–8059
- Felix G, Duran JD, Volko S & Boller T (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **18**: 265–276
- Ferrarini A, De Stefano M, Baudouin E, Pucciariello C, Polverari A, Puppo A & Delledonne M (2008) Expression of *Medicago truncatula* Genes Responsive to Nitric Oxide in Pathogenic and Symbiotic Conditions. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **21**: 781–790

- Fester T & Hause G (2005) Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. *Mycorrhiza* **15**: 373–379
- Finnemann J & Schjoerring JK (2000) Post-translational regulation of cytosolic glutamine synthetase by reversible phosphorylation and 14-3-3 protein interaction. *Plant J.* **24**: 171–181
- Flor H.H. (1942). Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology*, vol. 32, p.653–669.
- Ford P. C. (2010). Reactions of NO and nitrite with heme models and proteins. *Inorg. Chem.* **49** 6226–6239
- Forde BG (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1465**: 219–235
- Forde BG (2002) Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**: 203–224
- Forde BG (2014) Nitrogen signalling pathways shaping root system architecture: an update. *Curr. Opin. Plant Biol.* **21**: 30–36
- Foresi N, Correa-Aragunde N, Parisi G, Caló G, Salerno G & Lamattina L (2010) Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cell* **22**: 3816–3830
- Foyer CH, Lam H-M, Nguyen HT, Siddique KHM, Varshney RK, Colmer TD, Cowling W, Bramley H, Mori TA, Hodgson JM, Cooper JW, Miller AJ, Kunert K, Vorster J, Cullis C, Ozga JA, Wahlqvist ML, Liang Y, Shou H, Shi K, et al (2016) Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. *Nat. Plants* **2**: 16112
- Foyer CH, Parry M & Noctor G (2003) Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. *J. Exp. Bot.* **54**: 585–593
- Franken P, Donges K, Grunwald U, Kost G, Rexer K-H, Tamasloukht M, Waschke A & Zeuske D (2007) Gene expression analysis of arbuscule development and functioning. *Phytochemistry* **68**: 68–74
- Frendo P, Gallesi D, Turnbull R, Van de Sype G, Hérouart D & Puppo A (1999) Localisation of glutathione and homogluthathione in *Medicago truncatula* is correlated to a differential expression of genes involved in their synthesis. *Plant J.* **17**: 215–219
- Frendo P, Harrison J, Norman C, Hernández Jiménez MJ, Van de Sype G, Gilabert A & Puppo A (2005) Glutathione and homogluthathione play a critical role in the nodulation process of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **18**: 254–259
- Fritz C, Palacios-Rojas N, Feil R & Stitt M (2006) Regulation of secondary metabolism by the carbon-nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **46**: 533–548

- Gamir J, Pastor V, Kaefer A, Cerezo M & Flors V (2014) Targeting novel chemical and constitutive primed metabolites against *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **78**: 227–240
- Gan Y, Stulen I, van KEULEN H & Kuiper PJC (2002) Physiological changes in soybean (*Glycine max*) Wuyin9 in response to N and P nutrition. *Ann. Appl. Biol.* **140**: 319–329
- Gansel X, Muñoz S, Tillard P & Gojon A (2001) Differential regulation of the NO₃⁻ and NH₄⁺ transporter genes AtNrt2.1 and AtAmt1.1 in *Arabidopsis*: relation with long-distance and local controls by N status of the plant. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **26**: 143–155
- Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D & Pugin A (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **19**: 711–724
- Garcia-Mata C, Gay R, Sokolovski S, Hills A, Lamattina L & Blatt MR (2003) Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 11116–11121
- Garcia-Mata C & Lamattina L (2002) Nitric Oxide and Abscisic Acid Cross Talk in Guard Cells. *Plant Physiol.* **128**: 790–792
- Gaulin E, Jacquet C, Bottin A & Dumas B (2007) Root rot disease of legumes caused by *Aphanomyces euteiches*. *Mol. Plant Pathol.* **8**: 539–548
- Gaulin E, Madoui M-A, Bottin A, Jacquet C, Mathé C, Couloux A, Wincker P & Dumas B (2008) Transcriptome of *Aphanomyces euteiches*: New Oomycete Putative Pathogenicity Factors and Metabolic Pathways. *PLOS ONE* **3**: e1723
- Gauthier A, Lamotte O, Reboutier D, Bouteau F, Pugin A & Wendehenne D (2007) Cryptogein-Induced Anion Effluxes. *Plant Signal. Behav.* **2**: 86–95
- Gazzarrini S, Lejay L, Gojon A, Ninnemann O, Frommer WB & Wirén N von (1999) Three Functional Transporters for Constitutive, Diurnally Regulated, and Starvation-Induced Uptake of Ammonium into *Arabidopsis* Roots. *Plant Cell* **11**: 937–947
- Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF & Young ND (2005) Legumes as a Model Plant Family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. *Plant Physiol.* **137**: 1228–1235
- Gibbs DJ, Md Isa N, Movahedi M, Lozano-Juste J, Mendiondo GM, Berckhan S, Marín-de la Rosa N, Vicente Conde J, Sousa Correia C, Pearce SP, Bassel GW, Hamali B, Talloji P, Tomé DFA, Coego A, Beynon J, Alabadí D, Bachmair A, León J, Gray JE, et al (2014) Nitric Oxide Sensing in Plants Is Mediated by Proteolytic Control of Group VII ERF Transcription Factors. *Mol. Cell* **53**: 369–379
- Gilbert, G. (2003) Biologie d'*Aphanomyces*, oomycète responsable de la pourriture des racines du pois. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, Québec.

- del Giudice J, Cam Y, Damiani I, Fung-Chat F, Meilhoc E, Bruand C, Brouquisse R, Puppo A & Boscardi A (2011) Nitric oxide is required for an optimal establishment of the *Medicago truncatula*–*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *New Phytol.* **191**: 405–417
- Glass, A. D. M. and Siddiqi, M. Y. (1995): Nitrogen Absorption by Plant Roots; In H. S. Srivastava and R. P. Singh (ed.): Nitrogen Nutrition in Higher Plants. Associated Pub. Co. New Delhi, pp. 21±56.
- Gómez-Gómez L, Felix G & Boller T (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **18**: 277–284
- Good AG, Shrawat AK & Muench DG (2004) Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends Plant Sci.* **9**: 597–605
- Gould KS, Lamotte O, Klinguer A, Pugin A & Wendehenne D (2003) Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant Cell Environ.* **26**: 1851–1862
- Govindarajulu M, Pfeffer PE, Jin H, Abubaker J, Douds DD, Allen JW, Bücking H, Lammers PJ & Shachar-Hill Y (2005) Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* **435**: 819–823
- Gow A, Doctor A, Mannick J & Gaston B (2007) S-Nitrosothiol measurements in biological systems. *J. Chromatogr. B* **851**: 140–151
- Groß F, Durner J & Gaupels F (2013) Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Front. Plant Sci.* **4**: 419
- Grün S, Lindermayr C, Sell S & Durner J (2006) Nitric oxide and gene regulation in plants. *J. Exp. Bot.* **57**: 507–516
- Guo F-Q & Crawford NM (2005) *Arabidopsis* nitric oxide synthase I is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell* **17**: 3436–3450
- Gupta KJ, Brotman Y, Segu S, Zeier T, Zeier J, Persijn ST, Cristescu SM, Harren FJM, Bauwe H, Fernie AR, Kaiser WM & Mur LAJ (2013) The form of nitrogen nutrition affects resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in tobacco. *J. Exp. Bot.* **64**: 553–568
- Gupta KJ, Fernie AR, Kaiser WM & van Dongen JT (2011a) On the origins of nitric oxide. *Trends Plant Sci.* **16**: 160–168
- Gupta KJ, Hebelstrup KH, Mur LAJ & Igamberdiev AU (2011b) Plant hemoglobins: Important players at the crossroads between oxygen and nitric oxide. *FEBS Lett.* **585**: 3843–3849
- Hahlbrock K, Scheel D, Logemann E, Nürnberger T, Parniske M, Reinold S, Sacks WR & Schmelzer E (1995) Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 4150–4157
- Hammerschmidt R (1999) PHYTOALEXINS: What Have We Learned After 60 Years? *Annu. Rev. Phytopathol.* **37**: 285–306

- Hanafy KA, Krumenacker JS & Murad F (2001) NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **7**: 801–819
- Harper JE & Gibson AH (1984) Differential Nodulation Tolerance to Nitrate Among Legume Species. *Crop Sci.* **24**: 797
- He Y, Tang R-H, Hao Y, Stevens RD, Cook CW, Ahn SM, Jing L, Yang Z, Chen L, Guo F, Fiorani F, Jackson RB, Crawford NM & Pei Z-M (2004) Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* **305**: 1968–1971
- Hess DT, Matsumoto A, Kim S-O, Marshall HE & Stamler JS (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 150–166
- Hirel B & Lea PJ (2001) Ammonia Assimilation. In *Plant Nitrogen*, Lea PDPJ & Morot-Gaudry J-F (eds) pp 79–99. Springer Berlin Heidelberg
- Hirsch AM, Lum MR & Downie JA (2001) What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiol.* **127**: 1484–1492
- Hoffland E, Jeger MJ & Beusichem ML van (2000) Effect of nitrogen supply rate on disease resistance in tomato depends on the pathogen. *Plant Soil* **218**: 239–247
- Horchani F, Prevot M, Boscari A, Evangelisti E, Meilhoc E, Bruand C, Raymond P, Boncompagni E, Aschi-Smiti S, Puppo A & Brouquisse R (2011) Both Plant and Bacterial Nitrate Reductases Contribute to Nitric Oxide Production in *Medicago truncatula* Nitrogen-Fixing Nodules. *PLANT Physiol.* **155**: 1023–1036
- Horst RJ, Zeh C, Saur A, Sonnewald S, Sonnewald U & Voll LM (2012) The *Ustilago maydis* Nit2 homolog regulates nitrogen utilization and is required for efficient induction of filamentous growth. *Eukaryot. Cell* **11**: 368–380
- Hosseini S, Elfstrand M, Heyman F, Funck Jensen D & Karlsson M (2015) Deciphering common and specific transcriptional immune responses in pea towards the oomycete pathogens *Aphanomyces euteiches* and *Phytophthora pisi*. *BMC Genomics* **16**: 627
- Huber DM (1980) The role of mineral nutrition in defense. In: Horsfall JG, Cowling EB (eds) *Plant disease : an advanced treatise ; vol 5: how plants defend themselves*. New York : Academic Press, pp 381-406
- Huber DM, Graham RD (1999) The role of nutrition in crop resistance and tolerance to diseases. In: Rengel Z (ed) *Mineral nutrition of crops: fundamental mechanisms and implications*. New York : Food Products Press, pp 169-206
- Hückelhoven R (2007) Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* **45**: 101–127
- Hughes TJ & Grau CR (2007) *Aphanomyces* root rot or common root rot of legumes. *Plant Health Instr.*
- Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Dominguez H & Robert-Baudouy J (1992) Environmental conditions affect transcription of the pectinase genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* **174**: 7807–7818

- Huot B, Yao J, Montgomery BL & He SY (2014) Growth–Defense Tradeoffs in Plants: A Balancing Act to Optimize Fitness. *Mol. Plant* **7**: 1267–1287
- Hwang IS, An SH & Hwang BK (2011) Pepper asparagine synthetase 1 (CaAS1) is required for plant nitrogen assimilation and defense responses to microbial pathogens. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **67**: 749–762
- Igamberdiev AU & Hill RD (2004) Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation to hypoxia: an alternative to classic fermentation pathways. *J. Exp. Bot.* **55**: 2473–2482
- Igamberdiev AU, Stoimenova M, Seregélyes C & Hill RD (2006) Class-1 hemoglobin and antioxidant metabolism in alfalfa roots. *Planta* **223**: 1041–1046
- Imin N, Mohd-Radzman NA, Ogilvie HA & Djordjevic MA (2013) The peptide-encoding CEP1 gene modulates lateral root and nodule numbers in *Medicago truncatula*. *J. Exp. Bot.* **64**: 5395–5409
- Ischiropoulos H (2003) Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**: 776–783
- Javot H, Penmetsa RV, Breuillin F, Bhattarai KK, Noar RD, Gomez SK, Zhang Q, Cook DR & Harrison MJ (2011) *Medicago truncatula* mtpt4 mutants reveal a role for nitrogen in the regulation of arbuscule degeneration in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **68**: 954–965
- Jeandroz S, Lamotte O, Astier J, Rasul S, Trapet P, Besson-Bard A, Bourque S, Nicolas-Francès V, Ma W, Berkowitz GA & Wendehenne D (2013) There's more to the picture than meets the eye: nitric oxide cross talk with Ca²⁺ signaling. *Plant Physiol.* **163**: 459–470
- Jeandroz S, Wipf D, Stuehr DJ, Lamattina L, Melkonian M, Tian Z, Zhu Y, Carpenter EJ, Wong GK-S & Wendehenne D (2016) Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase–like proteins in the plant kingdom. *Sci Signal* **9**: re2-re2
- Jeady C, Ruffel S, Freixes S, Tillard P, Santoni AL, Morel S, Journet E-P, Duc G, Gojon A, Lepetit M & Salon C (2010) Adaptation of *Medicago truncatula* to nitrogen limitation is modulated via local and systemic nodule developmental responses. *New Phytol.* **185**: 817–828
- Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP & Valent B (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* **19**: 4004–4014
- Jones FR & Drechsler C (1925) Boot rot of Peas in the United States caused by *Aphanomyces euteiches* (n. sp.). *Journ Agric Res* **30**: 4293–325
- Jones JDG & Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329
- Jubault M, Hamon C, Gravot A, Lariagon C, Delourme R, Bouchereau A & Manzanares-Dauleux MJ (2008) Differential Regulation of Root Arginine Catabolism and Polyamine Metabolism in Clubroot-Susceptible and Partially Resistant *Arabidopsis* Genotypes. *Plant Physiol.* **146**: 2008–2019

- Julier B, Huguet T, Chardon F, Ayadi R, Pierre J-B, Prosperi J-M, Barre P & Huyghe C (2007) Identification of quantitative trait loci influencing aerial morphogenesis in the model legume *Medicago truncatula*. *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* **114**: 1391–1406
- Kachroo A & Robin GP (2013) Systemic signaling during plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**: 527–533
- Kan C-C, Chung T-Y, Juo Y-A & Hsieh M-H (2015) Glutamine rapidly induces the expression of key transcription factor genes involved in nitrogen and stress responses in rice roots. *BMC Genomics* **16**: 731
- Karimi M, Inzé D & Depicker A (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* **7**: 193–195
- Kato Y, Yamamoto Y, Murakami S & Sato F (2005) Post-translational regulation of CND41 protease activity in senescent tobacco leaves. *Planta* **222**: 643–651
- Khan MIR, Trivellini A, Fatma M, Masood A, Francini A, Iqbal N, Ferrante A & Khan NA (2015) Role of ethylene in responses of plants to nitrogen availability. *Plant Nutr.*: 927
- Kim DY, Hong MJ & Seo YW (2014) Role of wheat trHb in nitric oxide scavenging. *Mol. Biol. Rep.* **41**: 5931–5941
- Kjøller R & Rosendahl S (1998) Enzymatic Activity of the Mycelium Compared with Oospore Development During Infection of Pea Roots by *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology* **88**: 992–996
- Klepper L (1979) Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂) emissions from herbicide-treated soybean plants. *Atmospheric Environ.* **13**: 537–542
- Kneeshaw S, Gelineau S, Tada Y, Loake GJ & Spoel SH (2014) Selective Protein Denitrosylation Activity of Thioredoxin-h5 Modulates Plant Immunity. *Mol. Cell* **56**: 153–162
- Kouassi M de (2001) La lutte biologique : une alternative viable à l'utilisation des pesticides? *VertigO - Rev. Électronique En Sci. Environ.*
- Kovacs I, Durner J & Lindermayr C (2015) Crosstalk between nitric oxide and glutathione is required for NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1 (NPR1)-dependent defense signaling in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* **208**: 860–872
- Krapp A (2015) Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Curr. Opin. Plant Biol.* **25**: 115–122
- Krapp A, Berthomé R, Orsel M, Mercey-Boutet S, Yu A, Castaings L, Elftieh S, Major H, Renou J-P & Daniel-Vedele F (2011) *Arabidopsis* Roots and Shoots Show Distinct Temporal Adaptation Patterns toward Nitrogen Starvation. *Plant Physiol.* **157**: 1255–1282

- Krouk G, Mirowski P, LeCun Y, Shasha DE & Coruzzi GM (2010) Predictive network modeling of the high-resolution dynamic plant transcriptome in response to nitrate. *Genome Biol.* **11**: R123
- Kruse C, Haas FH, Jost R, Reiser B, Reichelt M, Wirtz M, Gershenzon J, Schnug E & Hell R (2012) Improved sulfur nutrition provides the basis for enhanced production of sulfur-containing defense compounds in *Arabidopsis thaliana* upon inoculation with *Alternaria brassicicola*. *J. Plant Physiol.* **169**: 740–743
- Kruse C, Jost R, Lipschis M, Kopp B, Hartmann M & Hell R (2007) Sulfur-enhanced defence: effects of sulfur metabolism, nitrogen supply, and pathogen lifestyle. *Plant Biol. Stuttg. Ger.* **9**: 608–619
- Kulik A, Noirot E, Grandperret V, Bourque S, Fromentin J, Salloignon P, Truntzer C, Dobrowolska G, Simon-Plas F & Wendehenne D (2015) Interplays between nitric oxide and reactive oxygen species in cryptogeiin signalling. *Plant Cell Environ.* **38**: 331–348
- Kumar D & Klessig DF (2000) Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **13**: 347–351
- Lamb C & Dixon RA (1997) THE OXIDATIVE BURST IN PLANT DISEASE RESISTANCE. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 251–275
- Lanquar V, Loqué D, Hörmann F, Yuan L, Bohner A, Engelsberger WR, Lalonde S, Schulze WX, von Wirén N & Frommer WB (2009) Feedback inhibition of ammonium uptake by a phospho-dependent allosteric mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 3610–3622
- Lawton KA, Friedrich L, Hunt M, Weymann K, Delaney T, Kessmann H, Staub T & Ryals J (1996) Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **10**: 71–82
- Laxalt AM, Raho N, Have A ten & Lamattina L (2007) Nitric Oxide Is Critical for Inducing Phosphatidic Acid Accumulation in Xylanase-elicited Tomato Cells. *J. Biol. Chem.* **282**: 21160–21168
- Le Signor C, Savoie V, Aubert G, Verdier J, Nicolas M, Pagny G, Moussy F, Sanchez M, Baker D, Clarke J & Thompson R (2009) Optimizing TILLING populations for reverse genetics in *Medicago truncatula*. *Plant Biotechnol. J.* **7**: 430–441
- Lea US, Slimestad R, Smedvig P & Lillo C (2006) Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta* **225**: 1245–1253
- Lecointre G. et Le Guyader H. 2006, Classification phylogénétique du vivant, troisième édition, augmentée et corrigée. Belin, ISBN 2701142733
- Lecompte F, Abro MA & Nicot PC (2010) Contrasted responses of *Botrytis cinerea* isolates developing on tomato plants grown under different nitrogen nutrition regimes. *Plant Pathol.* **59**: 891–899

- Lei L, Li Y, Wang Q, Xu J, Chen Y, Yang H & Ren D (2014) Activation of MKK9-MPK3/MPK6 enhances phosphate acquisition in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* **203**: 1146–1160
- Lejay L, Gansel X, Cerezo M, Tillard P, Müller C, Krapp A, von Wirén N, Daniel-Vedele F & Gojon A (2003) Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase. *Plant Cell* **15**: 2218–2232
- Lejay L, Tillard P, Lepetit M, Olive F d, Filleur S, Daniel-Vedele F & Gojon A (1999) Molecular and functional regulation of two NO₃⁻ uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **18**: 509–519
- Lepoivre P., 2003. « Phytopathologie Fondements biologiques et moléculaires des pathosystèmes et stratégies de lutte. » De Boeck Université (Bruxelles) 426 pp. (ouvrage collectif)
- Levenfors J (2003) Soil-borne pathogens in intensive legume cropping: *Aphanomyces spp.* and root rots.
- Li CY, Lu KC, Trappe JM & Bollen WB (1967) Selective Nitrogen Assimilation by *Poria weirii*. *Nature* **213**: 814–814
- Liaudet L, Vassalli G & Pacher P (2009) Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **14**: 4809–4814
- Lindermayr C & Durner J (2009) S-Nitrosylation in plants: pattern and function. *J. Proteomics* **73**: 1–9
- Lindermayr C, Sell S, Müller B, Leister D & Durner J (2010) Redox Regulation of the NPR1-TGA1 System of *Arabidopsis thaliana* by Nitric Oxide. *Plant Cell* **22**: 2894–2907
- Liu G, Ji Y, Bhuiyan NH, Pilot G, Selvaraj G, Zou J & Wei Y (2010) Amino acid homeostasis modulates salicylic acid-associated redox status and defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**: 3845–3863
- Liu KH, Huang CY & Tsay YF (1999) CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake. *Plant Cell* **11**: 865–874
- Liu Y & Zhang S (2004) Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 3386–3399
- Liu X, Zhang S, Whitworth RJ, Stuart JJ & Chen M-S (2015) Unbalanced activation of glutathione metabolic pathways suggests potential involvement in plant defense against the gall midge *Mayetiola destructor* in wheat. *Sci. Rep.* **5**: 8092
- Loon LC van, Rep M & Pieterse CMJ (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **44**: 135–162
- López-Berges MS, Rispaill N, Prados-Rosales RC & Pietro AD (2010) A Nitrogen Response Pathway Regulates Virulence Functions in *Fusarium oxysporum* via the Protein Kinase TOR and the bZIP Protein MeaB. *Plant Cell* **22**: 2459–2475

- Loqué D, Yuan L, Kojima S, Gojon A, Wirth J, Gazzarrini S, Ishiyama K, Takahashi H & von Wirén N (2006) Additive contribution of AMT1;1 and AMT1;3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **48**: 522–534
- Lozano-Juste J, Colom-Moreno R & León J (2011) In vivo protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **62**: 3501–3517
- Luderer R, Rivas S, Nürnberger T, Mattei B, Van den Hooven HW, Van der Hoorn RA, Romeis T, Wehrfritz JM, Blume B, Nennstiel D, Zuidema D, Vervoort J, De Lorenzo G, Jones JD, De Wit PJ & Joosten MH (2001) No evidence for binding between resistance gene product Cf-9 of tomato and avirulence gene product AVR9 of *Cladosporium fulvum*. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **14**: 867–876
- Ludewig U, von Wirén N & Frommer WB (2002) Uniport of NH₄⁺ by the root hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1;1. *J. Biol. Chem.* **277**: 13548–13555
- Lumsden, R. D., Papavizas, G. C., and Ayers, W. A. 1970. Studies on the Mechanism of Action of Beta-Methylaspartic Acid in the Suppression of *Aphanomyces* Root Rot of Pea. *CAN J BOT* **48**: 631-637.
- Luna E, van Hulten M, Zhang Y, Berkowitz O, López A, Pétriacq P, Sellwood MA, Chen B, Burrell M, van de Meene A, Pieterse CMJ, Flors V & Ton J (2014) Plant perception of β -aminobutyric acid is mediated by an aspartyl-tRNA synthetase. *Nat. Chem. Biol.* **10**: 450–456
- Lundberg JO, Weitzberg E & Gladwin MT (2008) The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**: 156–167
- Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ & Stamler JS (1999) Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* **284**: 651–654
- Manoli A, Trevisan S, Voigt B, Yokawa K, Baluška F & Quaggiotti S (2016) Nitric Oxide-Mediated Maize Root Apex Responses to Nitrate are Regulated by Auxin and Strigolactones. *Front. Plant Sci.*
- Marcos AT, Ramos MS, Marcos JF, Carmona L, Strauss J & Cánovas D (2016) Nitric oxide synthesis by nitrate reductase is regulated during development in *Aspergillus*. *Mol. Microbiol.* **99**: 15–33
- Marino D, Andrio E, Danchin E, Oger E, Gucciardo S, Lambert A, Puppo A & Pauly N (2011) A *Medicago truncatula* NADPH oxidase is involved in symbiotic nodule functioning. *New Phytol.* **189**: 580–592
- Marroquin-Guzman M & Wilson RA (2015) GATA-Dependent Glutaminolysis Drives Appressorium Formation in *Magnaporthe oryzae* by Suppressing TOR Inhibition of cAMP/PKA Signaling. *PLOS Pathog* **11**: e1004851
- Marschner H, George E & Römheld V (1995) Preface to Second Edition. In *Mineral Nutrition of Higher Plants (Second Edition)* pp vii–viii. London: Academic Press

- Martin T, Oswald O & Graham IA (2002) *Arabidopsis* seedling growth, storage lipid mobilization, and photosynthetic gene expression are regulated by carbon:nitrogen availability. *Plant Physiol.* **128**: 472–481
- Marzluf GA (1997) Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **61**: 17–32
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L & Suzuki A (2010) Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann. Bot.* **105**: 1141–1157
- Massad TJ, Dyer LA & C GV (2012) Costs of Defense and a Test of the Carbon-Nutrient Balance and Growth-Differentiation Balance Hypotheses for Two Co-Occurring Classes of Plant Defense. *PLOS ONE* **7**: e47554
- Matamoros MA, Dalton DA, Ramos J, Clemente MR, Rubio MC & Becana M (2003) Biochemistry and Molecular Biology of Antioxidants in the Rhizobia-Legume Symbiosis. *Plant Physiol.* **133**: 499–509
- Medici A & Krouk G (2014) The primary nitrate response: a multifaceted signalling pathway. *J. Exp. Bot.* **65**: 5567–5576
- Meilhoc E, Cam Y, Skapski A & Bruand C (2010) The response to nitric oxide of the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **23**: 748–759
- Melo PM, Lima LM, Santos IM, Carvalho HG & Cullimore JV (2003) Expression of the plastid-located glutamine synthetase of *Medicago truncatula*. Accumulation of the precursor in root nodules reveals an *in vivo* control at the level of protein import into plastids. *Plant Physiol.* **132**: 390–399
- Melo PM, Silva LS, Ribeiro I, Seabra AR & Carvalho HG (2011) Glutamine synthetase is a molecular target of nitric oxide in root nodules of *Medicago truncatula* and is regulated by tyrosine nitration. *Plant Physiol.* **157**: 1505–1517
- Mifflin BJ & Habash DZ (2002) The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *J. Exp. Bot.* **53**: 979–987
- Miranda KM, Espey MG & Wink DA (2001) A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. *Nitric Oxide* **5**: 62–71
- Mittelstrass DT (2006) Modification of primary and secondary metabolism of potato plants by nitrogen application differentially affects resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. *Plant Biol. Stuttg. Ger.* **8**: 653–61
- Modolo LV, Augusto O, Almeida IMG, Magalhaes JR & Salgado I (2005) Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. *FEBS Lett.* **579**: 3814–3820
- Modolo LV, Augusto O, Almeida IMG, Pinto-Maglio CAF, Oliveira HC, Seligman K & Salgado I (2006) Decreased arginine and nitrite levels in nitrate reductase-deficient

- Arabidopsis thaliana* plants impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Sci.* **171**: 34–40
- Morandi D, le Signor C, Gianinazzi-Pearson V & Duc G (2009) A *Medicago truncatula* mutant hyper-responsive to mycorrhiza and defective for nodulation. *Mycorrhiza* **19**: 435–441
- Moreau D, Voisin A-S, Salon C & Munier-Jolain N (2008) The model symbiotic association between *Medicago truncatula* cv. Jemalong and *Rhizobium meliloti* strain 2011 leads to N-stressed plants when symbiotic N₂ fixation is the main N source for plant growth. *J. Exp. Bot.* **59**: 3509–3522
- Moreau M, Lindermayr C, Durner J & Klessig DF (2010) NO synthesis and signaling in plants – where do we stand? *Physiol. Plant.* **138**: 372–383
- Morère-Le Paven M-C, Viau L, Hamon A, Vandecasteele C, Pellizzaro A, Bourdin C, Laffont C, Lapiéd B, Lepetit M, Frugier F, Legros C & Limami AM (2011) Characterization of a dual-affinity nitrate transporter MtNRT1.3 in the model legume *Medicago truncatula*. *J. Exp. Bot.* **62**: 5595–5605
- Morot-Gaudry J-F (2001) Nitrogen assimilation by plants: physiological, biochemical and molecular aspects Science Publishers
- Moussart A, Even MN & Tivoli B (2008) Reaction of genotypes from several species of grain and forage legumes to infection with a French pea isolate of the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Eur. J. Plant Pathol.* **122**: 321–333
- Moussart A, Lemarchand E & Tivoli B (2006) Description, validation, possible uses of a soil infectivity test for *Aphanomyces euteiches*. AFPP, 8th International Conference on Plant diseases, Tours, 5–6 December.
- Moussart A, Onfroy C, Lesne A, Esquibet M, Grenier E & Tivoli B (2007) Host status and reaction of *Medicago truncatula* accessions to infection by three major pathogens of pea (*Pisum sativum*) and alfalfa (*Medicago sativa*). *Eur. J. Plant Pathol.* **117**: 57–69
- Mulaudzi T, Ludidi N, Ruzvidzo O, Morse M, Hendricks N, Iwuoha E & Gehring C (2011) Identification of a novel *Arabidopsis thaliana* nitric oxide-binding molecule with guanylate cyclase activity in vitro. *FEBS Lett.* **585**: 2693–2697
- Mur LAJ, Carver TLW & Prats E (2006) NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant–pathogen interactions. *J. Exp. Bot.* **57**: 489–505
- 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
- Mur LAJ, Simpson C, Kumari A, Gupta AK & Gupta KJ (2016) Moving nitrogen to the centre of plant defence against pathogens. *Ann. Bot.*: mcw179
- Mur LAJ, Sivakumaran A, Mandon J, Cristescu SM, Harren FJM & Hebelstrup KH (2012) Haemoglobin modulates salicylate and jasmonate/ethylene-mediated resistance mechanisms against pathogens. *J. Exp. Bot.* **63**: 4375–4387

- Nacry P, Bouguyon E & Gojon A (2013) Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. *Plant Soil* **370**: 1–29
- Nars A, Lafitte C, Chabaud M, Drouillard S, Mélida H, Danoun S, Costaouëc TL, Rey T, Benedetti J, Bulone V, Barker DG, Bono J-J, Dumas B, Jacquet C, Heux L, Fliegmann J & Bottin A (2013) *Aphanomyces euteiches* Cell Wall Fractions Containing Novel Glucan-Chitosaccharides Induce Defense Genes and Nuclear Calcium Oscillations in the Plant Host *Medicago truncatula*. *PLOS ONE* **8**: e75039
- Navascués J, Pérez-Rontomé C, Gay M, Marcos M, Yang F, Walker FA, Desbois A, Abián J & Becana M (2012) Leghemoglobin green derivatives with nitrated hemes evidence production of highly reactive nitrogen species during aging of legume nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 2660–2665
- Neill S, Barros R, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Morris P, Ribeiro D & Wilson I (2008) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* **59**: 165–176
- Neuhäuser B, Dynowski M & Ludewig U (2009) Channel-like NH₃ flux by ammonium transporter AtAMT2. *FEBS Lett.* **583**: 2833–2838
- Ninnemann H & Maier J (1996) Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*. *Photochem. Photobiol.* **64**: 393–398
- Ninnemann O, Jauniaux JC & Frommer WB (1994) Identification of a high affinity NH₄⁺ transporter from plants. *EMBO J.* **13**: 3464–3471
- Nothnagel EA, McNeil M, Albersheim P & Dell A (1983) Host-Pathogen Interactions XXII. A Galacturonic Acid Oligosaccharide from Plant Cell Walls Elicits Phytoalexins. *Plant Physiol.* **71**: 916–926
- Nunes-Nesi A, Fernie AR & Stitt M (2010) Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. *Mol. Plant* **3**: 973–996
- Nyamsuren O, Colditz F, Rosendahl S, Tamasloukht MB, Bekel T, Meyer F, Kuester H, Franken P & Krajinski F (2003) Transcriptional profiling of *Medicago truncatula* roots after infection with *Aphanomyces euteiches* (oomycota) identifies novel genes upregulated during this pathogenic interaction. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* Available at: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301026352> [Accessed July 13, 2016]
- O'Brien JA, Daudi A, Butt VS & Bolwell GP (2012a) Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* **236**: 765–779
- O'Brien JA, Daudi A, Finch P, Butt VS, Whitelegge JP, Souda P, Ausubel FM & Bolwell GP (2012b) A peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in cultured *Arabidopsis* cells functions in MAMP-elicited defense. *Plant Physiol.* **158**: 2013–2027
- Oerke E-C (2006) Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* **144**: 31–43

- Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS & Downie JA (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* **45**: 119–144
- Olea F, Pérez-García A, Cantón FR, Rivera ME, Cañas R, Avila C, Cazorla FM, Cánovas FM & de Vicente A (2004) Up-regulation and localization of asparagine synthetase in tomato leaves infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell Physiol.* **45**: 770–780
- Oliveira HC, Justino GC, Sodek L & Salgado I (2009) Amino acid recovery does not prevent susceptibility to *Pseudomonas syringae* in nitrate reductase double-deficient *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant Sci.* **176**: 105–111
- Orsel M, Krapp A & Daniel-Vedele F (2002) Analysis of the NRT2 Nitrate Transporter Family in *Arabidopsis*. Structure and Gene Expression. *Plant Physiol.* **129**: 886–896
- Ortega-Galisteo AP, Rodríguez-Serrano M, Pazmiño DM, Gupta DK, Sandalio LM & Romero-Puertas MC (2012) S-Nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: changes under abiotic stress. *J. Exp. Bot.* **63**: 2089–2103
- Ott T, van Dongen JT, Günther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberger P & Udvardi MK (2005) Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr. Biol. CB* **15**: 531–535
- Otvös K, Pasternak TP, Miskolczi P, Domoki M, Dorjgotov D, Szucs A, Bottka S, Dudits D & Fehér A (2005) Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **43**: 849–860
- Ou X, Zhuang T, Yin W, Miao Y, Wang B, Zhang Y, Lin X, Xu C, Wettstein D von, Rustgi S & Liu B (2015) DNA Methylation Changes Induced in Rice by Exposure to High Concentrations of the Nitric Oxide Modulator, Sodium Nitroprusside. *Plant Mol. Biol. Report.* **33**: 1428–1440
- Pagnussat GC, Simontacchi M, Puntarulo S & Lamattina L (2002) Nitric Oxide Is Required for Root Organogenesis. *Plant Physiol.* **129**: 954–956
- Palmieri MC, Sell S, Huang X, Scherf M, Werner T, Durner J & Lindermayr C (2008) Nitric oxide-responsive genes and promoters in *Arabidopsis thaliana*: a bioinformatics approach. *J. Exp. Bot.* **59**: 177–186
- Papavizas GC & Ayers WA (1974) *Aphanomyces* Species and Their Root Diseases in Pea and Sugarbeet: A Review Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture
- Papavizas GC & Davey CB (1960) Some Factors Affecting Growth of *Aphanomyces euteiches* in Synthetic Media. *Am. J. Bot.* **47**: 758–765
- Park BS, Song JT & Seo HS (2011) *Arabidopsis* nitrate reductase activity is stimulated by the E3 SUMO ligase AtSIZ1. *Nat. Commun.* **2**: 400
- Parniske M (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 763–775

- Parsons R, Bergersen FJ, Li Y & Day DA (2002) Reassessment of major products of N₂ fixation by bacteroids from soybean root nodules. *Microbiology* **148**: 1959–1966
- Pastor V, Gamir J, Camañes G, Cerezo M, Sánchez-Bel P & Flors V (2014) Disruption of the ammonium transporter AMT1.1 alters basal defenses generating resistance against *Pseudomonas syringae* and *Plectosphaerella cucumerina*. *Front. Plant Sci.* **5**: 231
- Pellier A-L, Laugé R, Veneault-Fourrey C & Langin T (2003) CLNR1, the AREA/NIT2-like global nitrogen regulator of the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum* is required for the infection cycle. *Mol. Microbiol.* **48**: 639–655
- Pellizzaro A, Clochard T, Planchet E, Limami AM & Morère-Le Paven M-C (2015) Identification and molecular characterization of *Medicago truncatula* NRT2 and NAR2 families. *Physiol. Plant.* **154**: 256–269
- Peng M, Bi Y-M, Zhu T & Rothstein SJ (2007) Genome-wide analysis of *Arabidopsis* responsive transcriptome to nitrogen limitation and its regulation by the ubiquitin ligase gene NLA. *Plant Mol. Biol.* **65**: 775–797
- Peoples MB, Gifford RM. (1993) Long-distance transport of carbon and nitrogen from sources to sinks in higher plants. 2(1):434–447. In DT Dennis, DH Turpin, eds, Plant physiology, biochemistry and molecular biology. John Wiley & Son, Inc., New York, pp.
- Pérez-García A, de Vicente A, Cantón FR, Cazorla FM, Codina JC, García-Gutiérrez Á & Cánovas FM (1998) Light-dependent changes of tomato glutamine synthetase in response to *Pseudomonas syringae* infection or phosphinothricin treatment. *Physiol. Plant.* **102**: 377–384
- Pérez-Tienda J, Valderas A, Camañes G, García-Agustín P & Ferrol N (2012) Kinetics of NH₄⁺ uptake by the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *Mycorrhiza* **22**: 485–491
- Peters NK & Verma DP (1990) Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe relations. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **3**: 4–8
- Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A & Van Wees SCM (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**: 489–521
- Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SCM & Bakker PAHM (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* **52**: 347–375
- Pilet-Nayel M-L, Prospéri J-M, Hamon C, Lesné A, Lecoïnte R, Le Goff I, Hervé M, Deniot G, Delalande M, Huguet T, Jacquet C & Baranger A (2009) AER1, a major gene conferring resistance to *Aphanomyces euteiches* in *Medicago truncatula*. *Phytopathology* **99**: 203–208
- Pinto MC de, Locato V, Sgobba A, Romero-Puertas M del C, Gadaleta C, Delledonne M & Gara LD (2013) S-Nitrosylation of Ascorbate Peroxidase Is Part of Programmed Cell Death Signaling in Tobacco Bright Yellow-2 Cells. *Plant Physiol.* **163**: 1766–1775

- Planchet E, Jagadis Gupta K, Sonoda M & Kaiser WM (2005) Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **41**: 732–743
- Polesskaya OG, Kashirina EI & Alekhina ND (2004) Changes in the Activity of Antioxidant Enzymes in Wheat Leaves and Roots as a Function of Nitrogen Source and Supply. *Russ. J. Plant Physiol.* **51**: 615–620
- Prather M, Ehalt D, Dentener F, Derwent R, Dlugokencky E, Holland E, Isaksen, I, Katima, J, Kirchhoff V, Matson P, Midgley P, Wang M (2001) Atmospheric chemistry and greenhouse gases. In: Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Noguier M, van der Linden PJ, Dai X, Maskell K & Johnson CA (Eds). *Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contributions of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 881 pp
- Puppo A, Pauly N, Boscari A, Mandon K & Brouquisse R (2013) Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the Legume-Rhizobium and mycorrhizal symbioses. *Antioxid. Redox Signal.* **18**: 2202–2219
- Puyaubert J, Fares A, Rézé N, Peltier J-B & Baudouin E (2014) Identification of endogenously S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis* plantlets: Effect of cold stress on cysteine nitrosylation level. *Plant Sci.* **215–216**: 150–156
- Quandt H-J, Puhler A & Broer I (1993) Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: a fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **6**: 699–706
- Radi R (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 4003–4008
- Ramirez-Garcés D, Camborde L, Pel MJC, Jauneau A, Martinez Y, Néant I, Leclerc C, Moreau M, Dumas B & Gaulin E (2016) CRN13 candidate effectors from plant and animal eukaryotic pathogens are DNA-binding proteins which trigger host DNA damage response. *New Phytol.* **210**: 602–617
- Rasul S, Dubreuil-Maurizi C, Lamotte O, Koen E, Poinssot B, Alcaraz G, Wendehenne D & Jeandroz S (2012) Nitric oxide production mediates oligogalacturonide-triggered immunity and resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* **35**: 1483–1499
- Raun, W.R., and G.V. Johnson. 1999. Improving nitrogen use efficiency for cereal production. *Agron. J.* 91:357-363.
- Rausch T & Wachter A (2005) Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends Plant Sci.* **10**: 503–509
- Raven JA, Wollenweber B & Handley LL (1992) A comparison of ammonium and nitrate as nitrogen sources for photolithotrophs. *New Phytol.* **121**: 19–32

- Reinhardt D (2007) Programming good relations — development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**: 98–105
- Rey T, Nars A, Bonhomme M, Bottin A, Huguet S, Balzergue S, Jardinaud M-F, Bono J-J, Cullimore J, Dumas B, Gough C & Jacquet C (2013) NFP, a LysM protein controlling Nod factor perception, also intervenes in *Medicago truncatula* resistance to pathogens. *New Phytol.* **198**: 875–886
- Rico A & Preston GM (2008) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Uses Constitutive and Apoplast-Induced Nutrient Assimilation Pathways to Catabolize Nutrients That Are Abundant in the Tomato Apoplast. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **21**: 269–282
- Robert-Seilaniantz A, MacLean D, Jikumaru Y, Hill L, Yamaguchi S, Kamiya Y & Jones JDG (2011) The microRNA miR393 re-directs secondary metabolite biosynthesis away from camalexin and towards glucosinolates. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **67**: 218–231
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J & Kaiser WM (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Bot.* **53**: 103–110
- Rohde JR, Bastidas R, Puria R & Cardenas ME (2008) Nutritional Control via Tor signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**: 153–160
- Ronfort J, Bataillon T, Santoni S, Delalande M, David JL & Prospero J-M (2006) Microsatellite diversity and broad scale geographic structure in a model legume: building a set of nested core collection for studying naturally occurring variation in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biol.* **6**: 28
- Rose RJ (2008) *Medicago truncatula* as a model for understanding plant interactions with other organisms, plant development and stress biology: past, present and future. *Funct. Plant Biol.* **35**: 253–264
- Rosnoblet C, Bègue H, Blanchard C, Pichereaux C, Besson-Bard A, Aimé S & Wendehenne D (2016) Functional characterization of the chaperon-like protein Cdc48 in cryptogein-induced immune response in tobacco. *Plant Cell Environ.*: n/a-n/a
- Rubin G, Tohge T, Matsuda F, Saito K & Scheible W-R (2009) Members of the LBD Family of Transcription Factors Repress Anthocyanin Synthesis and Affect Additional Nitrogen Responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 3567–3584
- Ruffel S, Freixes S, Balzergue S, Tillard P, Jeudy C, Martin-Magniette ML, van der Merwe MJ, Kakar K, Gouzy J, Fernie AR, Udvardi M, Salon C, Gojon A & Lepetit M (2008) Systemic signaling of the plant nitrogen status triggers specific transcriptome responses depending on the nitrogen source in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* **146**: 2020–2035
- Rustérucci C, Espunya MC, Díaz M, Chabannes M & Martínez MC (2007) S-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiol.* **143**: 1282–1292
- Sagan M, Ney B & Duc G (1993) Plant symbiotic mutants as a tool to analyse nitrogen nutrition and yield relationship in field-growth peas (*Pisum sativum* L.). *Plant Soil* **153**: 33–45

- Salvemini D, Doyle TM & Cuzzocrea S (2006) Superoxide, peroxynitrite and oxidative/nitrative stress in inflammation. *Biochem. Soc. Trans.* **34**: 965–970
- Salzer P, Corbière H & Boller T (1999) Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. *Planta* **208**: 319–325
- Sanz-Luque E, Ocaña-Calahorra F, de Montaigu A, Chamizo-Ampudia A, Llamas Á, Galván A & Fernández E (2015) THB1, a truncated hemoglobin, modulates nitric oxide levels and nitrate reductase activity. *Plant J.* **81**: 467–479
- Saxena I, Srikanth S & Chen Z (2016) Cross Talk between H₂O₂ and Interacting Signal Molecules under Plant Stress Response. *Front. Plant Sci.*
- Schachtman DP & Shin R (2007) Nutrient sensing and signaling: NPKS. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**: 47–69
- Scheible WR, Gonzalez-Fontes A, Lauerer M, Muller-Rober B, Caboche M & Stitt M (1997a) Nitrate Acts as a Signal to Induce Organic Acid Metabolism and Repress Starch Metabolism in Tobacco. *Plant Cell* **9**: 783–798
- Scheible W-R, Krapp A & Stitt M (2000) Reciprocal diurnal changes of phosphoenolpyruvate carboxylase expression and cytosolic pyruvate kinase, citrate synthase and NADP-isocitrate dehydrogenase expression regulate organic acid metabolism during nitrate assimilation in tobacco leaves. *Plant Cell Environ.* **23**: 1155–1167
- Scheible W-R, Lauerer M, Schulze E-D, Caboche M & Stitt M (1997b) Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco†. *Plant J.* **11**: 671–691
- Schmidt HH & Walter U (1994) NO at work. *Cell* **78**: 919–925
- Schneider CA, Rasband WS & Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**: 671–675
- Schultze M & Kondorosi A (1998) Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu. Rev. Genet.* **32**: 33–57
- Scott, W. W. 1961. A monograph of the genus *Aphanomyces*. Va. Agric. Exp. Stn. Tech. Bull. 151.
- Seabra AR, Silva LS & Carvalho HG (2013) Novel aspects of glutamine synthetase (GS) regulation revealed by a detailed expression analysis of the entire GS gene family of *Medicago truncatula* under different physiological conditions. *BMC Plant Biol.* **13**: 137
- Seabra AR, Vieira CP, Cullimore JV & Carvalho HG (2010) *Medicago truncatula* contains a second gene encoding a plastid located glutamine synthetase exclusively expressed in developing seeds. *BMC Plant Biol.* **10**: 183
- Sehrawat A & Deswal R (2014) S-nitrosylation analysis in *Brassica juncea* apoplast highlights the importance of nitric oxide in cold-stress signaling. *J. Proteome Res.* **13**: 2599–2619

- Seifi H, De Vleeschauwer D, Aziz A & Höfte M (2014) Modulating plant primary amino acid metabolism as a necrotrophic virulence strategy: the immune-regulatory role of asparagine synthetase in *Botrytis cinerea*-tomato interaction. *Plant Signal. Behav.* **9**: e27995
- Seifi HS, Curvers K, De Vleeschauwer D, Delaere I, Aziz A & Höfte M (2013) Concurrent overactivation of the cytosolic glutamine synthetase and the GABA shunt in the ABA-deficient sitiens mutant of tomato leads to resistance against *Botrytis cinerea*. *New Phytol.* **199**: 490–504
- Sekizaki H, Yokosawa R, Chinen C, Adachi H & Yamane Y (1993) Studies on zoospore attracting activity. II. Synthesis of isoflavones and their attracting activity to *Aphanomyces euteiches* zoospore. *Biol. Pharm. Bull.* **16**: 698–701
- Seregélyes C, Barna B, Hennig J, Konopka D, Pasternak TP, Lukács N, Fehér A, Horváth GV & Dudits D (2003) Phytoglobins can interfere with nitric oxide functions during plant growth and pathogenic responses: a transgenic approach. *Plant Sci.* **165**: 541–550
- Sharma MK, Sharma H & Bapna N (2013) Histopathological Changes in the Liver of Rabbits Exposed to High Nitrate Ingestion in Drinking Water. *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* **7**: 1552–1554
- Shimoda Y, Nagata M, Suzuki A, Abe M, Sato S, Kato T, Tabata S, Higashi S & Uchiumi T (2005) Symbiotic rhizobium and nitric oxide induce gene expression of non-symbiotic hemoglobin in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol.* **46**: 99–107
- Shin R, Berg RH & Schachtman DP (2005) Reactive oxygen species and root hairs in *Arabidopsis* root response to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency. *Plant Cell Physiol.* **46**: 1350–1357
- Simontacchi M, García-Mata C, Bartoli CG, Santa-María GE & Lamattina L (2013) Nitric oxide as a key component in hormone-regulated processes. *Plant Cell Rep.* **32**: 853–866
- Singh P, Wu C-C & Zimmerli L (2010) Beta-aminobutyric acid priming by stress imprinting. *Plant Signal. Behav.* **5**: 878–880
- Singleton VL & Rossi JA (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**: 144–158
- Slezack S, Dumas-Gaudot E, Rosendahl S, Kjøller R, Paynot M, Negrel J & Gianinazzi S (1999) Endoproteolytic activities in pea roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and/or *Aphanomyces euteiches* in relation to bioprotection. *New Phytol.* **142**: 517–529
- Smirnoff N & Stewart GR (1985) Nitrate assimilation and translocation by higher plants: Comparative physiology and ecological consequences. *Physiol. Plant.* **64**: 133–140
- Smith SE & Read D (2008) 16 - Mycorrhizas in ecological interactions. In *Mycorrhizal Symbiosis (Third Edition)* p 573–XVII. London: Academic Press

- Smith SE & Smith FA (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annu. Rev. Plant Biol.* **62**: 227–250
- Snoeiijers SS, Pérez-García A, Joosten MHAJ & Wit PJGMD (2000) The Effect of Nitrogen on Disease Development and Gene Expression in Bacterial and Fungal Plant Pathogens. *Eur. J. Plant Pathol.* **106**: 493–506
- Sohlenkamp C, Shelden M, Howitt S & Udvardi M (2000) Characterization of *Arabidopsis* AtAMT2, a novel ammonium transporter in plants. *FEBS Lett.* **467**: 273–278
- Solomon PS & Oliver RP (2001) The nitrogen content of the tomato leaf apoplast increases during infection by *Cladosporium fulvum*. *Planta* **213**: 241–249
- Solomon PS & Oliver RP (2002) Evidence that gamma-aminobutyric acid is a major nitrogen source during *Cladosporium fulvum* infection of tomato. *Planta* **214**: 414–420
- Solomon PS, Tan K-C & Oliver RP (2003) The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study. *Mol. Plant Pathol.* **4**: 203–210
- Sonoda Y, Ikeda A, Saiki S, Yamaya T & Yamaguchi J (2003) Feedback regulation of the ammonium transporter gene family AMT1 by glutamine in rice. *Plant Cell Physiol.* **44**: 1396–1402
- Srivastava N, Gonugunta VK, Puli MR & Raghavendra AS (2009) Nitric oxide production occurs downstream of reactive oxygen species in guard cells during stomatal closure induced by chitosan in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. *Planta* **229**: 757–765
- Stamler JS, Singel DJ & Loscalzo J (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* **258**: 1898–1902
- Stewart V & Vollmer SJ (1986) Molecular cloning of nit-2, a regulatory gene required for nitrogen metabolite repression in *Neurospora crassa*. *Gene* **46**: 291–295
- Stitt M & Krapp A (1999) The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant Cell Environ.* **22**: 583–621
- Stöhr C, Strube F, Marx G, Ullrich WR & Rockel P (2001) A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* **212**: 835–841
- Stöhr C & Ullrich WR (2002) Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *J. Exp. Bot.* **53**: 2293–2303
- Streeter J (1988) Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. *Crit. Rev. Plant Sci. USA*
- Stuttman J, Hubberten H-M, Rietz S, Kaur J, Muskett P, Guerois R, Bednarek P, Hoefgen R & Parker JE (2011) Perturbation of *Arabidopsis* Amino Acid Metabolism Causes Incompatibility with the Adapted Biotrophic Pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *Plant Cell* **23**: 2788–2803

- Svennerstam H, Ganeteg U, Bellini C & Näsholm T (2007) Comprehensive screening of *Arabidopsis* mutants suggests the lysine histidine transporter 1 to be involved in plant uptake of amino acids. *Plant Physiol.* **143**: 1853–1860
- Swartzberg D, Kirshner B, Rav-David D, Elad Y & Granot D (2007) *Botrytis cinerea* induces senescence and is inhibited by autoregulated expression of the IPT gene. *Eur. J. Plant Pathol.* **120**: 289–297
- Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J & Dong X (2008) Plant Immunity Requires Conformational Charges of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins. *Science* **321**: 952–956
- Tavernier E, Wendehenne D, Blein JP & Pugin A (1995) Involvement of Free Calcium in Action of Cryptogein, a Proteinaceous Elicitor of Hypersensitive Reaction in Tobacco Cells. *Plant Physiol.* **109**: 1025–1031
- Tavernier V, Cadiou S, Pageau K, Laugé R, Reisdorf-Cren M, Langin T & Masclaux-Daubresse C (2007) The plant nitrogen mobilization promoted by *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus* leaves depends on fungus pathogenicity. *J. Exp. Bot.* **58**: 3351–3360
- Thalineau E, Truong H-N, Berger A, Fournier C, Boscardi A, Wendehenne D & Jeandroz S (2016) Cross-Regulation between N Metabolism and Nitric Oxide (NO) Signaling during Plant Immunity. *Front. Plant Sci.*
- Thomas H & Villiers L de (1996) Gene expression in leaves of *Arabidopsis thaliana* induced to senesce by nutrient deprivation. *J. Exp. Bot.* **47**: 1845–1852
- Thoquet P, Gherardi M, Journet E-P, Kereszt A, Ané J-M, Prospero J-M & Huguet T (2002) The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula*: an essential tool for comparative legume genomics and the isolation of agronomically important genes. *BMC Plant Biol.* **2**: 1
- TIVOLI B, BARANGER A, SIVASITHAMPARAM K & BARBETTI MJ (2006) Annual *Medicago*: From a Model Crop Challenged by a Spectrum of Necrotrophic Pathogens to a Model Plant to Explore the Nature of Disease Resistance. *Ann. Bot.* **98**: 1117–1128
- Torto TA, Li S, Styer A, Huitema E, Testa A, Gow NAR, van West P & Kamoun S (2003) EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora*. *Genome Res.* **13**: 1675–1685
- Trapet P, Kulik A, Lamotte O, Jeandroz S, Bourque S, Nicolas-Francès V, Rosnoblet C, Besson-Bard A & Wendehenne D (2015) NO signaling in plant immunity: a tale of messengers. *Phytochemistry* **112**: 72–79
- Truong H-N, Thalineau E, Bonneau L, Fournier C, Potin S, Balzergue S, VAN Tuinen D, Jeandroz S & Morandi D (2015) The *Medicago truncatula* hypermycorrhizal B9 mutant displays an altered response to phosphate and is more susceptible to *Aphanomyces euteiches*. *Plant Cell Environ.* **38**: 73–88
- Tucker PA & Sallai L (2007) The AAA+ superfamily — a myriad of motions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**: 641–652

- Tudzynski B (2014) Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Front. Microbiol.* **5**: 656
- Tun NN, Santa-Catarina C, Begum T, Silveira V, Handro W, Floh EIS & Scherer GFE (2006) Polyamines Induce Rapid Biosynthesis of Nitric Oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* Seedlings. *Plant Cell Physiol.* **47**: 346–354
- Ullmann-Zeunert L, Stanton MA, Wielsch N, Bartram S, Hummert C, Svatoš A, Baldwin IT & Groten K (2013) Quantification of growth-defense trade-offs in a common currency: nitrogen required for phenolamide biosynthesis is not derived from ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase turnover. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **75**: 417–429
- Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Fernández-Ocaña A, Chaki M, Luque F, Gómez-Rodríguez MV, Colmenero-Varea P, del Río LA & Barroso JB (2007) Nitrosative stress in plants. *FEBS Lett.* **581**: 453–461
- Van der Hoorn RAL, De Wit PJGM & Joosten MHAI (2002) Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends Plant Sci.* **7**: 67–71
- Vandelle E & Delledonne M (2011) Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.* **181**: 534–539
- Vandemark GJ & Grünwald NJ (2004) Reaction of *Medicago truncatula* to *Aphanomyces euteiches* Race 2. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* **37**: 59–67
- Vega A, Canessa P, Hoppe G, Retamal I, Moyano TC, Canales J, Gutiérrez RA & Rubilar J (2015) Transcriptome analysis reveals regulatory networks underlying differential susceptibility to *Botrytis cinerea* in response to nitrogen availability in *Solanum lycopersicum*. *Plant Biot. Interact.*: 911
- Verhagen BWM, Glazebrook J, Zhu T, Chang H-S, van Loon LC & Pieterse CMJ (2004) The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **17**: 895–908
- Vidal EA, Moyano TC, Canales J & Gutiérrez RA (2014) Nitrogen control of developmental phase transitions in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **65**: 5611–5618
- Vijayakumari K, Jisha KC & Puthur JT (2016) GABA/BABA priming: a means for enhancing abiotic stress tolerance potential of plants with less energy investments on defence cache. *Acta Physiol. Plant.* **38**: 230
- Vitousek PM & Howarth RW (1991) Nitrogen Limitation on Land and in the Sea: How Can It Occur? *Biogeochemistry* **13**: 87–115
- Voisin A-S, Salon C, Munier-Jolain NG & Ney B (2002) Effect of mineral nitrogen on nitrogen nutrition and biomass partitioning between the shoot and roots of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Soil* **242**: 251–262
- Volpe V, Giovannetti M, Sun X-G, Fiorilli V & Bonfante P (2016) The phosphate transporters LjPT4 and MtPT4 mediate early root responses to phosphate status in non mycorrhizal roots. *Plant Cell Environ.* **39**: 660–671

- Vos IA, Pieterse CMJ & van Wees SCM (2013) Costs and benefits of hormone-regulated plant defences. *Plant Pathol.* **62**: 43–55
- Walters D & Heil M (2007) Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **71**: 3–17
- Wan J, Zhang X-C & Stacey G (2008) Chitin signaling and plant disease resistance. *Plant Signal. Behav.* **3**: 831–833
- Wang Y, Loake GJ & Chu C (2013) Cross-talk of nitric oxide and reactive oxygen species in plant programmed cell death. *Front. Plant Sci.*
- Wang B & Qiu Y-L (2006) Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* **16**: 299–363
- Wang D, Pajerowska-Mukhtar K, Culler AH & Dong X (2007a) Salicylic Acid Inhibits Pathogen Growth in Plants through Repression of the Auxin Signaling Pathway. *Curr. Biol.* **17**: 1784–1790
- Wang D, Yang S, Tang F & Zhu H (2012) Symbiosis specificity in the legume: rhizobial mutualism. *Cell. Microbiol.* **14**: 334–342
- Wang P, Du Y, Li Y, Ren D & Song C-P (2010) Hydrogen Peroxide-Mediated Activation of MAP Kinase 6 Modulates Nitric Oxide Biosynthesis and Signal Transduction in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**: 2981–2998
- Wang R, Liu D & Crawford NM (1998) The *Arabidopsis* CHL1 protein plays a major role in high-affinity nitrate uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 15134–15139
- Wang R, Xing X & Crawford N (2007b) Nitrite Acts as a Transcriptome Signal at Micromolar Concentrations in *Arabidopsis* Roots. *Plant Physiol.* **145**: 1735–1745
- Wang Y, Yun B-W, Kwon E, Hong JK, Yoon J & Loake GJ (2006) S-nitrosylation: an emerging redox-based post-translational modification in plants. *J. Exp. Bot.* **57**: 1777–1784
- Ward JL, Forcat S, Beckmann M, Bennett M, Miller SJ, Baker JM, Hawkins ND, Vermeer CP, Lu C, Lin W, Truman WM, Beale MH, Draper J, Mansfield JW & Grant M (2010) The metabolic transition during disease following infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **63**: 443–457
- Weitzberg E & Lundberg JON (1998) Nonenzymatic Nitric Oxide Production in Humans. *Nitric Oxide* **2**: 1–7
- Wendehenne D, Gao Q, Kachroo A & Kachroo P (2014) Free radical-mediated systemic immunity in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **20**: 127–134
- Williamson LC, Ribrioux SPCP, Fitter AH & Leyser HMO (2001) Phosphate Availability Regulates Root System Architecture in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **126**: 875–882
- Wilson ID, Neill SJ & Hancock JT (2008) Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environ.* **31**: 622–631

- Wimalasekera R, Villar C, Begum T & Scherer GFE (2011) COPPER AMINE OXIDASE1 (CuAO1) of *Arabidopsis thaliana* contributes to abscisic acid- and polyamine-induced nitric oxide biosynthesis and abscisic acid signal transduction. *Mol. Plant* **4**: 663–678
- Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, Koch WH, Andrews AW & Allen JS (1991) DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* **254**: 1001–1003
- Winter G, Todd CD, Trovato M, Forlani G & Funck D (2015) Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Front. Plant Sci.*
- Wu C-C, Singh P, Chen M-C & Zimmerli L (2010) L-Glutamine inhibits beta-aminobutyric acid-induced stress resistance and priming in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **61**: 995–1002
- Xu S, Guerra D, Lee U & Vierling E (2013) S-nitrosoglutathione reductases are low-copy number, cysteine-rich proteins in plants that control multiple developmental and defense responses in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* **4**: 430
- Yaeno T & Iba K (2008) BAH1/NLA, a RING-type ubiquitin E3 ligase, regulates the accumulation of salicylic acid and immune responses to *Pseudomonas syringae* DC3000. *Plant Physiol.* **148**: 1032–1041
- Yamasaki H (2000) Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition in vivo. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **355**: 1477–1488
- Yamasaki H & Cohen MF (2006) NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends Plant Sci.* **11**: 522–524
- Yendrek CR, Lee Y-C, Morris V, Liang Y, Pislariu CI, Burkart G, Meckfessel MH, Salehin M, Kessler H, Wessler H, Lloyd M, Lutton H, Teillet A, Sherrier DJ, Journet E-P, Harris JM & Dickstein R (2010) A putative transporter is essential for integrating nutrient and hormone signaling with lateral root growth and nodule development in *Medicago truncatula*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **62**: 100–112
- Young ND, Debelle F, Oldroyd GED, Geurts R, Cannon SB, Udvardi MK, Benedito VA, Mayer KFX, Gouzy J, Schoof H, Van de Peer Y, Proost S, Cook DR, Meyers BC, Spannagl M, Cheung F, De Mita S, Krishnakumar V, Gundlach H, Zhou S, et al (2011) The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* **480**: 520–524
- Yu O, Jung W, Shi J, Croes RA, Fader GM, McGonigle B & Odell JT (2000) Production of the Isoflavones Genistein and Daidzein in Non-Legume Dicot and Monocot Tissues. *Plant Physiol.* **124**: 781–794
- Yuan L, Loqué D, Kojima S, Rauch S, Ishiyama K, Inoue E, Takahashi H & von Wirén N (2007) The organization of high-affinity ammonium uptake in *Arabidopsis* roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. *Plant Cell* **19**: 2636–2652

- Yun B-W, Feechan A, Yin M, Saidi NBB, Le Bihan T, Yu M, Moore JW, Kang J-G, Kwon E, Spoel SH, Pallas JA & Loake GJ (2011) S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* **478**: 264–268
- Yun B-W, Skelly MJ, Yin M, Yu M, Mun B-G, Lee S-U, Hussain A, Spoel SH & Loake GJ (2016) Nitric oxide and S-nitrosoglutathione function additively during plant immunity. *New Phytol.* **211**: 516–526
- Zancarini A, Mougél C, Voisin A-S, Prudent M, Salon C & Munier-Jolain N (2012) Soil Nitrogen Availability and Plant Genotype Modify the Nutrition Strategies of *M. truncatula* and the Associated Rhizosphere Microbial Communities. *PLOS ONE* **7**: e47096
- Zeier J (2013) New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. *Plant Cell Environ.* **36**: 2085–2103
- Zhao D, Reddy KR, Kakani VG & Reddy VR (2005) Nitrogen deficiency effects on plant growth, leaf photosynthesis, and hyperspectral reflectance properties of sorghum. *Eur. J. Agron.* **22**: 391–403
- Zhao L, He J, Wang X & Zhang L (2008) Nitric oxide protects against polyethylene glycol-induced oxidative damage in two ecotypes of reed suspension cultures. *J. Plant Physiol.* **165**: 182–191
- Zhou L, Yu H & Chen K (2002) Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. *Biomed. Environ. Sci. BES* **15**: 166–171
- Zhu H, Choi H-K, Cook DR & Shoemaker RC (2005) Bridging model and crop legumes through comparative genomics. *Plant Physiol.* **137**: 1189–1196