



HAL
open science

Caractérisation des petits ARN régulateurs impliqués dans la formation des cellules géantes induites par les nématodes phytoparasites du genre *Meloidogyne*

Clémence Medina

► **To cite this version:**

Clémence Medina. Caractérisation des petits ARN régulateurs impliqués dans la formation des cellules géantes induites par les nématodes phytoparasites du genre *Meloidogyne*. Sciences agricoles. Université Côte d'Azur, 2017. Français. NNT : 2017AZUR4046 . tel-01609902

HAL Id: tel-01609902

<https://theses.hal.science/tel-01609902>

Submitted on 4 Oct 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.

L'UNIVERSITE COTE D'AZUR – UFR Sciences
Ecole doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

pour obtenir le titre de

Docteur ès Sciences

De l'Université Côte d'Azur

Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Présentée et soutenue par

Clémence MEDINA

Caractérisation des petits ARN régulateurs impliqués dans la formation des cellules géantes induites par les nématodes phytoparasites du genre *Meloidogyne*.

Thèse dirigée par le **Dr. Bruno FAVERY** et co-dirigée par le **Dr. Stéphanie JAUBERT-POSSAMAI**.

Recherches effectuées au sein de l'Institut Sophia Agrobiotech :UMR ISA INRA 1355-UNS-CNRS 7254

Soutenance le **04 juillet 2017** devant la commission d'examen

Composition du jury:

Pr. Paola FURLA	Professeur	UNS	Président du jury
Dr. Andreas NIEBEL	Directeur de Recherche	CNRS	Rapporteur
Dr. Marie-Noëlle ROSSO	Directeur de Recherche	INRA	Rapporteur
Dr. Sébastien CUNNAC	Chargé de Recherche	IRD	Examineur
Dr. Christine LELANDAIS-BRIERE	Maître de conférences	CNRS	Examineur
Dr. Stéphanie JAUBERT – POSSAMAI	Chargé de Recherche	INRA	Co-directrice
Dr. Bruno FAVERY	Directeur de Recherche	INRA	Directeur

« L'explication scientifique est un mode de comportement qui nous donne du plaisir, comme l'amour ou l'art. La meilleure façon de comprendre sa nature, c'est de faire l'expérience de ce frisson particulier que vous ressentez quand quelqu'un (vous de préférence) a réussi à expliquer réellement quelque chose. Je ne veux pas dire que l'explication scientifique puisse être poursuivie sans contrainte – pas plus d'ailleurs que l'amour ou l'art ».

Steven WEINBERG, prix Nobel de Physique 1979.

Remerciements

Je remercie tout d'abord l'Institut National de la Recherche Agronomique et la Région Provence Alpes Côte d'Azur pour avoir co-financé ce projet de thèse.

Le projet de thèse n'est jamais le fruit du travail d'une seule personne. Je tiens donc à remercier à titre professionnel ou personnel toutes les personnes qui ont de près ou de loin contribué à ce projet.

Je remercie Pierre Abad pour son accueil dans l'équipe IPN et pour ses conseils et discussions au cours de ma thèse.

Je tiens à remercier Stéphanie Jaubert-Possamai qui m'a encadré tout au long de cette thèse. Merci de m'avoir donné les clefs pour mener à bien ce projet et de m'avoir permis d'explorer tous les pans du métier de chercheur ou d'enseignant chercheur. Merci pour ton investissement dans ce projet et dans l'encadrement, que ce soit dans la partie expérimentale ou la rédaction, mais également pour toutes les discussions autour du sujet. Cette expérience avec toi m'a enrichie et je suis sûre qu'elle m'apportera beaucoup pour la suite.

Je tiens à remercier Bruno Favery pour son accueil et son investissement dans le projet tout au long de ma thèse. Ta bonne humeur et ton humour ont grandement participé à la bonne ambiance dans laquelle j'ai travaillé. C'était toujours un plaisir de discuter avec toi de sujets scientifiques et c'était très stimulant pour moi de pouvoir échanger les idées qui me passaient par la tête. Merci pour ta disponibilité et pour tous tes conseils, j'ai beaucoup appris avec toi.

Je remercie également les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail, Dr. Andreas Niebel, Dr Marie-Noëlle Rosso, Dr. Christine Lelandais-Brière, Dr Sébastien Cunnac et Pr. Paola Furla.

Je remercie Marc Magliano pour m'avoir accueilli dans le labo et pour son investissement dans les étapes du projet qui n'étaient pas les plus faciles. Merci d'avoir ramassé des dizaines et dizaines de galles minuscules pendant de nombreux mois avant mon arrivée et même après ! J'ai eu la chance de bénéficier de ton savoir faire inépuisable, c'est rassurant de savoir que tu as toujours une solution à tout ! Je te souhaite le meilleur dans ta nouvelle équipe et avec Olivia et vos deux petites merveilles.

Je remercie Martine Da Rocha pour m'avoir enseigné les bases de la bioinformatique avec tant de patience. J'étais novice en arrivant ici et grâce à ta pédagogie et à disponibilité, je repars avec des bases en bioinformatiques et une envie de découvrir un peu plus cette discipline. J'espère que je n'ai pas été une élève trop pénible, en tout cas je ne pouvais pas rêver meilleur professeur ! J'en profite pour remercier également Corinne Rancurel qui m'a secouru un jour de « rm » intempestif ...

Je remercie également Alizée Raptopoulo pour l'abnégation dont elle a fait preuve lors des comptages des tests de résistance. J'ai conscience de l'énorme contribution que tu as apportée à ce projet sur une partie qui était assez fastidieuse. Tu m'as impressionné par ton optimisme, ta rigueur et par le fait que je ne t'ai jamais entendu te plaindre de ces test de résistance, un exploit !

Je remercie Benoit Revel et Alexandra Cremades pour votre aide dans ce projet. J'espère que vous avez pris plaisir à travailler sur nos problématiques et dans notre équipe et je vous souhaite une bonne continuation à tous les deux.

Je remercie également Nathalie Marteu pour la production de nématodes. Je suis désolée si je t'ai rendu un peu folle avec mes commandes de J2 plus ou moins aléatoires en tout cas c'était un plaisir de travailler avec toi. Et puis nous t'attendons pour monter notre boîte de production de nématodes : Nemastar !

Merci à Olivier Pierre pour la formation à la microscopie confocale qui nous a permis de faire de belles images. Ta passion pour la microscopie est communicative et rend le microscope confocal et tous ses paramètres moins effrayant !

Je remercie Sébastien Cunnac de l'IRD de Montpellier pour m'avoir aidé à mieux comprendre Shortstack et pour tous ses conseils toujours avisés.

Je remercie la plateforme de séquençage et en particulier Kevin Lebrigand et Virginie Magnone pour le séquençage des petits ARN et leur disponibilité lors du traitement des données.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse, Christine Lelandais-Brière et Nicolas Bouché pour leurs conseils précieux et les discussions autour de ce projet.

Je remercie nos collaborateurs Carolina Escobar et Javier Cabrera de l'Université de Tolède en Espagne, pour leurs conseils et discussions enrichissantes autour de nos projets communs.

Je remercie Laetitia Zurletto et Michaël Quentin pour leurs conseils, les discussions que l'on a partagé et leur bonne humeur au quotidien. Je suis très admirative du travail d'enseignant chercheur que vous faites et de l'investissement que vous mettez dans ces deux pans de votre travail. J'ai vraiment apprécié ces moments au labo et à l'université avec vous.

Je remercie également les chercheurs de l'équipe IPN : Caroline Caporalino, Daniel Esmenjaud, Janice de Almeida Engler, Etienne Danchin, Marc Bailly-Bechet et Philippe Castagnone pour leur accueil dans l'équipe et pour les discussions scientifiques (et non scientifiques) échangées.

Je n'oublie pas évidemment tous les techniciens, assistant ingénieur et ingénieur de l'équipe, Ariane Fazari, Cyril Vanghelder, Ulysse, Karine Mulet. Et un merci tout particulier à Chantal Castagnone, pour avoir géré les commandes dans les temps ET en catastrophe. Merci également pour tout ce que tu fais pour l'équipe IPN en dehors de tes responsabilités, cela montre bien ta grande générosité !

Je remercie les thésards de l'équipe IPN et toutes les personnes qui sont restées quelques temps parmi nous. My et Nghia, je pense bien sûr à vous en cette fin de thèse, je garde de bons souvenirs de ces années avec vous et je vous souhaite le meilleur pour la suite. Christina et Cédric, merci pour votre bonne humeur et votre enthousiasme, vous avez été de vrai bol d'air frais au quotidien.

Loris, il y a maintenant plus de 5 ans que l'on se suit. Je suis contente d'avoir partagé cette aventure de thèse avec toi. Tellement de rires, de confidences, de rêves culinaires et de perplexité face à notre quotidien de doctorant ! Merci pour tes blagues et jeux de mots en tout genre que j'ai allégrement noté entre -2 et 2/20 mais c'était pour te pousser à l'excellence ! Je te souhaite une belle carrière et d'être heureux où que tu sois.

Je remercie également les enseignants chercheurs que j'ai côtoyés au cours de mon monitorat et mon année de demi-ATER pour m'avoir formé et pour votre constante bonne humeur. Il est important de savoir transmettre et vous m'avez donné les clefs pour le faire. Merci donc à Anne-Violette Lavoisier, Lorraine Bottin, Pierre Frendo et Karine Mandon. Et merci également à Jean-François et Luisa pour votre disponibilité à nos demandes incessantes de matériel.

Merci à Agnès, Naima, Valérie, Sandrine, Jo-yanne, et Marie-Line pour toutes ces discussions farfelue, ces rires et ces moments partagés autour d'un café. Marie-Line merci de m'avoir secouru lors d'une chute malencontreuse de plateau de la cantine, d'un peu plus je ne passais pas la nuit !

Sophie, je suis ravie de t'avoir rencontré ici. Merci pour ces repas et cafés partagés qui m'ont beaucoup apaisé. Je te remercie aussi de m'avoir tenue compagnie en salle de rempotage de transgénèse ! Ta force tranquille aura réussi à rendre plus agréables des moments un peu laborieux. Je te souhaite que de bonnes choses pour la suite à Laurent et à tes deux petits aussi.

Je remercie également les thésards que j'ai côtoyés au quotidien et qui se sont embarqués dans l'aventure de la thèse. Merci Chami et Antoine pour avoir assuré des moments de décompression et des moments de soutien (et pardon pour la compil' dans la voiture). Merci à Laïla pour ce beau fou rire devant notre premier opéra. Merci à Danila et Ana pour leur bonne humeur contagieuse et leur sourire permanent typiquement brésiliens. Merci à Lucie et Camille pour ces grands moments d'enseignement partagés et à Geoffrey pour son soutien notamment le weekend au labo !

Je remercie mes trois fantastiques Anaël Marchand, Justine Lipuma et Mathilde Clément pour m'avoir soutenu tout au long de cette thèse. Merci pour tous ces moments partagés remplis de bonne humeur, de bons vins, de bonne bouffe et de beaucoup de photos ! Il y eut des moments vraiment épiques et je souris en y repensant. J'ai la tête rempli de bons souvenirs avec vous et je vous souhaite que de bonnes choses à tous les trois.

Je remercie Olivia Magliano et Aurélie Séassau (le duo de choc !) pour m'avoir aussi bien accueilli et intégré parmi vous. Merci pour votre bonne humeur, votre joie de vivre et votre grand sens de l'anticipation et de la mesure (je ne donnerai pas d'exemples promis). Je vous souhaite que de bonnes choses pour la suite.

Je tiens à remercier Elodie Lecoq-Naessens pour tout. Je suis très émue en écrivant ces quelques lignes car tu as été un vrai pilier pour moi dans cette thèse. Un soutien moral, une confidente et mon amie avant tout. On a partagé beaucoup de choses pendant ces 4 ans (bon surtout des choses qu'on n'avait pas envie de faire ok, je te le concède !). Si la passerelle pouvait parler, elle aurait des tas de choses à raconter mais surtout beaucoup de rires, et peut être qu'elle nous a entendu râler « parfois ». Je te souhaite que de bonnes choses dans ton nouveau boulot et avec Sébastien. De toute façon il n'y a pas d'au revoir entre nous mais que des à très vite!

Merci aussi à Kelly pour ces moments de décompression autour d'un mojito, d'un sex on the beach ou d'un sushi !

Je remercie Thomas Knobloch pour son soutien et ses conseils et pour ses colis de ravitaillement qui m'ont permis de mieux traverser la dernière ligne droite.

Alice et Emilie, merci pour votre soutien pendant cette thèse, je suis contente que l'on ait toujours trouvé un petit moment pour se voir et pour se raconter nos vies. Et j'espère que l'on fera des petits voyages ensemble comme au bon vieux temps ! Je vous souhaite un bel avenir à toutes les deux.

Aurélie et Lisa, merci d'être toujours présentes et ce depuis plus de 12 ans maintenant ! Et même si l'on ne s'est pas vu souvent pendant ma thèse, j'ai souvent pensé à vous.

Elsa, merci d'avoir partagé avec moi ce quotidien de doctorant, je te souhaite de t'éclater dans ta thèse et d'entamer une belle carrière. Et je te souhaite évidemment beaucoup de bonheur avec Céline.

Je remercie également mes amies Ambre Leroy et Marine Bassoul. « La véritable amitié ce n'est pas d'être inséparables, c'est d'être séparés et que rien ne change », vous avez donné raison à ce dicton. Merci pour votre amitié depuis 8 ans maintenant et pour tous ces bons souvenirs. Marine, merci de m'avoir accueilli lors des virées à Montpellier, d'être à l'écoute et de m'avoir chouchouté. Ambre, je ne sais pas comment te remercier, tu as été d'un soutien incroyable. Toutes ces heures à discuter par messagerie instantanée de tout et de rien m'ont beaucoup aidé. Ton positivisme, ton humour, ta générosité, ton amitié, je ne saurais pas comment j'aurais fait sans, merci encore. Les filles, je vous souhaite encore de belles années d'amitié.

Je tiens particulièrement à remercier tous les membres de ma famille pour leur soutien. J'ai conscience de la chance que j'ai d'avoir une famille comme vous. Je remercie tout particulièrement mes grands parents qui ont fait ce que je suis aujourd'hui et mais qui me rappellent également où sont mes racines.

Je remercie ma sœur, Céline, mon rayon de soleil. Quelle chance d'avoir une sœur comme toi, si pétillante, intègre, quelqu'un de bien sur qui l'on peut compter. Merci de m'avoir soutenu comme tu le fais depuis toujours, d'être là dans les bons comme dans les mauvais moments. Tu me donnes envie de donner le meilleur de moi-même. Ne change pas ma mike, garde ton rire si communicatif et ta joie de vivre. Je remercie également Thomas qui bien sur fait partie de nos vies maintenant.

Je remercie mes parents Charles & Monique sans qui je ne serais pas arrivée jusque là. Merci d'avoir cru en moi, parfois plus que moi même. Merci pour votre infallible soutien et de m'avoir porté jusqu'ici. Merci Maman pour ces longues conversations au téléphone, tu sais écouter et conseiller avec beaucoup de sagesse, et ça ce n'est pas donné à tout le monde. Grace à vous je sais où je vais mais je sais aussi d'où je viens et j'en suis très fière. J'ai une chance incroyable d'avoir des parents comme vous et j'espère vous rendre un jour autant que ce que vous m'avez donné. Cette thèse, c'est aussi un peu la vôtre.

Je dédie cette thèse à ma grand-mère Claudine Cubells Seguy. Je ne doute pas que tu auras été très fière.

Un grand merci à tous !

ABREVIATIONS

- ADF	« ACTIN POLYMERIZING FACTOR »
- ABA	Acide Abscissique
- ADN	Acide Désoxyribonucléique
- ADNt	ADN de transfert
- AFLP	« Amplification Fragment Length Polymorphism »
- AGO	ARGONAUTE
- ARF	« AUXINE RESPONSE FACTORS »
- ARN	Acide ribonucléique
- ARNi	ARN interférent
- ARNm	ARN messenger
- Avr	Avirulence
- BAK1	« BRASSINOSTEROID-ASSOCIATED KINASE 1 »
- CCS	« CELL CYCLE SWITCH 52A1/52B »
- CDK	« CYCLIN-DEPENDENT KINASE »
- CMT	CHROMOMETHYLASE
- CUC	« CUP-SHAPED COTYLEDON »
- DAMP	« Damaged Associated Molecular Patterns »
- DCL	Protéines DICER-like
- DRM2	« DOMAINS REARRANGED METHYLASE 2 »
- dsRBD	Domaine de liaison à l'ARN double brin
- easiARN	siARN épigénétiquement activés
- EMS	Méthanesulfonate d'éthyle
- EST	« Expressed sequenced tag »
- ET	Ethylène
- ETI	« Effector Induced Immunity »
- GA	Acide Gibbérellique
- GRF	« GROWTH REGULATING FACTOR »
- GUS	β -glucuronidase
- hc-siARN	Heterochromatic siARN
- HEN1	« HUA ENHANCER 1 »
- hpARN	« hairpin » ARN
- HR	Réponse d'hypersensibilité
- HST	« EXPORTIN 5 HOMOLOG HASTY »
- HYL1	« HYPONASTIC LEAVES 1 »
- J2	Larve de second stade
- JA	Acide Jasmonique
- Jai	Jour après inoculation
- KRP	« KYP RELATED GENES PROTEINS »

- LBD16 « LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN FAMILY 16 »
- LCR « *LEAF CURLING RESPONSIVENESS* »
- LOX « LIPOXYGENASE »
- MAP65-3 « MICROTUBULE- ASSOCIATED PROTEIN65-3 »
- MAPK « MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE »
- miARN microARN
- NAMP « Nematode associated molecular patterns »
- nat-siARN natural antisense-siARN
- NB-LRR « NUCLEOTIDE BINDING-LEUCINE-RICH REPEAT »
- NGS « Next Generation Sequencing »
- NLS Signal d'adressage nucléaire
- NPR1 « NON EXPRESSOR OF PR GENE 1 »
- PAD4 « PHYTOALEXIN DEFICIENT 4 »
- PAMP « Pathogens Associated Molecular Patterns »
- PAZ « PIWI/ARGONAUTE/ZWILLE »
- phasiRNAs siARN phasé
- PoIV-RdDM « PoIV-RNA-directed DNA methylation »
- PR « PATHOGENESIS-RELATED »
- PRR « Pattern Recognition Receptor »
- PTGS « Post-Transcriptional Gene Silencing »
- PTI « Pamp Tiggerred Immunity »
- RdDM « RNA-directed DNA methylation »
- RDR ARN polymérase ARN dépendante
- RHL1 « ROOT HAIRLESS 1 »
- RISC « RNA Induced Silencing Complex »
- RLK « Receptor Like-Kinase »
- RPE D-RIBULOSE-5-PHOSPHATE 3-EPIMERASE
- SA Acide Salicylique
- SAM « Shoot Apical Meristem »
- SDC « SUPPRESSOR OF *drm1 drm2 cmt3* »
- SE « SERRATE »
- siARN « small interfering » ARN
- SSH « Hybridation Suppressive Soustractive »
- tasiRNA « Trans-acting siRNA »
- TGS « Transcriptional Gene Silencing »

Sommaire

Introduction	3
1. Les nématodes	3
2. Les nématodes parasites de plantes	4
2.1. Les nématodes endoparasites sédentaires : les Heteroderidae.	5
2.2. Le cycle biologique des Heteroderidae	6
2.3. Les effecteurs du parasitisme des nématodes à galles	8
3. De la cellule vasculaire à la cellule géante	15
3.1. Formation : études morphologiques des cellules géantes et syncytium.	15
3.2. Mécanismes moléculaires de la formation des cellules géantes	17
4. Les petits ARN chez les plantes	31
4.1. Mécanisme général de l'extinction de gènes ou « gene silencing »	31
4.2. Les principaux acteurs de la régulation de l'expression génique par les petits ARN	32
4.3. Les petits ARN non codant chez les plantes	34
4.4. Rôle des petits ARN non codant dans le développement de la plante	40
4.5. Les petits ARN non codant dans les interactions plantes-microorganismes	45
 Objectifs de la thèse : Caractérisation des petits ARN régulateurs impliqués dans la formation des galles induites par les nématodes phytoparasites du genre <i>Meloidogyne</i>	58
 Chapitre 1 : Caractérisation des miARN d'<i>A. thaliana</i> dans les galles induites par les nématodes à galles du genre <i>Meloidogyne</i> spp.	60
Résultats complémentaires à l'article 1 : Characterisation of microRNAs from Arabidopsis galls highlights a role for miR159 in the plant response to the root-knot nematode <i>Meloidogyne incognita</i>	87
Données complémentaires: "Differentially expressed small RNAs in Arabidopsis galls formed by <i>Meloidogyne javanica</i> : a functional role for miR390 and its TAS3-derived tasiRNAs".	89
 Chapitre 2 : Caractérisation des siARN d'<i>A. thaliana</i> dans les galles induites par <i>M. incognita</i>.	91
Résultats complémentaires à l'article 2 : Caractérisation des siARN d' <i>A. thaliana</i> dans les galles induites par <i>M. incognita</i>	111

Discussion générale	111
1. La régulation de la reprogrammation transcriptomique dans les galles induites par les nématodes à galles : choix de la problématique.....	112
2. La machinerie petits ARN et l'interaction plantes nématodes.....	113
3. Caractérisation des miARN et des siARN : problématique et choix des outils d'analyses.	115
3.1. Les miARN : des acteurs de la régulation plante – nématodes à galles.	117
3.2. Analyse fonctionnelle des miARN régulés.....	122
4. miR159 un nouvel élément de l'interaction plante - nématodes à galles.	123
5. Accumulation différentielle des siARN dans les galles induites par les nématodes à galles.	124
Conclusions & Perspectives	131
Références Bibliographiques	136
Annexes	164

Introduction

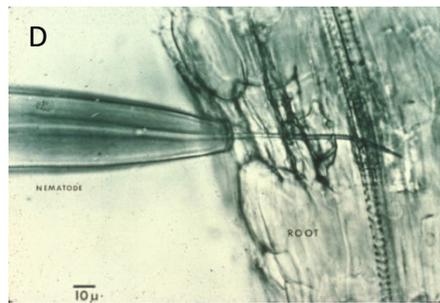
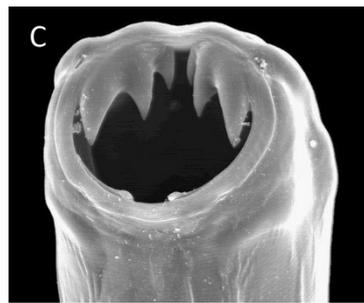
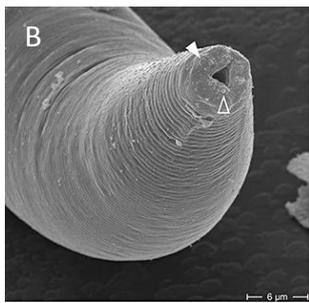
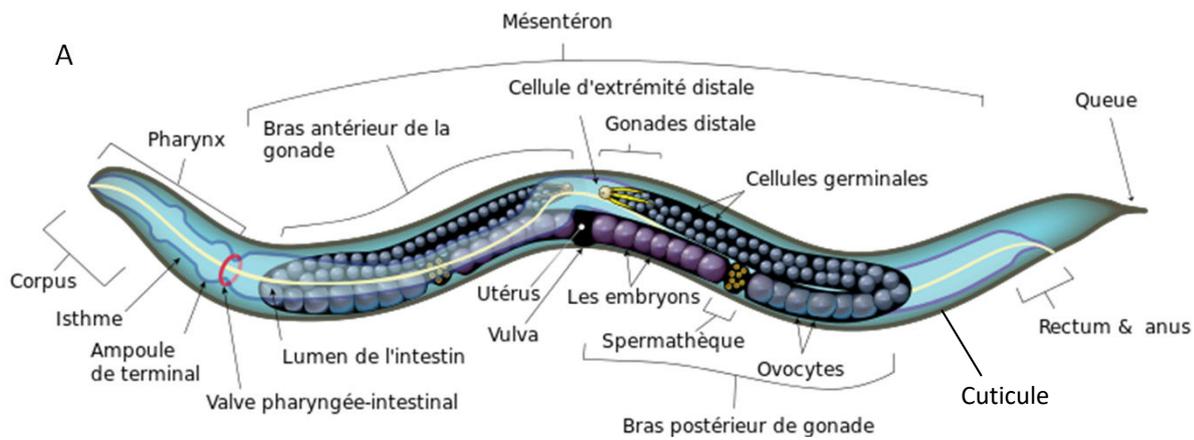


Figure 1 : Présentation des nématodes.

A. Structure morphologique générale d'un nématode (section longitudinale) (Auteur: K.D. Schroeder).

B-D. Diversité des nématodes: exemple des pièces buccales.

B. Nématode de vie libre du sol: l'organisme modèle *C. elegans* se nourrissant de bactéries (photo de Schulenburg et al. 2007).

C. Nématode parasite d'animaux: le nématode *Ancylostoma duodenale* s'accroche à la muqueuse intestinale grâce à ses crochets buccaux pour s'alimenter (photo de Jay Reimer).

D. Nématode parasite de plante: le nématode *Xiphinema index* possède un stylet protractile lui permettant de prélever le contenu cytoplasmique des cellules végétales (photo de NC State University).

Introduction

1. Les nématodes

Les nématodes sont des vers ronds non segmentés présentant une symétrie bilatérale et radiale (Fig. 1A). Ils ne possèdent ni appareil respiratoire, ni appareil circulatoire mais sont cependant pourvus d'un tube digestif complet. Leur aspect vermiforme est dû à leur hydrosquelette, un compartiment fermé délimité par une enveloppe cuticulaire rigide remplie d'un liquide interstitiel incompressible. Cette cuticule est perméable et permet au nématode de respirer par échanges gazeux passifs à travers des pores. Les nématodes ont un fourreau musculaire leur permettant de se contracter et donc de se mouvoir par ondulation. Leur système nerveux est essentiellement composé d'un anneau péri-œsophagien relié à plusieurs ganglions nerveux moteurs et sensitifs (Platel, 1992). Les nématodes possèdent des organes sensoriels situés à l'extrémité antérieure, les amphides, et postérieure, les phasmides.

La biodiversité des nématodes est remarquable, le nombre d'espèces de nématodes décrites comptait 26 646 espèces en 2011 (Hugot *et al.*, 2001). Les nématodes ont conquis une multitude d'habitats et peuvent être scindés en fonction de leur mode de vie : libre et parasitaire. Les nématodes libres dans le sol et dans l'eau comprennent les espèces fongivores, saprophages-bactériophages comme *Caenorhabditis elegans* (Fig. 1B) ou prédatrices (e.g. ordre des *Mononchida* prédateur d'autres espèces de nématodes). Les nématodes parasites comprennent les espèces parasites de vertébrés (e.g. *Ancylostoma duodenale*, parasite de l'homme) (Fig. 1C), parasites d'invertébrés (e.g. *Steinernema feltiae*, parasite d'insectes) ou parasites de plantes (e.g. *Xiphinema index*, parasite de la vigne) (Fig. 1D et 2B). Les nématodes parasites d'animaux impactent la santé humaine, celle de la faune sauvage et d'élevage. Ils sont généralement de grande taille ; de 4 à 10 cm de long pour *Wuchereria bancrofti* responsable de lésions éléphantiasiques chez l'Homme ou pour *Toxocara cati* parasite du chat. Les nématodes parasites d'invertébrés, en majorité parasites d'insectes peuvent être utilisés en lutte biologique en tant qu'auxiliaires pour lutter contre les ravageurs. C'est le cas par exemple de *Steinernema carpocapsae* qui parasite le lépidoptère *Paysandia archon* ravageur du palmier (Perez *et al.*, 2010). Les nématodes parasites de plantes dits « phytoparasites » sont de tailles plus réduites (de l'ordre d'une centaine de micromètres à plusieurs millimètres) et seront décrits en détail dans le chapitre suivant.

Quel que soit leur mode de vie et leur niche écologique, l'activité et la survie des nématodes dépend de la présence d'un milieu aqueux qui peut se matérialiser par un filet d'eau dans le sol ou encore les fluides corporels.

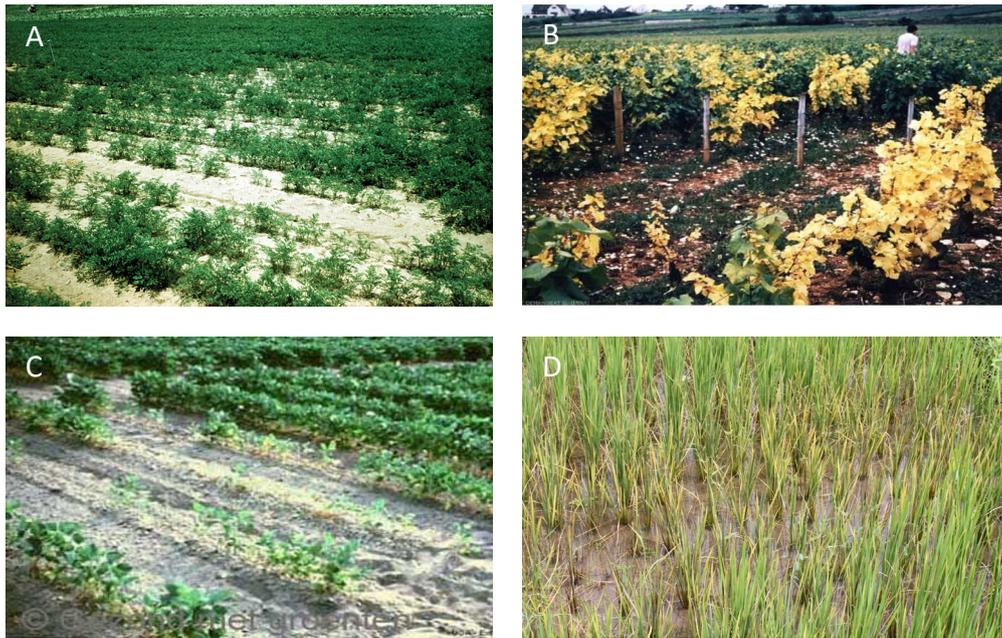


Figure 2 : Symptômes au champ d'infections par des nématodes parasites de plantes.

- A. Infection par *Pratylenchus* spp. sur carottes.
- B. Infection par *Xiphinema* spp. sur vigne.
- C. Nématodes à kystes sur soja.
- D. *Meloidogyne graminicola* sur riz.

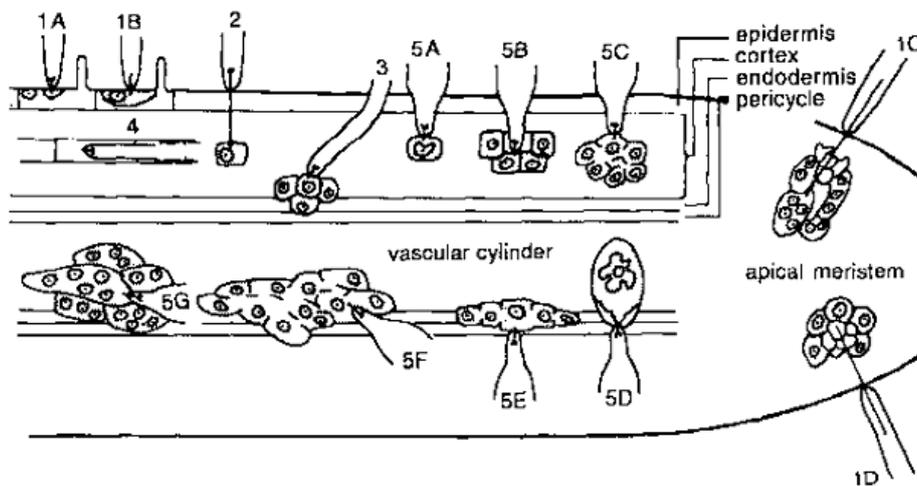


Figure 3 : Les différents modes de parasitismes des nématodes parasites racinaires.

1: Nématodes migrateurs ectoparasites. 1A, *Tylenchorhynchus dubius*; 1B, *Trichodorus* spp.; 1C, *Xiphinema index*; 1D, *Longidorus elongates*.

2: Nématodes sédentaires ectoparasites: *Criconemalla xenoplax*;

3: Nématodes ectoendoparasites: *Helicotylenchus* spp.

4: Nématodes migrateurs endoparasites: *Pratylenchus* spp.

5: Nématodes sédentaires endoparasites. 5A, *Trophotylenchulus obscurus*; 5B, *Tylenchulus semipenetrans*; 5C, *Verutus volvingentis*; 5D, *Cryphodera utahensis*; 5E, *Rotylencholus reniformis*; 5F, *Heterodera* spp.; 5G, *Meloidogyne* spp.

Les zones de nutrition et/ou les sites de nutrition des différentes catégories de nématodes parasites racinaires sont également présentés.

(D'après Sijmons et al. 1994)

2. Les nématodes parasites de plantes

Les nématodes parasites de plantes sont des parasites biotrophes obligatoires qui infectent principalement les racines mais peuvent également attaquer les parties aériennes de la plante provoquant d'important dégâts au champ (Fig. 2). Les nématodes parasites de plantes peuvent se subdiviser selon leur mode de parasitisme : ecto- ou endoparasites, migrateurs ou sédentaires (Fig. 3). Les différents cas de Figures sont présentés ci-dessous :

Les nématodes ectoparasites (*ecto-* : à l'extérieur) restent à l'extérieur des racines et se nourrissent depuis le sol en insérant leur stylet généralement dans les couches cellulaires les plus externes de la racine. Les ectoparasites migrateurs s'alimentent le long de la racine (e.g. *Macrotrophurus*, *Tylenchorhynchus*) alors que les ectoparasites sédentaires ponctionnent la racine à partir d'un site spécifique (e.g. *Rotylenchus*). Outre le prélèvement répété de nutriments, les nématodes ectoparasites migrateurs sont capables de provoquer des dégâts secondaires du fait de la transmission de virus, comme les virus du court noué de la vigne transmis par les nématodes du genre *Xiphinema* spp. (*X. index* et *X. diversicaudatum*) (Fig 1D et 2B).

Les nématodes endoparasites (*endo* : à l'intérieur) réalisent l'essentiel de leur cycle de vie à l'intérieur de la plante. Les espèces migratrices (e.g. genres *Pratylenchus* et *Hirshmanniella*) se nourrissent au sein du système racinaire ou des parties aériennes alors que les nématodes endoparasites sédentaires ont un comportement parasitaire complexe. Ils sont capables d'induire la formation d'un site nourricier à partir duquel ils s'alimentent en continu (e.g. *Meloidogynidae*, *Heteroderinae*, *Nacobus*).

Les nématodes endoparasites et ectoparasites de plantes se nourrissent à partir de la plante grâce à une pièce buccale appelée le stylet leur permettant de perforer la paroi cellulaire des cellules végétales et d'aspirer le contenu cellulaire (Fig. 4). Ils peuvent également injecter dans les tissus de la plante, via ce stylet, des molécules synthétisées dans les glandes œsophagiennes.

La phylogénie des nématodes présentée en Figure 5 se réfère à l'arbre phylogénétique basé sur la séquence ADN de la plus petite sous unité du ribosome établi par van Megen *et al.* (2009). Cet arbre phylogénétique contient 12 clades. La capacité à parasiter des végétaux est apparue indépendamment dans trois clades : les Tylenchomorpha, les Dorylaimoda et les Triplonchida (Holterman *et al.*, 2006) (Fig 5A). Les ordres des Dorylaimoda (e.g. famille des Longidoridae, genre *Xiphinema*) et des Triplonchida (e.g. famille des Trichodoridae, genre *Trichodorus*) ne comprennent que des nématodes ectoparasites. Les Tylenchomorpha comprennent la majorité des espèces de

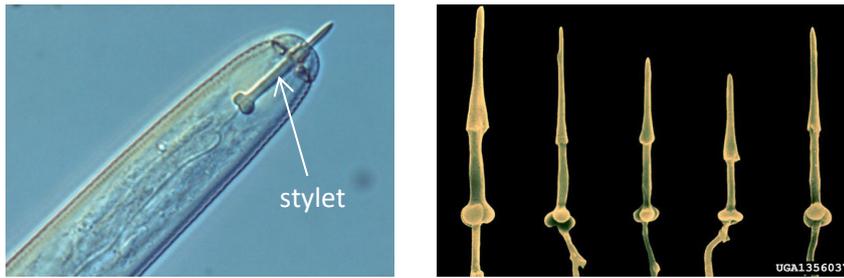


Figure 4 : Stilet de nématodes parasites de plantes (*Meloidogyne arenaria*).

Le stilet est un organe qui permet aux nématodes parasites de plantes de sécréter des molécules dans la cellule végétale mais également de ponctionner du contenu cellulaire pour sa nutrition.
(Source: University of California agriculture and natural resources)

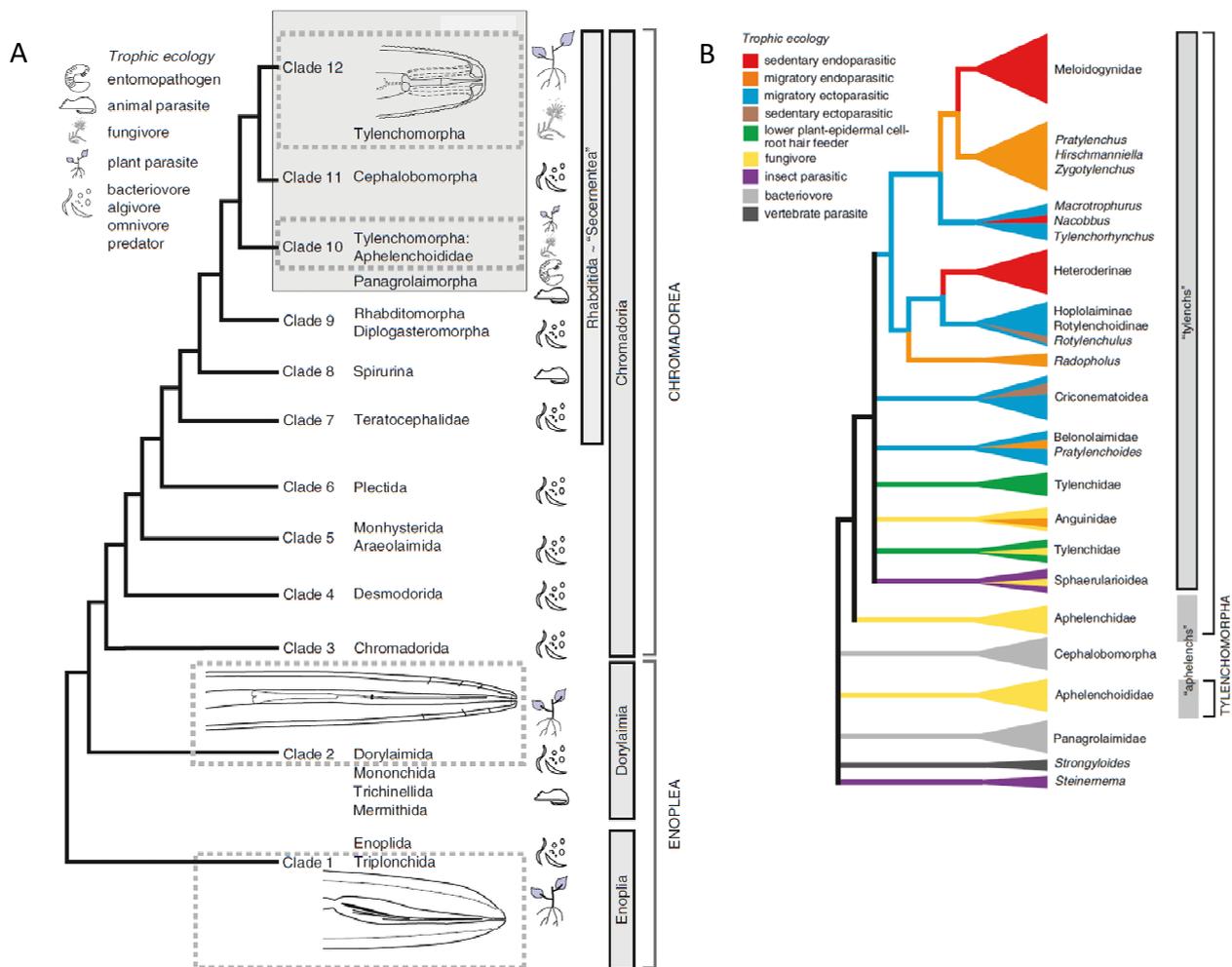


Figure 5 : Schéma général de l'évolution du phylum Nematoda basée sur la séquence ADN de la petite sous unité ribosomique.

A. Les lignées majeures contenant les nématodes parasites de plantes sont représentées par les cadres en pointillés (Tylenchomorpha, Dorylaimida, Triplonchida). L'ordre des Tylenchomorpha est probablement un groupe polyphylétique car il inclut les membres du clade 12 et les Aphelenchoididae, une famille du clade 10. (D'après Holterman et al. 2006)

B. Evolution des modes de parasitisme chez les Tylenchomorpha associée à l'arbre phylogénétique basé sur les séquences ADN de la petite sous unité ribosomique. (D'après de Bert et al. 2008 et Holterman et al. 2009).

nématodes parasites de plantes et comprend des nématodes endo- ou ectoparasites, migrateurs ou sédentaires, parasites des parties foliaires ou, principalement, des racines (Fig 5B). Je m'intéresserai par la suite plus particulièrement au groupe des Heteroderidae. Ce groupe de nématodes endoparasites sédentaires inclue les espèces responsables de pertes majeures en agriculture. Leur impact économique a justifié le développement de nombreux projets de recherche afin de mieux comprendre leur biologie et les mécanismes qui régissent l'établissement du parasitisme.

2.1. Les nématodes endoparasites sédentaires : les Heteroderidae.

Le groupe des Heteroderidae comprend deux sous-familles : 1) Les Heteroderinae représentés par les nématodes à kystes des genres *Heterodera* spp, *Globodera* spp, *Cactodera* spp et *Punctodera* spp et 2) les Meloidogyninae qui comprennent les nématodes à galles du genre *Meloidogyne* spp. (De Ley & Blaxter, 2002; Escobar & Fenoll, 2015). L'ensemble des espèces des Heteroderidae ont la capacité d'induire la formation de sites nourriciers dans les racines infestées perturbant la circulation de la sève (Fig. 6) et provoquant des symptômes sur la plante tels qu'une réduction de la croissance de la plante infestée, une chlorose des feuilles, un rendement fruitier plus faible et un affaiblissement généralisé des parties aériennes. La détection de la présence d'une infection par les nématodes parasites racinaires et notamment les Heteroderidae est souvent difficile d'une part en raison de la localisation racinaire des symptômes caractéristiques et d'autre part en raison des symptômes aériens qui peuvent s'apparenter à une carence nutritionnelle ou un stress abiotique.

2.1.1. Les nématodes à galles

Les Meloidogyninae ou « nématodes à galles » représentés par le genre *Meloidogyne* (Fig. 7A) comprennent en 2013, 98 espèces réparties sur toute la surface mondiale (Jones *et al.*, 2013). Le signe visible de l'infection par les nématodes à galles est l'apparition de renflements au niveau du système racinaire, appelés galles, témoignant du développement du site nourricier (Fig. 6). Les nématodes à galles ont une très large gamme d'hôtes, comprenant plus de 5500 espèces incluant la quasi-totalité des espèces cultivées en particulier les espèces des cultures maraichères et fruitières (Blok *et al.*, 2008). Parmi les nématodes à galles certaines espèces sont extrêmement polyphages alors que d'autres présentent un spectre d'hôtes réduit. De plus ces nématodes peuvent se reproduire par reproduction sexuée, par parthénogénèse mitotique stricte ou par parthénogénèse méiotique facultative (Moens *et al.*, 2011). La parthénogénèse mitotique stricte consiste en une seule division cellulaire non réductionnelle avec maintien du nombre de chromosomes. Lors de la parthénogénèse méiotique facultative, les ovules peuvent être fécondés par le mâle et dans le cas



Figure 6 : Symptômes racinaires d'une infection par les nématodes endoparasites sédentaires

A. Racine de tomate infectée par *M. incognita*

B. Racine de concombre infectée par *M. incognita*

C. Racine de haricot infectée par *M. incognita*

D. Racine de carotte infectée par *H. carotae*

Les flèches pointent les symptômes racinaires (galles).



Figure 7 : Nématodes à galles (à gauche) et à kystes (à droite)

A. Larve de *M. incognita* (photo de Dr. D. M. Bird, NC State University, Dept. of Plant Pathology)

B. Larve d' *H. schachtii*

contraire la méiose est dite modifiée avec absence de la seconde division méiotique. En théorie la reproduction sexuée permet une plus grande adaptation aux changements environnementaux alors que la reproduction parthénogénétique permet une reproduction plus rapide dans un environnement stable (Castagnone-Sereno *et al.*, 2013). Il est intéressant de remarquer que la corrélation entre reproduction et gamme d'hôtes chez les nématodes à galles ne suit pas ces règles théoriques. Ainsi, sur 54 espèces décrites par Jepson (1987), 32 espèces ont un spectre d'hôtes limité à une seule sous-classe de plantes, e.g. *M. pinus* restreint aux espèces du genre *Pinus spp.* Ces espèces de *Meloidogyne* à « hôte spécifique » ont une reproduction de type sexuée obligatoire (amphimictie). Plusieurs espèces tels *M. hapla* et *M. chitwoodi* peuvent se reproduire par reproduction sexuée ou par parthénogenèse méiotique (parthénogenèse méiotique facultative). Les espèces de *Meloidogyne* comme *M. arenaria*, *M. incognita* et *M. javanica* se reproduisent par pathogénèse mitotique stricte (les mâles ne participent pas à la reproduction). Ces trois espèces majeures présentent une large gamme d'hôtes et sont responsables de 90% des dégâts causés au niveau mondial (Triantphyllou, 1985).

2.1.2. Les nématodes à kystes

Les nématodes à kystes sont sous divisés en 8 genres : *Heterodera*, *Globodera*, *Cactodera*, *Punctodera*, *Betulodera*, *Paradolichodera* et *Vittatidera* (Turner & Subbotin, 2013) (Fig. 7B). Néanmoins les genres les plus importants du point de vue agronomique sont les genres *Heterodera* spp. comprenant 82 espèces et *Globodera* spp. comprenant 12 espèces. Les principales espèces étudiées sont *Heterodera schachtii* (parasite de la betterave), *H. glycines* (parasite du soja), *Globodera rostochiensis* et *G. pallida* (parasites de la pomme de terre). Le spectre d'hôte des nématodes à kystes varie selon les espèces. Steele (1965) ont testé 535 plantes parmi lesquelles 218 plantes sont des plantes hôtes d'*H. schachtii*. Un nombre important d'hôtes sont retrouvés dans la famille des *Brassicaceae* et *Chenopodiaceae* puisqu'environ 80 % de ces deux familles sont des hôtes des nématodes à kystes.

2.2. Le cycle biologique des Heteroderidae

La durée du cycle de développement des nématodes à galles peut varier entre 20 et 40 jours, selon les facteurs environnementaux tels que la température, la nature du sol et de l'espèce de plante hôte (Rohini *et al.*, 1986). Le cycle biologique des nématodes à galles se compose d'une phase exophyte (en dehors de la racine) et une phase endophyte (à l'intérieur de la racine) (Fig. 8). Le cycle démarre avec la phase exophyte où les larves juvéniles de 1^{er} stade (J1) enroulées dans l'œuf effectuent une première mue en larves de second stade (J2) libres dans le sol. Les œufs éclosent et

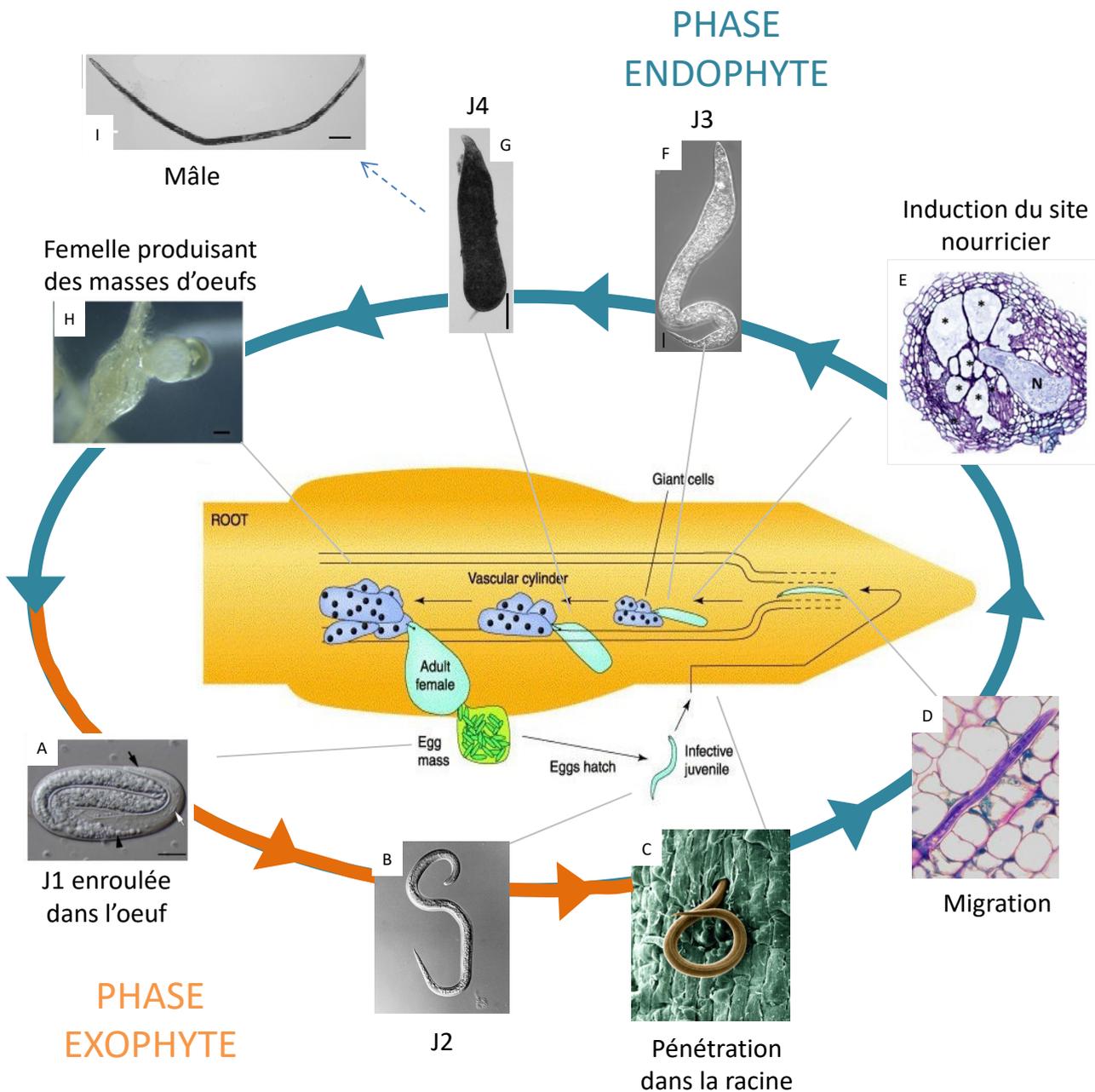


Figure 8: Cycle de vie du nématode phytoparasite *Meloidogyne incognita*.

L'embryogénèse dans l'oeuf se poursuit avec le développement des larves de premier (J1) (A). L'éclosion des œufs libèrent des larves de second stade (J2) dans le sol, le seul stade libre dans le cycle de vie avant d'infecter une autre plante (B). Présentes dans le sol, les J2 pénètrent dans la racine au niveau de la zone d'élongation (C) puis migrent de manière intercellulaire (D) jusqu'à l'apex pour ensuite remonter dans le cylindre vasculaire. Au niveau de la zone de différenciation de la racine, le nématode (N) va se sédentariser et induire la dédifférenciation de 5 à 7 cellules vasculaires en cellules géantes (*) multinucléées, et hypermétaboliques (E). Les J2 vont s'alimenter à partir de ce site nourricier puis effectuer des mues successives en J3 (F), J4 (G) et adulte femelle (H). Les J4 peuvent se développer en mâles (I) et migrer en dehors de la racine. Ses mâles ne participent pas à la reproduction. Les femelles adultes piriformes pondent des œufs à la surface de la racine. Barre: 20µm.

libèrent les J2 qui sont alors attirées vers le système racinaire de la plante hôte, probablement grâce à la perception d'exsudats racinaires (Teillet *et al.*, 2013; Williamson & Čepulytė, 2017) qu'ils perçoivent grâce aux amphides (Moens *et al.*, 2011). La phase endophyte démarre avec la pénétration des J2 au niveau de la zone d'élongation de la racine qui est suivie par une étape de migration intercellulaire au travers des tissus racinaires. La pénétration et la migration s'effectuent par des moyens mécaniques et enzymatiques. Le stylet permet de pousser et séparer la lamelle moyenne qui cimente les cellules végétales et des enzymes de dégradation de la paroi (cellulases, endoxylanases, pectate-lyases et polygalacturonases) produites par les glandes œsophagiennes et sécrétées dans l'apoplaste par le stylet (Fig. 9) permettent également de fragiliser la structure pariétale (Davis *et al.*, 2011; Moens *et al.*, 2011; Wieczorek *et al.*, 2014). Les nématodes ne migrent pas directement dans le cylindre central probablement en raison de la présence de l'endoderme à cadres de Caspary qui oppose une trop grande résistance. Les J2 migrent donc jusqu'à l'apex racinaire et effectuent demi-tour pour entrer dans le cylindre central et migrer jusqu'à la zone de différenciation où ils sélectionnent cinq à sept cellules vasculaires afin d'induire un site nourricier permanent. Les J2 injectent via le stylet au sein de ces cellules un cocktail de molécules synthétisées dans les glandes œsophagiennes. Ces molécules constituent le signal qui va entraîner de profondes modifications morphologiques : les cellules ciblées vont entrer à nouveau dans le cycle cellulaire et subir plusieurs divisions nucléaires sans cytokinèse et devenant ainsi multinucléées, hypertrophiées et métaboliquement actives. Ces cellules sont appelées cellules géantes et constituent le site nourricier. De plus, les cellules situées autour des cellules géantes et du nématode vont se diviser par mitose classique s'adaptant à l'élargissement du site nourricier (Berg *et al.*, 2008). L'ensemble de ces mécanismes aboutit à une déformation de la racine appelée « galle », symptôme caractéristique de l'infection par les nématodes du genre *Meloidogyne* (Fig. 10). Les J2 vont puiser alors les nutriments nécessaires à leur développement à partir de ce site nourricier en ponctionnant grâce au stylet le contenu des cellules géantes, et réaliser trois mues consécutives (J3, J4 et le stade adulte) (Lewis & Pérez, 2004). Les femelles piriformes ont un volume 500 fois supérieur à celui des J2 et pondent leurs œufs dans une matrice gélatineuse protectrice à l'extérieur de la racine (Sharon & Spiegel, 1993). En conditions défavorables, des individus mâles peuvent se développer. Ils migrent alors en dehors de la racine et ne jouent pas de rôle dans la reproduction des espèces parthénogénétiques strictes comme *M. incognita* (Castagnone-Sereno, 2006).

Le cycle de développement des nématodes à kystes est relativement similaire à celui des nématodes à galles puisqu'il est composé d'une phase exophyte et endophyte avec une étape de sédentarisation et une étape d'induction d'une structure nourricière. Il présente cependant quelques différences. Les exsudats racinaires induisent l'éclosion des œufs libérant ainsi les J2 dans le sol qui pénètrent alors

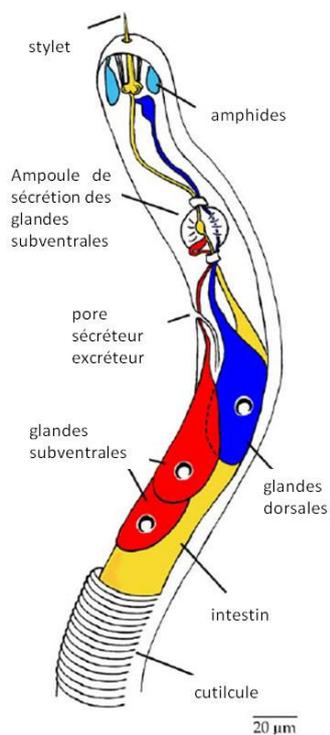


Figure 9 : Schéma anatomique de la partie antérieure d'une larve au stade J2 de *Meloidogyne* spp.
(D'après Vanholme et al. 2004)

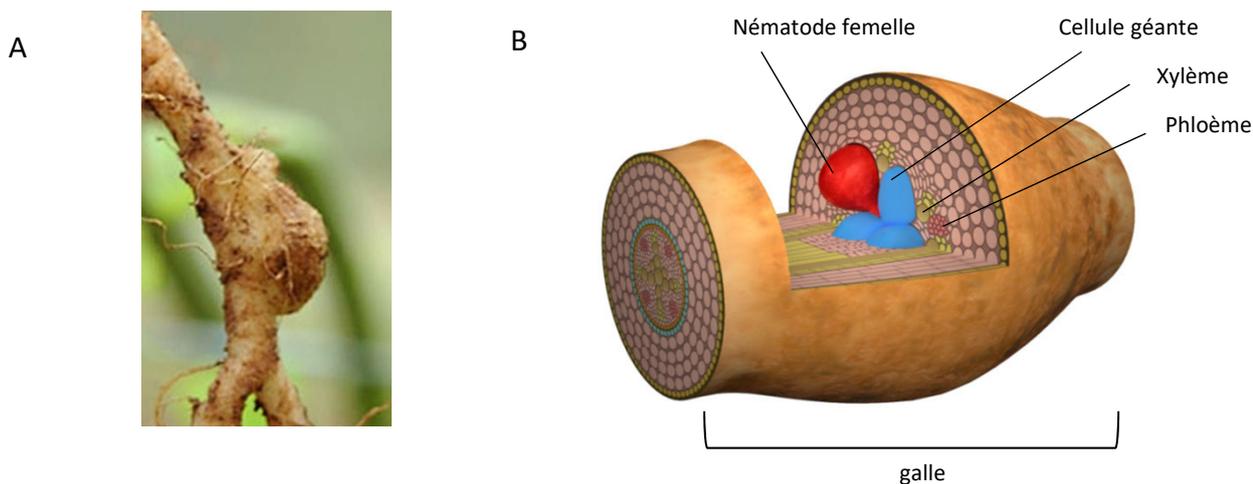


Figure 10 : Photo et représentation 3D simplifiée d'une galle induite par les nématodes à galle.

A. Galle de tomate induite par *M. incognita*

B. Représentation 3D simplifiée d'une galle En rouge la femelle nématode qui a initié le site nourricier composés de cellules géantes. (Source: Programme investissement d'avenir, MEDITES)

dans la racine et migrent de façon intracellulaire jusqu'à se sédentariser. Les J2 sélectionnent alors des cellules du parenchyme vasculaire ou cortical, ou du péricycle pour induire leur site nourricier appelé syncytium suite à la sécrétion de molécules synthétisées par les glandes œsophagiennes et injectées via le stylet dans une cellule unique (Golinowski *et al.*, 1996; Sobczak & Golinowski, 2008). L'ontogénèse du syncytium diffère des cellules géantes puisqu' il se forme par la dégradation partielle des parois et la fusion des cytoplasmes des cellules se situant autour de la cellule initialement sélectionnée par le nématode à kystes. Après induction du site nourricier, la larve J2 mue en J3 et J4 puis en adulte. Les J4 mâles ont une phase sédentaire J4 plus courte que les femelles et deviennent mobiles pour sortir de la racine et réaliser la reproduction sexuée. Les femelles produisent des œufs qu'elles conservent généralement à l'intérieur de leur organisme. Lorsqu'elles meurent la cuticule des femelles forme un kyste, une enveloppe protégeant la descendance dans le sol, ou bien plus rarement les femelles sécrètent les œufs dans une masse gélatineuse comme les nématodes à galles (e.g. *H. glycines*, (Niblack *et al.*, 2006).

2.3. Les effecteurs du parasitisme des nématodes à galles

Tout au long du parasitisme, les nématodes sécrètent des molécules dans les racines qui vont favoriser la migration et participer à l'induction du site nourricier. Le terme d'effecteur est utilisé très largement par les chercheurs travaillant sur les interactions plantes-bioagresseurs. Il est défini comme « toutes les molécules des agents pathogènes / parasites sécrétées dans l'hôte, qui modifient la structure et/ou la fonction de la cellule hôte et qui favorisent le parasitisme (Hogenhout *et al.*, 2009). L'identification des effecteurs du nématode, et de leurs cibles végétales, facteurs essentiels pour le nématode pour infecter l'hôte, ouvre les possibilités au développement de nouvelles approches de méthodes de contrôles des nématodes à galles. Les effecteurs de nématodes sont produits dans des organes de sécrétion. Ils sont ainsi produits soit par les trois glandes œsophagiennes puis sécrétés dans la plante hôte via le stylet soit par les amphides ou les glandes rectales (Fig. 9). Différentes stratégies ont été développées pour identifier et caractériser des effecteurs candidats, leur fonction biologique et les processus de la plante qu'ils manipulent. A l'heure actuelle, les fonctions et/ou cibles végétales de plusieurs effecteurs de nématodes à galles ont été caractérisées (Truong *et al.*, 2015). En revanche, à ce jour, la sécrétion *in planta* n'a été établie que pour quelques candidats. Après une présentation des stratégies d'identification des effecteurs des nématodes à galles, je détaillerai le rôle de ces molécules lors des différentes étapes de l'infection : la pénétration et la migration, la suppression des défenses de la plante et l'initiation et le maintien du site nourricier (Abad & Williamson, 2010; Kandoth & Mitchum, 2013).

2.3.1 Stratégies d'identification d'effecteurs

Trois stratégies ont été principalement utilisées pour identifier des candidats effecteurs du pouvoir pathogène des nématodes à galles: les études à l'échelle du protéome (des protéines sécrétées), du transcriptome et du génome. L'analyse fonctionnelle des effecteurs est limitée par la difficulté d'étude des nématodes à galles qui ne sont pas transformables génétiquement. Une première approche originale d'identification a été réalisée en criblant un panel d'anticorps monoclonaux pour détecter des protéines présentes dans les sécrétions ou organes de sécrétions du nématode. Cette stratégie a permis d'identifier les premières protéines ou glycoprotéines potentiellement sécrétées chez les nématodes à galles (Davis *et al.*, 1992). Elle a permis l'identification d'une première enzyme de dégradation de la paroi des plantes chez les nématodes à kystes, une β -1,4-endoglucanase (Smant *et al.*, 1998). Le développement d'une nouvelle procédure d'étude directe des sécrétions salivaires reposant sur l'utilisation d'un neurostimulant, le résorcinol, et l'analyse de protéines par électrophorèse 2D et microséquençage (Jaubert *et al.*, 2004) a permis d'identifier sept protéines abondantes dans les sécrétions de *M. incognita* dont une calréticuline et une protéine 14-3-3 (Jaubert *et al.*, 2002b, 2004). Le sécrétome de *M. incognita* a également été exploré par chromatographie liquide couplée à une analyse par spectrométrie de masse et permettant l'identification de 486 protéines sécrétées (Bellafiore *et al.*, 2008).

Les approches transcriptomiques ont ciblé dans un premier temps les glandes œsophagiennes. Des cellules de glandes œsophagiennes microaspirées ont été utilisées pour générer des banques d'ADNc qui ont alors été séquencées. Cette approche a permis d'identifier de nombreux gènes candidats effecteurs (Huang *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2004a, 2008). L'analyse des ADNc des glandes couplée à l'étude de la localisation tissulaire de ces transcrits par hybridation *in situ* et à la prédiction de peptide signal de sécrétion a ainsi permis d'identifier 37 gènes codant pour des protéines potentiellement sécrétées dont les transcrits sont localisés dans les glandes œsophagiennes subventrales (13 clones) ou dans la glande dorsale (24 clones) chez *M. incognita* (Huang *et al.*, 2003). De plus, l'analyse d'ADNc de glandes œsophagiennes de *M. javanica* a permis l'identification d'une chorismate mutase et d'une pectate lyase (Lambert *et al.*, 1999; Doyle & Lambert, 2002). Ces analyses ont été complétées par différentes approches d'analyses d'expressions différentielles comme le « cDNA AFLP » (« amplification fragment length polymorphism ») (Neveu *et al.*, 2003) ou l'hybridation suppressive soustractive (SSH) (Dubreuil *et al.*, 2007), pour identifier des gènes différentiellement exprimés entre les différents stades de développement du nématode et notamment entre les stades parasitaires et pré-parasitaires (Davis *et al.*, 2004b; Dubreuil *et al.*, 2007; Rosso & Grenier, 2011; Quentin *et al.*, 2013). Enfin récemment, le développement des nouvelles

génération de séquençage (NGS) a permis de réaliser le séquençage de transcriptomes complets. La combinaison de l'analyse *in silico* de données NGS issues de glandes œsophagiennes, de localisation de 91 transcrits par hybridation *in situ* a permis d'identifier 17 gènes de *M. incognita* codant pour des effecteurs putatifs exprimés spécifiquement dans les glandes œsophagiennes (Rutter *et al.*, 2014).

Enfin l'étude des génomes a été développée suite au séquençage en 2008 de deux génomes de nématodes à galles : *M. incognita* et *M. hapla* (Abad *et al.*, 2008; Opperman *et al.*, 2008). L'analyse *in silico* de ces génomes a permis l'identification de 19 212 et 16 676 gènes codant pour des protéines chez *M. incognita* et *M. javanica*, respectivement. Parmi les protéines chez *M. incognita*, 55% possèdent des domaines protéiques connus dont 22% sont prédites comme sécrétées (Abad *et al.*, 2008). Une méthode discriminante a permis d'identifier plusieurs motifs spécifiquement présents dans les effecteurs sécrétés connus (Vens *et al.*, 2011). Des analyses comparatives de génomes ont également permis d'identifier des gènes présents uniquement chez les nématodes parasites de plantes (Danchin *et al.*, 2013). La combinaison de l'étude des génomes et de l'analyse des fonctions protéiques a mené à l'identification d'un panel d'effecteurs putatifs qui présentent généralement un peptide signal de sécrétion et une absence de domaine transmembranaire (Roze *et al.*, 2007; Haegeman *et al.*, 2013; Danchin *et al.*, 2013). De plus, des analyses bioinformatiques de séquences protéiques ont révélé la présence de signal d'adressage nucléaire (NLS) chez plusieurs protéines sécrétées par les nématodes à galles (Huang *et al.*, 2003; Roze *et al.*, 2007; Quentin *et al.*, 2013).

L'identification d'effecteurs candidats constitue la première étape qui nécessite d'être complétée par des analyses fonctionnelles afin de déterminer le rôle de l'effecteur candidat dans le parasitisme. Les différents critères issus de l'analyse fonctionnelle permettant de déterminer si un effecteur candidat est impliqué dans le parasitisme reposent sur plusieurs analyses. La localisation de l'expression du gène candidat, e.g. par hybridation *in situ* de stades préparasitaires ou parasitaires, permet de valider qu'il est exprimé dans un organe sécréteur du nématode. La détection de la protéine au cours de l'infection constitue ensuite un élément important validant la sécrétion *in planta*. Afin d'étudier l'effet de l'inactivation de ces gènes candidats, il est possible de mettre en place une stratégie de trempage (« soaking ») des J2 dans une solution d'ARN doubles brins ou de petits ARN, qui ingérés, par les nématodes vont induire la répression du gène codant pour l'effecteur. Le succès parasitaire des nématodes traités est ensuite évalué. Il est également possible d'évaluer l'impact de la surexpression ou la répression de cet effecteur en plante sur le parasitisme. L'identification de la cible constitue également une étape cruciale pour déterminer le rôle de l'effecteur candidat et les fonctions végétales ciblées. Seules quatre cibles d'effecteurs de nématodes à galles ont été actuellement caractérisés : Mi16D10 qui cible le facteur de transcription de type SCARECROW, Mi-8D05V qui cible le gène *TIP2* codant pour une aquaporine, Mj-TTL5 qui cible un gène codant pour une

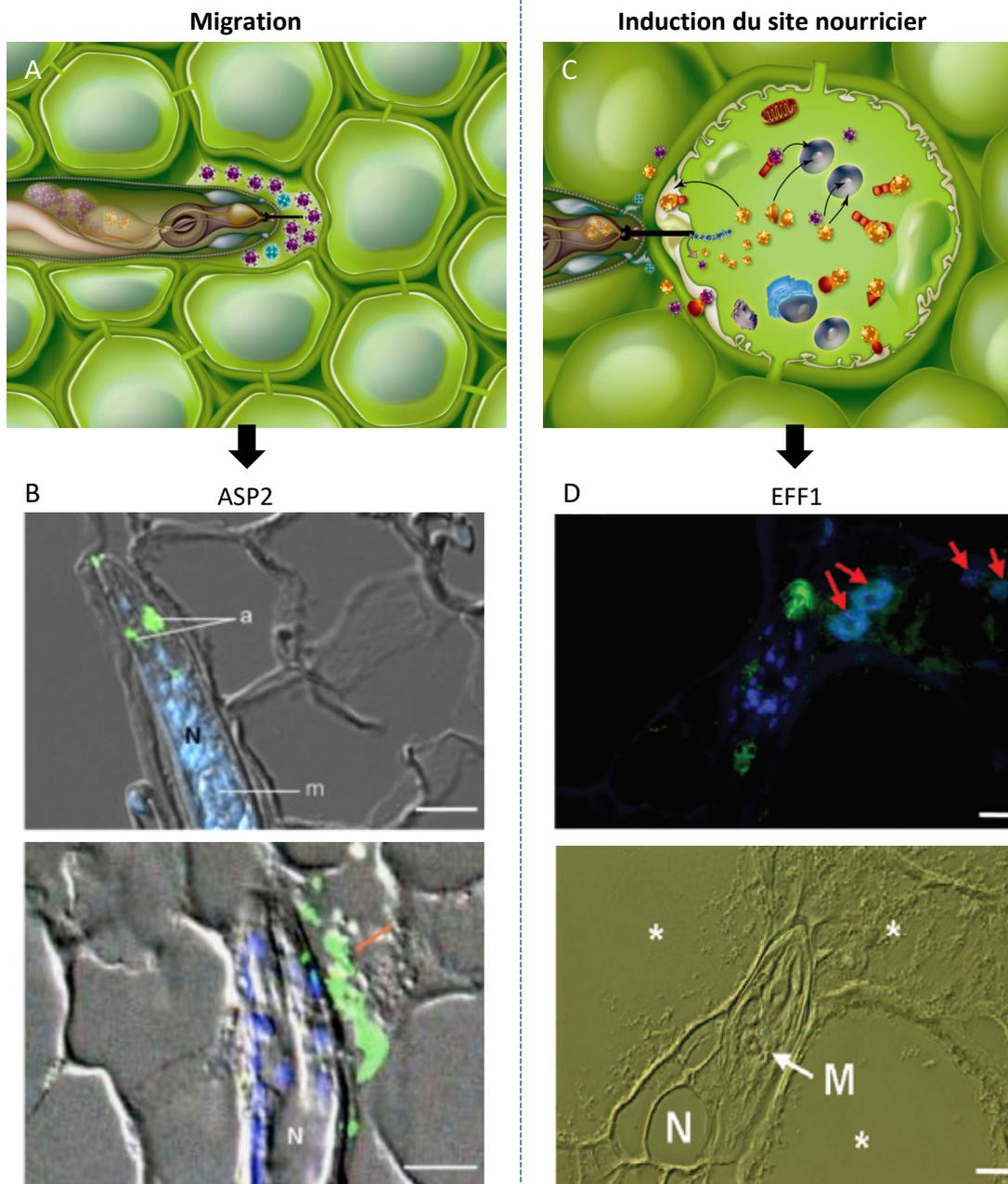


Figure 11 : Sécrétion d'effecteurs par les nématodes à galles au cours des étapes de migration et d'induction des cellules géantes.

- A. Schéma d'un nématode sécrétant des effecteurs dans l'espace inter-cellulaire lors de l'étape de migration.
- B. Immuno-détection de la protéine ASP2 dans l'apoplaste (Vieira et al. 2011).
- C. Schéma d'un nématode sécrétant des effecteurs dans la cellule végétale pour initier ou contribuer au maintien de la cellule géante.
- D. Localisation in planta de Mi-EFF1 chez la tomate. Le signal s'accumule dans les noyaux des cellules géantes (flèches rouges) et dans les glandes dorsales du nématode (Jaouannet et al. 2012).

Barre d'échelle: 10µm. *: cellules géantes, N: nématodes, M: métacorpus.

ferredoxine (*FTRc*) et Mc-1994 qui cible une papain-like cystein protease (*PLCP*) (Huang *et al.*, 2006b,a; Roze *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2013; Davies *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2016). Les effecteurs identifiés par ces différentes approches peuvent être classés en fonction de leur rôle lors de l'infection.

2.3.2 Les effecteurs impliqués dans la migration

La paroi des cellules végétales constitue la première barrière physique rencontrée par les J2 lors de la pénétration et la migration dans la racine. Les nématodes à galles ont développé un arsenal d'enzymes de dégradation de la paroi avec plus de 60 gènes regroupés en familles multigéniques codant pour des enzymes de dégradation et de modification des différents composants de la paroi (Abad *et al.*, 2008). Parmi les enzymes identifiées se distinguent les β -1,4-endoglucanase (Rosso *et al.*, 1999; Ledger *et al.*, 2006), une endo-1,4- β -xylanase (Mitrevva-Dautova *et al.*, 2006), des pectates lyases (PL3), polygalacturonases (GH28) (Jaubert *et al.*, 2002a; Huang *et al.*, 2005), des arabinases (GH43) et protéines homologues aux expansines (Roze *et al.*, 2007; Danchin *et al.*, 2010). Ces enzymes de dégradation des parois sont synthétisés dans les glandes œsophagiennes du nématode et sécrétées au cours de la migration dans la racine via le stylet (Davis *et al.*, 2011; Vieira *et al.*, 2011) (Fig. 11). Cette panoplie d'enzymes de dégradation et de modification de la paroi permettrait au nématode de fragiliser le lien entre les cellules afin de s'immiscer entre celles-ci et atteindre la zone de différenciation cellulaire de la racine. Ainsi l'inhibition par ARNi de l'expression de gènes codant pour des enzymes de dégradation de la cellulose, hémicellulose ou de la pectine altère la capacité du nématode à infecter la plante (Rosso *et al.*, 2009). La possession d'un vaste panel d'enzymes de dégradation des parois des cellules végétales est une caractéristique singulière au sein des métazoaires. Plusieurs études ont montré des similarités entre les gènes de nématodes et de bactéries. Une étude plus poussée a montré l'existence de multiples événements de transferts horizontaux de gènes de bactéries au sein du phylum Nematoda (Danchin *et al.*, 2010).

2.3.3 Les effecteurs impliqués dans la suppression des réactions de défenses

Chez les agents pathogènes de plantes, de nombreux effecteurs ont été identifiés comme suppresseur des réactions de défenses de la plante (Jones & Dangl, 2006). C'est le cas chez les bactéries où des effecteurs inhibent les défenses basales de la plante (e.g. AvrPto chez *Pseudomonas syringae* chez *A. thaliana* et la tomate) (Abramovitch *et al.*, 2006). De même, quatre effecteurs des nématodes à galles ont, à l'heure actuelle, été montrés comme jouant un rôle dans la répression des défenses de plante, la calréticuline, Mc1194, MSP40 et MjTTK5.

La calréticuline de *M. incognita* (Mi-CRT) est l'un des effecteurs-suppresseurs des défenses basales le mieux caractérisé (Jaouannet *et al.*, 2013). La calréticuline a été détectée dans les sécrétions produites *in vitro* par induction au résorcinol (Jaubert *et al.*, 2005). Cette protéine est produite dans les glandes œsophagiennes et sécrétée au cours du parasitisme et est une des premières et des rares protéines de nématodes à galles dont la sécrétion *in planta* a été établie (Jaubert *et al.*, 2005). Cette protéine s'accumule à l'interface entre le nématode et le site nourricier (Jaouannet *et al.*, 2013). La répression de l'expression de la calréticuline par ARN interférence (ARNi) provoque une réduction du taux d'infection par *M. incognita* (Dubreuil *et al.*, 2007; Jaouannet *et al.*, 2013). De plus, la surexpression de la calréticuline de nématode *in planta* provoque une sensibilité accrue de la plante aux nématodes à galles, oomycètes et champignons pathogènes de plante. Lors de l'infection, la surexpression de la calréticuline supprime le dépôt de callose induit par elf18, un polypeptide bactérien, chez *A. thaliana* et réduit l'activation de gènes de la réponse de défense basale (Jaouannet *et al.*, 2013). Cette protéine semble donc agir sur les réponses de défense basale de la plante.

Mc1194 est un effecteur de *M. chitwoodi* capable d'interagir avec la protéine RESPONSIVE TO DEHYDRATATION 21a (AtRD21a) (Davies *et al.*, 2015). Cette protéine est connue pour être impliquée dans les défenses de la plante contre le champignon *B. cinerea* (Shindo *et al.*, 2012). Les mutants d'*A. thaliana* mutés pour le gène RD21 sont plus sensibles aux nématodes que le sauvage (Davies *et al.*, 2015). Néanmoins le lien entre Mc-1194 et la réponse PTI de la plante n'a pas été démontré.

Récemment l'effecteur MiMSP40 a été localisé dans les cellules des glandes œsophagiennes de *M. incognita* (Niu *et al.*, 2016). MiMSP40 est conservé chez cinq espèces de *Meloidogyne* mais aucun orthologue n'a été identifié au sein des autres groupes de nématodes parasites de plante. *MiMSP40* a été localisée au niveau subcellulaire dans le cytoplasme et le noyau de cellules d'oignons transformées. Les plantes d'*A. thaliana* surexprimant *MiMSP40* sont plus sensibles à l'infection par les nématodes à galles que les plantes sauvages. L'expression par la plante d'ARNi de *MiMSP40* altère le parasitisme et la reproduction du nématode. De plus la surexpression de *MiMSP40* dans les plantes supprime le dépôt de callose induit par elf18, et réprime l'expression des gènes marqueurs de la défense basale. Enfin la co-infiltration de *MiMSP40* diminue la taille des lésions nécrotiques déclenchées par les éliciteurs des réactions de défenses spécifiques de la plante (R3a/Avr3a). Ces résultats suggèrent que MiMSP40 est un effecteur qui joue un rôle dans la suppression des défenses basales ou spécifiques pour faciliter le parasitisme du nématode.

Enfin MjTTL5 est un effecteur de *M. javanica* qui code pour la transthyrétine, un peptide de 151 acides aminés comprenant un domaine conservé de fonction inconnue (DUF290) (Lin *et al.*, 2016).

MjTTL5 est exprimé spécifiquement dans les glandes subventrales de *M. javanica* au cours des premiers stades parasites et supprimerait les défenses de la plante. Une cible de Mj-TTL5 a été caractérisée : la sous unité catalytique de la thiorédoxine réductase (AtFTRc). L'interaction entre AtFTRc et MjTTL5 augmenterait considérablement l'activité de piégeage des espèces actives de l'oxygène de l'hôte et entraînerait une suppression des défenses basales des plantes favorisant l'infection par les nématodes.

2.3.4 Les effecteurs impliqués dans le développement du site nourricier

L'initiation et le développement du site nourricier est un événement crucial pour le nématode puisque cette structure constituera sa seule source de nutriments. Ainsi la recherche d'effecteurs intervenant lors de cette étape représente un enjeu majeur. Le gène 16D10 de *M. incognita* code pour un peptide de sécrétion de 13 acides aminés avec une séquence CLE-like et s'exprime dans les glandes subventrales des J2 préparasitaires (Huang *et al.*, 2006a). Des expériences de double hybride en levures ont permis de montrer que ce peptide interagit avec deux facteurs de transcriptions de type SCARECROW de la tomate (Huang *et al.*, 2006a). SCARECROW est connu pour être impliqué dans la détermination de l'identité méristématique et dans le développement racinaire, deux processus qui peuvent être reliés à la formation des cellules géantes. La répression de l'expression du gène *16D10* induit une augmentation de la résistance aux nématodes à galles et sa surexpression *in planta* stimule la croissance racinaire chez *Arabidopsis* et chez le tabac (Huang *et al.*, 2006b). Ces résultats montrent que l'effecteur 16D10 serait impliqué dans le pouvoir pathogène des nématodes à galles et qu'il module le développement de la plante probablement à travers son interaction avec les facteurs de transcription de type SCARECROW.

Deux effecteurs de nématode à galles ont pu être démontrés comme injectés dans les cellules géantes et ciblant le noyau : Mi-EFF1 et Mj-NULG1a (Fig. 11) (Jaouannet *et al.*, 2012 ; Lin *et al.*, 2013). Ces deux effecteurs présentent un signal de sécrétion, un ou deux domaines d'adressage au noyau (NLS) mais aucun domaine fonctionnel connu. Le gène *Mi-EFF1* est surexprimé dans les glandes œsophagiennes des larves parasites (Jaouannet *et al.*, 2012). La protéine Mi-EFF1 a été localisée *in planta* dans le noyau de la cellule géante chez la tomate par immunolocalisation (Jaouannet *et al.*, 2012). Bien que le rôle de Mi-EFF1 lors de l'interaction reste inconnue, des cibles végétales viennent d'être identifiées par un crible double hybride en levure (Quentin *et al.*, non publié). La protéine Mj-NULG1a est produite dans la glande dorsale et sa sécrétion *in planta* a été démontrée également

dans la tomate par immunolocalisation où elle est injectée dans le cytoplasme de la cellule géante pour s'accumuler dans le noyau (Lin *et al.*, 2013).

Une glycoprotéine 6D4 a été détectée comme accumulée dans les glandes subventrales et la glande dorsale de larves préparasitaires J2 ainsi que dans la glande dorsale et les sécrétions du stylet des stades sédentaires (Davis, 1992). Cette protéine est sécrétée *in planta* au moment de l'initiation du site nourricier où elle s'accumule au niveau des parois des cellules géantes (Vieira *et al.*, 2012). Cette protéine n'est pas sécrétée lors de la migration suggérant une implication spécifique dans l'initiation ou le développement du site nourricier. Sa séquence et sa fonction sont encore inconnues.

Enfin, Xue *et al.*, (2013) ont identifié l'effecteur Mi-8D05 produit par les glandes œsophagiennes de *M. incognita*. Les expériences d'ARNi dirigés contre Mi-8D05 montrent que la répression de ce gène induit une diminution du taux d'infection. Cet effecteur interagit avec une aquaporine végétale du tonoplaste (TIP2) suggérant un rôle dans l'entrée ou la sortie d'eau et des solutés dans la vacuole et qui pourrait favoriser ainsi l'élargissement des cellules géantes.

Les processus dans lesquels sont impliqués les effecteurs sont divers ainsi que les étapes du parasitisme dans lesquelles ils interviennent. Nombre d'entre eux ont encore des rôles méconnus mais pourraient néanmoins constituer des acteurs cruciaux de l'interaction plante-nématode. L'identification de leurs cibles végétales devrait permettre de mieux comprendre leur fonction dans la cellule géante.

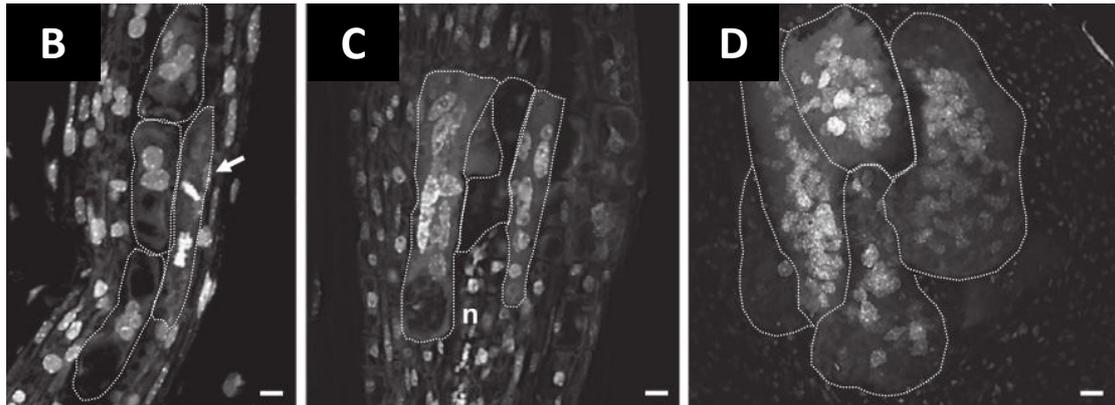
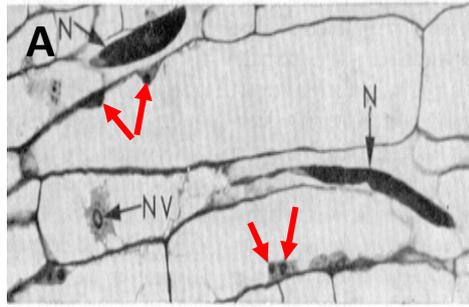


Figure 12 : Les cellules géantes binucléées à multinucléées induites par les nématodes à galles.

A. Cellules d'*Impatiens balsamina* binucléées induites par *M. javanica* 48 heures après inoculation. Les flèches rouges indiquent les noyaux des cellules binucléées. Les flèches noires indiquent le nématode (N).

(d'après Jones and Payne , 1978)

B.C.D. Série de sections optiques de racines entières d' *A. thaliana* traitées au iodure de propidium, marquant les noyaux. (D'après Vieira et al. 2012)

B. Galle à 2 jai présentant des cellules géantes contenant deux ou plusieurs noyaux, certaines cellules géantes présentent des divisions mitotiques (flèche)

C. Galle à 4 jai présentant un nombre croissant de noyaux dans des cellules géantes plus volumineuses.

D. Galle à 21 jai contenant un grand nombre de cellules géantes.

Les cellules géantes sont délimitées par des lignes pointillées .

N: nématode. Barre d'échelle = 10 μ m.

3. De la cellule vasculaire à la cellule géante

3.1. Formation : études morphologiques des cellules géantes et syncytium.

Les nématodes à galles ont été décrits en tant que pathogènes de plante à partir des années 1880. Les premières études des changements morphologiques de la plante ont été réalisées au milieu du 20^{ème} siècle (Christie, 1936). Des descriptions morphologiques détaillées des cellules géantes ont été réalisées dans les années 1960 par microscopie (Bird, 1961; Huang & Maggenti, 1969). Le premier signe observable du développement des cellules géantes est l'apparition de cellules binucléées à proximité de la tête du nématode (Fig. 12A) (Jones & Payne, 1978; Huang, 1985; de Almeida Engler & Favery, 2011). Ces cellules binucléées vont subir des mitoses successives sans cytokinèse. Un défaut d'expansion du phragmoplaste ne permet pas une séparation cytoplasmique des deux cellules filles (Caillaud *et al.*, 2008b). Les cellules géantes matures peuvent ainsi présenter jusqu'à une centaine de noyaux (Fig. 12B-D) (Jones & Payne, 1978; Huang, 1985). Chez le pois *Pisum sativum*, le nombre de noyaux dans les cellules géantes augmente rapidement entre 0 et 7 jours après inoculation (jai) pour atteindre environ 45 noyaux en moyenne par cellules géantes, puis cette augmentation ralentit entre 7 et 10 jours pour atteindre un palier à 15 jai (Starr, 1993). Le maximum de noyaux est atteint dans une cellule géante à 15 jai avec environ 135 noyaux. Chez la fève, la tomate et la laitue, la phase d'augmentation du nombre de noyaux dans les cellules géantes s'étend entre 0 et 14 jai (Starr, 1993). De manière générale, les divisions nucléaires sont nombreuses entre 0 et 15 jai néanmoins la synthèse d'ADN continue d'augmenter dans les cellules géantes après 15 jai suggérant des phénomènes d'endoréduplication (réplication de l'ADN sans division du noyau) (Wiggers *et al.*, 1990; Gheysen *et al.*, 1997; de Almeida Engler & Gheysen, 2013). Chez *Arabidopsis*, la synthèse d'ADN est très forte de 1 à 5 jai et devient plus faible à 9 et 15 jai (Engler *et al.*, 1999). Ces phénomènes d'endoréduplication répétés entraînent l'apparition de noyaux irréguliers et multilobés ainsi qu'une augmentation de la ploïdie allant de 2 à 64C (Christie, 1936; Berg *et al.*, 2009; Escobar & Fenoll, 2015).

Le volume des cellules géantes augmente continuellement dès l'initiation du site nourricier (Fig. 12 et 13). Chez *A. thaliana*, le volume de la cellule géante augmente d'un facteur 100 entre 3 et 40 jai (Cabrera *et al.*, 2015). A 40 jai, le diamètre des cellules géantes peut atteindre entre 100 et 500 µm alors qu'une cellule racinaire normale ne mesure qu'environ 25 µm. Les cellules géantes sont métaboliquement hyperactives avec un cytoplasme dense contenant un nombre important d'organelles (réticulum endoplasmique, ribosomes, mitochondries et appareil de Golgi) (Berg *et al.*, 2009) (Christie, 1936). La vacuole est également fragmentée en de nombreuses petites vacuoles (Fig.

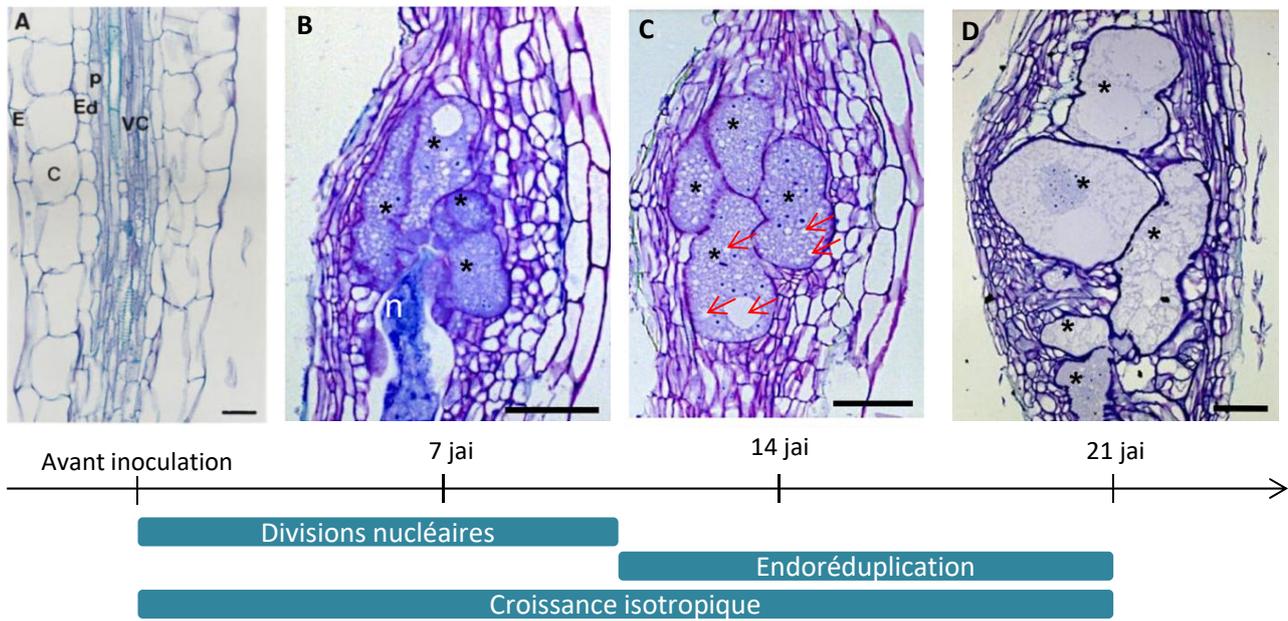


Figure 13 : Formation des cellules géantes chez *A. thaliana*.

Coupes longitudinales de racines d' *A. thaliana* non inoculées (A) et inoculées par *M. incognita* à 7 jai (B), 14 jai (C) et 21 jai (D).

Astérisque: cellule géante; C: cortex; E: épiderme; Ed: endoderme; n: nématode p: péricycle; VC: cylindre vasculaire. Les flèches rouges désignent les vacuoles fragmentées. Barres d'échelle: (A) 25µm (B,C,D) 50µm.

(Adapté de Engler et al. 1999 et Coelho et al. 2017).

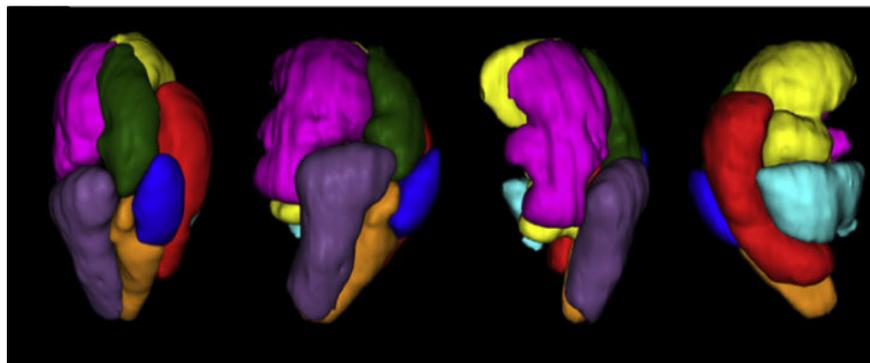


Figure 14 : Vues 3D d'une galle induite par les nématodes à galles

Vue en rotation à 360° d'une reconstruction 3D de cellules géantes d'un site nourricier dans une galle d'*Arabidopsis* à 7 jai induite par *M. javanica*.

Chaque couleur représente une cellule géante.

(D'après Cabrera et al. 2015)

13C) et des structures s'apparentant à des chloroplastes ainsi qu'une accumulation d'amidon sont observées (Ji *et al.*, 2013a). Récemment, la reconstruction 3D de cellules géantes a permis d'observer que ces cellules ne sont pas sphériques mais ont un aspect irrégulier avec des protubérances et des crevasses (Fig. 14) (Cabrera *et al.*, 2015). L'élargissement des cellules géantes implique également des modifications du transport des solutés et de l'eau. La présence d'invaginations de la paroi a été décrite dans les cellules géantes (Jones & Northcote, 1972) et permettrait d'augmenter la surface d'échange avec les cellules adjacentes des vaisseaux du xylème et phloème (Sobczak *et al.*, 2011). Cette morphologie atypique implique de profonds changements dans l'organisation du cytosquelette de la cellule végétale avec un réarrangement du cytosquelette d'actine et de microtubules. La redifférenciation en cellules géantes s'accompagne d'une réorganisation des faisceaux et câbles d'actine (de Almeida Engler *et al.*, 2004; Caillaud *et al.*, 2008b; de Almeida Engler & Favery, 2011). Les filaments d'actine apparaissent plus petits, plus courts et sont orientés de manière désordonnée. Dans les cellules géantes, de multiples fuseaux de microtubules corticaux sont présents mais non-orientés (Fig. 15). Aucune bande préprophasique n'a été observée et un phragmoplaste est initié entre les noyaux fils mais ne se développe pas pour diviser la cellule en deux (Caillaud *et al.*, 2008a). L'utilisation du taxol, un inhibiteur de la dépolymérisation des microtubules, dans le milieu de culture de la plante hôte, entraîne un arrêt du développement du nématode montrant ainsi le rôle essentiel du cytosquelette lors de l'ontogénèse et du maintien des cellules géantes (Engler *et al.*, 1999; de Almeida Engler *et al.*, 2004).

Syncytium et cellules géantes : quelques similarités et différences

Les structures nourricières induites par nématodes à galles et les nématodes à kystes présentent des similarités phénotypiques, en particulier une structure hypertrophiée, multinucléée et hypermétabolique, mais divergent par leur ontogénèse (Fig. 16). Les nématodes à kystes induisent une structure multinucléée en injectant des sécrétions du stylet dans une seule cellule vasculaire. Cette cellule va devenir un syncytium en incorporant les cellules adjacentes par une dissolution des parois et la fusion des cytoplasmes (Sijmons *et al.*, 1994; Grundler *et al.*, 1998). Les cellules voisines se divisent et sont peu à peu incorporées (Grunder *et al.*, 1998). Les noyaux et leurs nucléoles deviennent plus larges (Endo, 1971; Golinowski *et al.*, 1996), probablement en raison de phénomènes d'endoréduplication (Engler *et al.*, 1999). Comme pour les cellules géantes, le syncytium est métaboliquement très actif avec un cytoplasme dense et présente un nombre important d'organelles (Bohlmann, 2015).

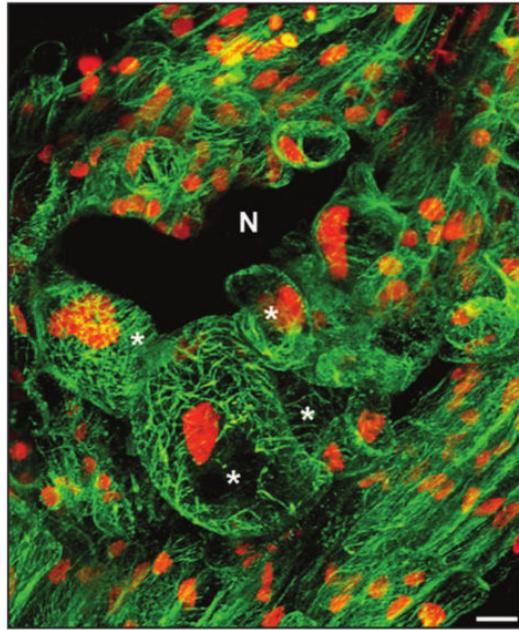


Figure 15 : Réorganisation des microtubules lors de la formation des cellules géantes chez *A. thaliana*.

Image de microscopie confocale montrant la localisation des microtubules (vert: MDB::GFP, Microtubule binding domain) et les noyaux (orange: histone H2B nucléaire fusionnée à la YFP). Dans les cellules voisine des cellules géantes, les microtubules sont « alignées » dans le sens de la longueur de la cellule. N: nématode. * : cellule géante. Barre d'échelle: 10 µm. (D'après Caillaud et al. 2008b).

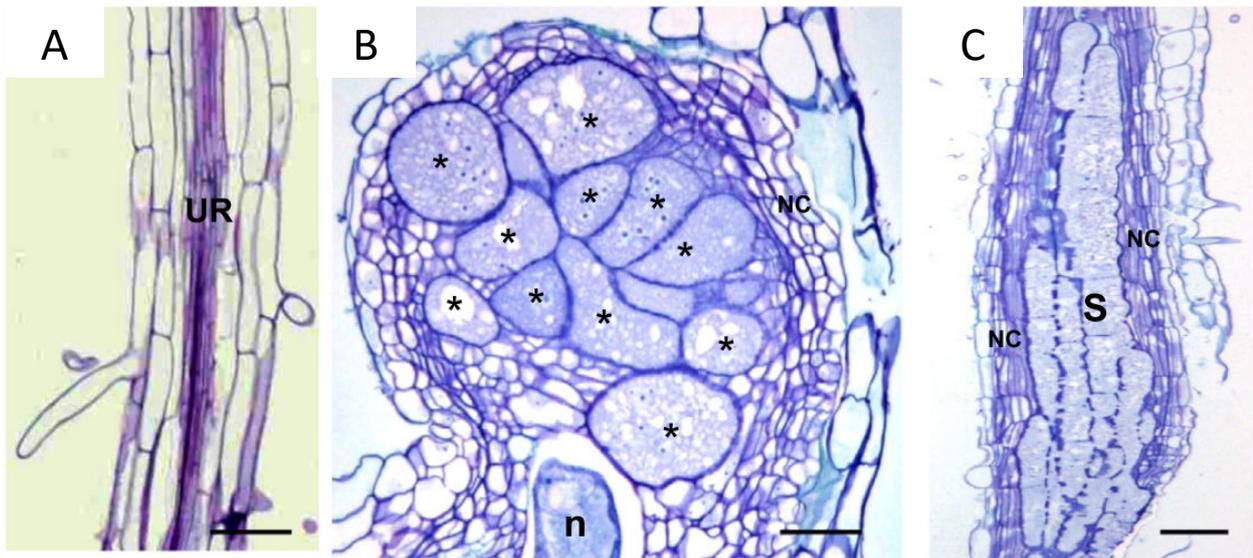


Figure 16 : Coupes de sites nourriciers induits par les nématodes à galles et à kystes chez *A. thaliana*. Coupes longitudinales colorées au bleu de toluidine d'une racine non infectée (A) d'une galle (B) d'un syncytium (C).

*: cellule géante; n: nematode; NC, cellules voisines; S, syncytium; UR, racines non infectée. Barre d'échelle = 50 µm.

(D'après Escobar & Fenoll, 2015)

3.2. Mécanismes moléculaires de la formation des cellules géantes

La compréhension des processus de la formation des cellules géantes repose sur l'analyse des modifications morphologiques de ces cellules mais également sur l'étude des mécanismes moléculaires impliqués. La formation des cellules géantes implique des changements au niveau moléculaire analysés grâce à différentes approches utilisant des outils de transgénèse et des techniques de séquençage toujours plus performantes.

L'analyse de l'expression des gènes dans les cellules géantes a permis d'identifier les mécanismes impliqués dans la redifférenciation des cellules racinaires en cellules géantes comme la modification de la paroi, l'hyperactivité métabolique, l'altération du cycle cellulaire, le remaniement du cytosquelette, les réactions de défenses, bouleversement hormonal. La différenciation des cellules géantes est un modèle d'étude particulièrement intéressant pour étudier les processus développementaux chez les plantes, en particulier la différenciation cellulaire et la compréhension des éléments clés du cycle cellulaire. Trois stratégies principales ont été utilisées pour identifier les acteurs moléculaires impliqués dans la formation de la galle ou des cellules géantes : l'approche dite « gène candidat », la stratégie de piégeage de promoteur et l'analyse de données transcriptomiques.

3.2.1. Les différentes approches utilisées pour l'identification des gènes impliqués dans la réponse de la plante à l'infection par les nématodes à galles

3.2.1.1 Approche gène candidat

L'approche « gène candidat » se base sur l'observation des mécanismes se déroulant dans les cellules géantes tels que la réentrée dans le cycle cellulaire, la division nucléaire, l'élargissement de la cellule, l'hyperactivité métabolique. A partir de ces observations le rôle de certains gènes déjà connus comme étant impliqués dans des mécanismes similaires a été testé dans la cellule géante. Un exemple d'approche gène candidat est l'étude des gènes régulateurs du cycle cellulaire (Engler *et al.*, 1999) ou celle du facteur de transcription « Lateral Organ Boundaries Domain family 16 » *LBD16*. L'expression de ce facteur de transcription est régulée par l'auxine et est impliqué dans l'émergence des racines latérales (Okushima *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009). Il existe un parallèle entre la formation d'une racine et la formation de la galle basé sur des profils d'expression similaires de facteurs de transcriptions (e.g. *KNOX*, *PHANTASTICA*) et de régulateurs du cycle cellulaire (Mathesius, 2003). De plus l'auxine est un facteur de régulation clef causant des changements de profil d'expression des gènes au cours de l'infection par les nématodes (Goverse & Bird, 2011). Pour toutes ces raisons, l'hypothèse a été faite de l'implication de *LBD16* dans la formation de la galle. L'expression de *LBD16*

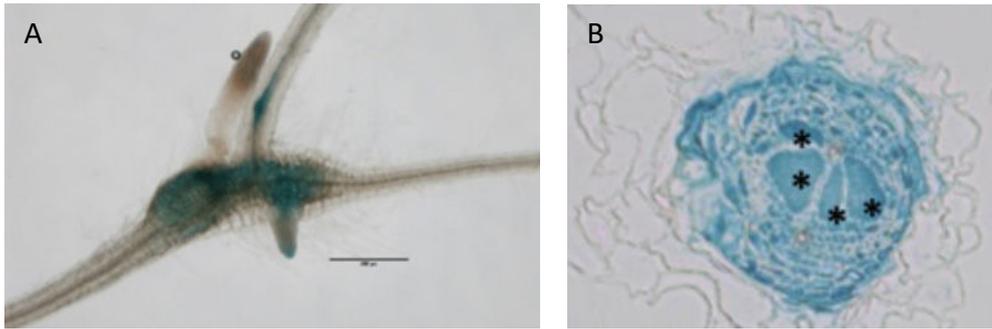


Figure 17 : Profil d'expression du promoteur de LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN 16 (LBD16) dans les galles induites par *M. javanica*.

A. Vue générale de la galle d'une plante portant la construction LBD16::GUS à 4jai. Le signal est visible dans la galle à 4 jai.

B. Section d'une galle d'une plante portant la construction LBD16::GUS à 4 jai.

*: cellule géante

(D'après Cabrera et al. 2014)

a été détectée dans les cellules géantes induites par *M. javanica* et *M. arenaria* de 1 jai jusqu'à 11–15 jai (Fig. 17) (Cabrera *et al.*, 2014b). La présence d'un inhibiteur de la voie de signalisation de l'auxine dans le milieu de culture, induit la répression de *LBD16* dans la galle suggérant que la régulation de *LBD16* dans la galle est dépendante de l'auxine. Il a également été montré que les sécrétions de J2 de *M. incognita* stimulées au résorcinol induisent l'expression de *LBD16* dans les protoplastes de feuilles d'*A. thaliana* suggérant une activation du promoteur de *LBD16* par les sécrétions du nématode. De plus les mutants d'*A. thaliana* perte de fonction (ou KO pour « knock-out ») du gène *LBD16* présentent une réduction du nombre de galles de 20% en comparaison avec une plante sauvage démontrant ainsi son rôle dans la formation de la galle (Cabrera *et al.*, 2014b). L'approche gène candidat est une approche qui a permis de montrer le rôle de nombreux gènes régulateurs du cycle cellulaire dans la formation des cellules géantes (Engler *et al.*, 1999) cependant elle présente l'inconvénient d'être restreinte à l'étude de gènes déjà caractérisés dans d'autres mécanismes.

3.2.1.2 Stratégie de piégeage de promoteurs

La stratégie de piégeage de promoteurs consiste à identifier des gènes dont l'expression est spécifiquement induite ou réprimée dans les galles en comparaison avec des racines non infectées. Cette stratégie se base sur l'insertion aléatoire dans le génome d'*A. thaliana* d'un ADN de transfert (ADN-T) portant un gène rapporteur sans promoteur. L'expression du gène rapporteur, observable par une réaction colorimétrique, reflète l'expression d'un gène de la plante lorsqu'il s'insère dans son promoteur ou en phase de sa séquence. La séquence de l'ADN-T étant connue, l'utilisation de PCR inverse ou d'adaptateurs permet d'identifier le gène dans lequel s'est inséré l'ADN-T. Cette stratégie permet de suivre le profil d'expression d'un grand nombre de gènes au cours du développement de la galle en ayant accès aux collections de plantes générées dans différents instituts. Cette stratégie sans *a priori* a permis de caractériser entre autres deux gènes de plante indispensables au développement des cellules géantes : le gène *RPE* codant une enzyme clé de la voie des pentoses phosphates, la D-ribulose-5-phosphate 3-épimérase et le gène *MAP65-3* codant la protéine associée aux microtubules « Microtubule- Associated Protein 65-3 » (Favery *et al.*, 1998; Caillaud *et al.*, 2008b). La stratégie du piégeage de promoteur a l'avantage d'être sans *a priori* mais reste une approche lourde dans la mise en œuvre et limitée à quelques plantes modèles.

3.2.1.3 Les analyses transcriptomiques

Les analyses globales de transcriptomes lors de la réponse des plantes aux nématodes à galles ont réellement débuté avec le développement des puces à ADN ou « microarrays ». Les puces à ADN sont des supports sur lesquels sont fixés des sondes ADN (représentatives des gènes dont on cherche à étudier l'expression) auxquelles vont s'hybrider les ADNc provenant de deux échantillons à comparer. Les ADNc de ces deux échantillons étant marqués par deux fluorochromes différents, cela permet de comparer le niveau d'expression des gènes d'une condition 1 (e.g. racines infectées) par rapport à une condition 2 de référence (e.g. racines non infectées). Le développement des puces à ADN a permis de comparer les profils d'expression des gènes dans les galles et les racines non infectées par *Meloidogyne* spp. (Tableau 1). Cette approche a été développée principalement chez la plante modèle *A. thaliana* mais également chez la tomate et *Medicago truncatula* (Hammes *et al.*, 2005; Jammes *et al.*, 2005; Fuller & Lilley, 2007; Schaff *et al.*, 2007; Portillo *et al.*, 2009, 2013; Fosu-Nyarko *et al.*, 2009; Barcala *et al.*, 2010; Damiani *et al.*, 2012; Bagnaresi *et al.*, 2013). Il existe également des données chez le soja (*Glycine max*) et le niébé (*Vigna unguiculata*) (Das *et al.*, 2010; Ibrahim *et al.*, 2011; de Sá *et al.*, 2012). Ainsi une étude chez *A. thaliana* infectée par *M. incognita* a montré que sur environ 22 000 gènes pour lesquels une expression a été détectée, 3373 gènes (15 %) ont été identifiés présentent un changement d'expression significatif au cours du développement de la galle à 7 et/ou 14 jai (Jammes *et al.*, 2005). La proportion de gènes surexprimés et réprimés est quasiment similaire. Fuller *et al.* (2007) ont identifié à 21 jai 959 gènes différentiellement régulés entre galles et racines saines mais observent cependant une répression de deux tiers de ces gènes. Le développement plus récent de nouvelles technologies de séquençage haut débit a permis d'obtenir des informations plus complètes et robustes à l'échelle du transcriptome entier sur les gènes différentiellement régulés au cours de l'interaction. En particulier grâce à la technologie Illumina, le transcriptome de la réponse de plantes non modèles à l'infection par *Meloidogyne* spp. a pu être analysé comme la luzerne, la cacahuète, le concombre et le bananier (Tableau 1) (Postnikova *et al.*, 2015; Guimaraes *et al.*, 2015; Castañeda *et al.*, 2017; Ye *et al.*, 2017).

Les méthodes de microdissection laser ou de microaspiration ont permis d'obtenir le transcriptome spécifique des cellules géantes (Portillo *et al.*, 2009, 2013; Fosu-Nyarko *et al.*, 2009; Barcala *et al.*, 2010; Damiani *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2013). L'analyse du transcriptome des cellules géantes et la comparaison avec celui des galles montrent que certains gènes (majoritairement ceux ayant des changements faibles d'expression) sont visibles uniquement dans les cellules géantes. Ce résultat suggère une dilution des transcrits des cellules géantes lorsque l'on analyse le transcriptome de la galle entière. Cela a ainsi été observé chez *A. thaliana* où les galles et les cellules géantes découpées

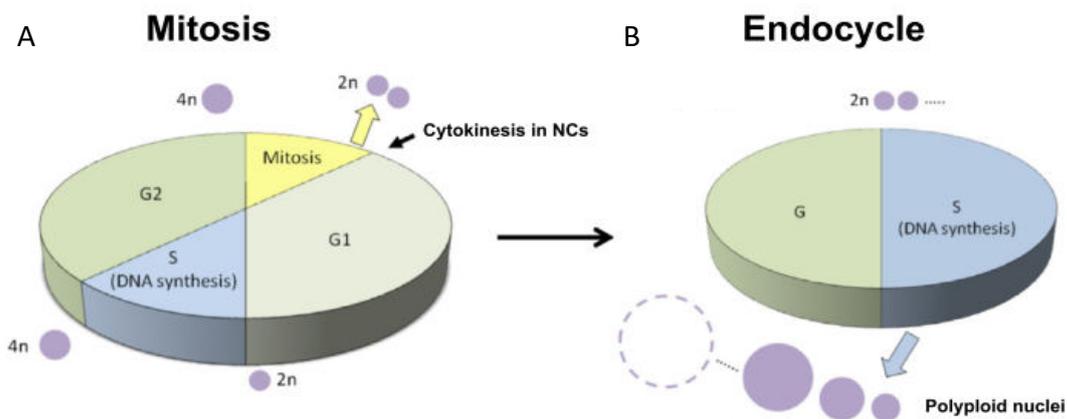


Figure 18: De la mitose à l'endocycle.

A. Le cycle mitotique: les cellules en phase G1 entrent dans la phase S où l'ADN est répliqué. Après laphase en G2, les cellules rentrent dans la phase M où la mitose avec cytokinèse a lieu générant deux cellules filles. Les phases G1 et G2 sont des phases de transition pendant lesquelles la cellule croit et acquiert les caractéristiques nécessaires pour franchir les points de passage pour rentrer en phase S et M. Dans les cellules géantes, la mitose s'effectue sans cytokinèse donnant lieu à la formation de deux noyaux au sein d'une même cellule.

B. Dans l'endocycle, la phase G et la phase S s'enchaînent générant des cellules avec des noyaux qui deviennent polyploïdes.

(D'après de Almeida Engler, J., & Gheysen, G. 2013)

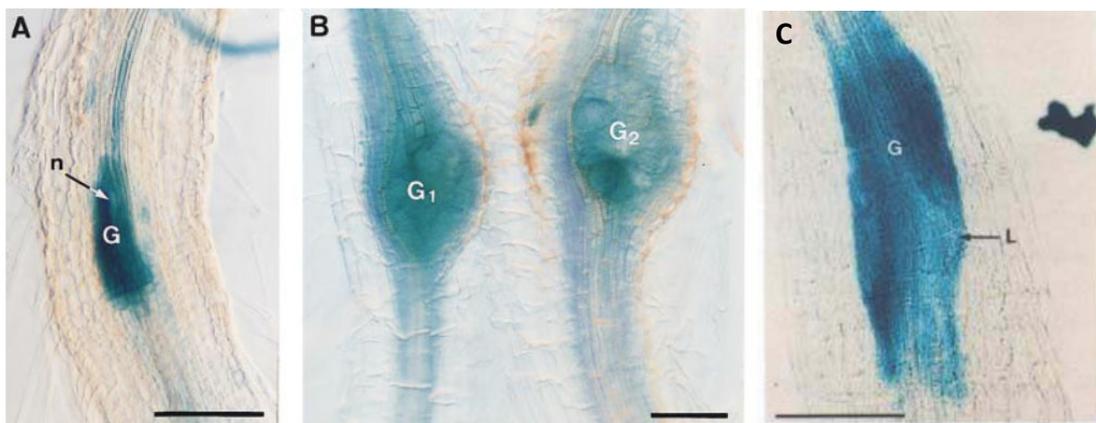


Figure 19: Profil d'expression du promoteur de deux gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire dans les galls d'*A. thaliana* infectées par *M. incognita*.

A. Expression de *cdc2bAt::GUS* dans la galle à 1 jai. (Almeida-Engler et al. 1999).

B. Expression de *cdc2bAt::GUS* dans la galle à 5 jai. (Almeida-Engler et al. 1999).

C. Expression de *cyc1At::GUS* dans la galle à 3 jai. (Niebel et al. 1996).

Barre d'échelle: 100µm, G: galle, n/L: nématode/larve.

au laser à 3 jai partagent seulement 120 gènes sur les 1161 différentiellement exprimés dans les cellules géantes (Barcala *et al.*, 2010). Enfin, La majorité des études transcriptomiques réalisent une comparaison entre des racines saines et des galles induites par *Meloidogyne* spp. Néanmoins certaines études proposent une comparaison de cultivars d'une même plante (sensibles et résistants aux nématodes à galles) entre des racines saines et infectées avec l'objectif d'identifier d'une part les gènes différentiellement régulés dans chaque cultivar et de croiser ces données afin d'identifier des gènes qui pourraient être responsables de la résistance aux nématodes à galles (Schaff *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2010; Petitot *et al.*, 2017). Les données de transcriptomiques (Illumina et puces à ADN) chez différentes plantes ont permis d'initier l'étude de la conservation des gènes régulés en réponse à l'infection par les nématodes à galles au sein du règne végétal. Une étude comparative des transcriptomes de cellules géantes d'Arabidopsis et de tomate a montré que 13 % des gènes surexprimés dans les cellules géantes d'Arabidopsis à 7 jai sont également surexprimés chez la tomate, et 55 % des gènes réprimés dans les cellules géantes chez Arabidopsis ont le même profil d'expression dans les cellules géantes de la tomate (Portillo *et al.*, 2013).

L'ensemble de ces approches a permis d'obtenir un panorama des gènes réprimés ou surexprimés au cours du développement de la galle et/ou des cellules géantes (Tableau 1). La plus part des analyses fonctionnelles de ces gènes ont été menées sur *A. thaliana*. Ces gènes ont pu être regroupés dans des processus biologiques comme les gènes du cycle cellulaire et du cytosquelette, les transports de l'eau, le métabolisme, les modifications de la paroi, les réponses de défense et la signalisation hormonale.

3.2.2 Les processus biologiques impliqués dans le développement des cellules géantes

3.2.2.1 Cycle cellulaire et cytosquelette

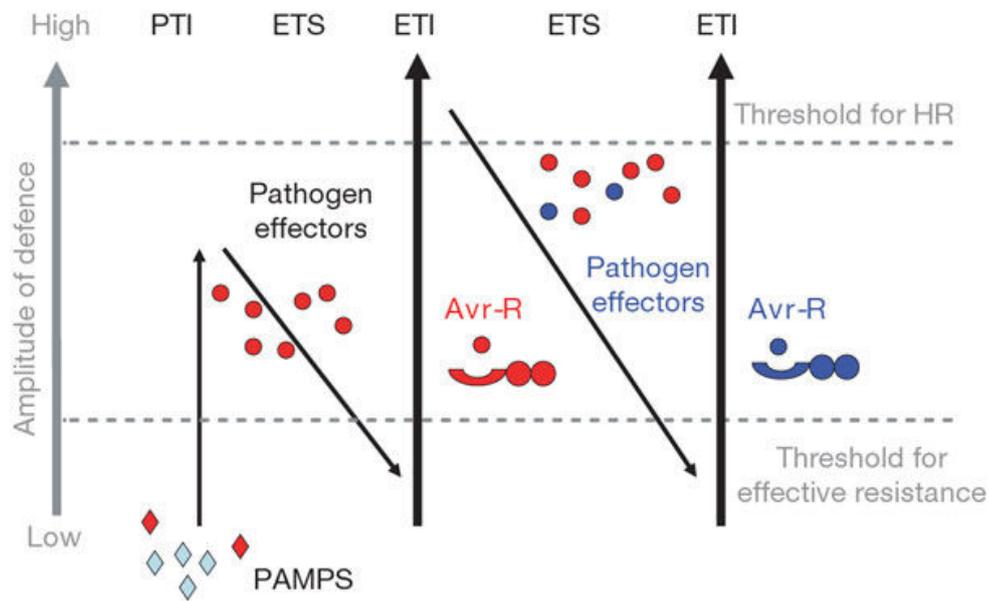
Le cycle cellulaire d'une cellule végétale est caractérisé par la phase de réplication de l'ADN (phase S), la phase de mitose (phase M) et de cytokinèse (division cellulaire). Ces deux phases sont séparées par deux phases de croissance et de préparation de la division, les phases G1 et G2 (Fig. 18). L'induction d'une cellule géante s'accompagne de l'activation du cycle cellulaire avec des mitoses sans cytokinèse suivies de phénomènes d'endoréductions menant à la présence de nombreux noyaux multilobés au sein d'une cellule nourricière avec différents niveaux de ploïdie (Starr, 1993; Engler *et al.*, 1999, 2011). Les mécanismes moléculaires associés à la modification du cycle cellulaire dans les cellules géantes ont été bien décrits. L'analyse de lignées possédant des gènes rapporteurs GUS a permis de montrer l'activation de marqueurs de l'entrée en mitose (transition G2/M) tels que

les cyclines mitotiques (*CYC1At* ; *CYCA2;1* et *CYCB1;1*) et des gènes du cycle cellulaire « cell division cycle » (e.g. *cdc2a*, *cdc2b*), au cours des stades précoces (1-3 jai) de la formation des cellules géantes d'*A. thaliana* (Fig. 19) (Niebel *et al.*, 1996; Engler *et al.*, 1999). Ces données ont été confirmées par les analyses de transcriptomes par puces à ADN où les gènes codant pour des cyclines sont surexprimés dans les cellules géantes chez *A. thaliana* dès 3 jai (*CYCA1.1*, *CYCA3.2*, *CYCD3;3*) (Barcala *et al.*, 2010) et surexprimés à 7 jai chez les galles d'*A. thaliana* et dans les cellules géantes chez le riz également (*CYCD3;2*) (Jammes *et al.*, 2005; Ji *et al.*, 2013b). Les marqueurs de la transition G2/M comme les kinases cycline-dépendante (*CDKA-1* et *CDK-B1*) sont également surexprimées entre 2 et 3 jai dans les galles d'*A. thaliana* (Niebel *et al.*, 1996; Engler *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent donc que le cycle cellulaire est un mécanisme important pour la cellule géante. Cette importance est confirmée chez *A. thaliana* par l'inhibition de *CDKA-1* par ARNi qui provoque une réduction de la sensibilité aux nématodes à galles (Van de Cappelle *et al.*, 2008). Alors qu'à 3 et 7 jai, les marqueurs du cycle cellulaire sont surexprimés, les analyses de transcriptome des galles d'*A. thaliana* induites par *M. incognita* montrent qu'à 14 jai les gènes codant pour la CDK CKS2 et la *CYCD3.2* ne sont plus surexprimés (Jammes *et al.*, 2005). Les gènes *KIP RELATED PROTEINS (KRP)*, inhibiteur des CDK ont été montrés comme impliqués dans le développement des cellules géantes. La surexpression de *KRP1* et *KRP2* induit une défaillance de la mitose et un arrêt de la division des cellules adjacentes et la formation de galles de petites tailles (Vieira *et al.*, 2013). La surexpression de *KRP2* et *KRP5* provoquent également le développement de galles plus petites (Coelho *et al.*, 2017). Au contraire la surexpression de *KRP6* a un effet antagoniste et promeut l'activité mitotique de la cellule géante. En conséquence, les mutants d'insertion *kpr6* présentent des galles plus petites (Vieira *et al.*, 2014).

Un set de gènes du cycle cellulaire a été montré comme impliqué dans le mécanisme d'endoréduplication dans les cellules géantes d'*A. thaliana* induites par le nématode à galles *M. incognita* : *CELL CYCLE SWITCH 52A1 (CCS52A1)*, *CCS52B*, *DP-E2F LIKE 1 (DEL1)* et *ROOT HAIRLESS 1 (RHL1)*. Le basculement entre le cycle mitotique et l'endoréduplication est contrôlé par *CCS52A1* et *CCS52B*. Une forte expression de *CCS52A1* et *CCS52B* a été détectée par hybridation *in situ* dans la galle d'*A. thaliana* à 7 jai suggérant leur rôle dans l'endoréduplication (de Almeida Engler *et al.*, 2012). *DEL1* est un répresseur de l'endoréduplication et sa surexpression ou son inhibition perturbe le développement des cellules géantes (de Almeida Engler *et al.*, 2012). Enfin *RHL1* a été montré comme nécessaire à l'endoréduplication chez *A. thaliana*, puisque son inhibition entraîne la formation de cellules géantes plus petites (de Almeida Engler *et al.*, 2012).

La perturbation du cycle cellulaire dans les cellules géantes s'accompagne également d'un remaniement du cytosquelette. Le cytosquelette est composé de filaments d'actine et de microtubules. L'étude de l'activité des promoteurs de gènes *ACT2* et *ACT7* codant pour l'actine

fusionnés au gène rapporteur GUS a montré qu'ils étaient activés dans la galle jusqu'à 15 jai (de Almeida Engler *et al.*, 2004). De même l'hybridation *in situ* sur les gènes codant pour l' α , β , γ – tubuline montre un signal dans les cellules géantes et les cellules voisines. L'utilisation d'inhibiteur du cytosquelette comme l'oryzaline (qui déstabilise les microtubules) réduit le nombre de noyaux de cellules géantes et inhibe le développement du nématode (Engler *et al.*, 1999). La dynamique du cytosquelette est régulée par diverses protéines qui interagissent avec la tubuline ou l'actine comme par exemple la formine AtFH6 qui participe à la polymérisation *de novo* de l'actine et à sa conformation. AtFH6 est surexprimé durant la formation des galles d' *A. thaliana* à 7 et 14 jai (Favery *et al.*, 2004). L'immunolocalisation de la protéine montre que AtFH6 se répartit sur la membrane plasmique suggérant un rôle dans la croissance isotropique de la cellule géante (Favery *et al.*, 2004). Par ailleurs, le gène ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR 2 (*ADF2*) codant pour le facteur de dépolymérisation de l'actine est surexprimé dans les cellules géantes d' *A. thaliana* de 14 à 21 jai, autrement dit au cours de la phase de croissance et maturation des cellules géantes (Clément *et al.*, 2009). La réduction de l'expression d'*ADF2* par ARNi bloque la maturation du site nourricier et affecte le développement du nématode (Clément *et al.*, 2009). Enfin le gène codant pour la protéine MAP65-3, a été montré comme essentiel pour l'ontogénèse des cellules géantes et pour le développement du nématode (Caillaud *et al.*, 2008b). Ce gène joue un rôle clef dans la division de la cellule et plus précisément dans l'organisation des microtubules au cours de la mitose et de la cytokinèse. MAP65-3 est exprimé dans les cellules géantes d'*A. thaliana* induites par *M. incognita* (Caillaud *et al.*, 2008b). La protéine MAP65-3 est associée aux fuseaux mitotiques et aux phragmoplastes qui vont isoler les deux cellules filles lors de la cytokinèse. Dans les lignées perte de fonction de *map65-3* inoculées par *M. incognita*, les cellules géantes commencent à se développer mais ne peuvent s'établir correctement et dégèrent aboutissant à la mort du nématode qui ne peut s'alimenter sur le site nourricier non fonctionnel. Enfin le rôle de la γ -tubuline dans le remaniement du cytosquelette a été démontré (Banora *et al.*, 2011). Les gènes codant pour les tubulines *TUB1* et *TUB2* sont surexprimés dans les galles à 7, 14 et 21 jai et les mutants de perte de fonction pour ces deux gènes chez *A. thaliana* présentent des altérations de la morphologie du site nourricier empêchant le cycle de vie du nématode de se dérouler complètement.



- ◆ PAMPs/MAMPs
- effecteur
- ☪●● recepneur

Figure 20 : Immunité de la plante: le modèle en zig zag.

Ce modèle se découpe en plusieurs phases. Dans un premier temps la plante reconnaît des « microbial/pathogen-associated molecular patterns » (MAMPs/PAMPs) via des « pattern recognition receptors » (PRR) pour induire les défenses basales, la « PAMP-triggered immunity » (PTI). Dans un deuxième temps, les pathogènes délivrent dans la cellule végétale des effecteurs qui interfèrent avec la PTI, cette phase est appelée « effector-triggered susceptibility » (ETS). Dans une troisième phase, un effecteur est reconnu par une protéine de résistance NB-LRR activant l'« effector-triggered immunity » (ETI), une réponse amplifiée de la PTI qui au delà d'un certain seuil induit l'« hypersensitive cell death » (HR). Dans la phase 4, les pathogènes ayant perdu l'effecteur précédemment reconnu par la plante ou ayant acquis de nouveaux effecteurs sont alors en mesure de supprimer l'ETI. Sous la pression de sélection, les plantes évoluent également et de nouvelles protéines NB-LRR pourront reconnaître les nouveaux effecteurs et déclencher l'ETI. Ce modèle en zig-zag illustre la course à l'armement entre les pathogènes et les plantes.

(D'après Jones and Dangl, 2006)

3.2.2.2 Réponse de défenses

Les nématodes endoparasites de plantes tels que les *Meloidogyne* spp. passent la majeure partie de leur cycle de développement à l'intérieur de la racine et doivent donc faire face aux mécanismes de défense de la plante. Ces mécanismes se divisent en deux types de réponses : l'immunité induite par des motifs moléculaires de surface caractéristiques des micro-organismes appelées PAMP (« pathogen associated molecular patterns ») ou « PAMP triggered immunity » (PTI) et l'immunité induite par les effecteurs ou « effector induced immunity » (ETI) (Fig. 20). La PTI ou défense basale constitue le premier niveau de défense des plantes lorsqu'elles sont attaquées par un pathogène. Les éliciteurs ou les PAMP induisent la PTI suite à leur reconnaissance par la plante via des récepteurs spécifiques appelés PRR pour « patterns recognition receptors » (van der Hoorn & Kamoun, 2008). Le déclenchement de la PTI résulte en un pic de calcium cytosolique, une dépolarisation membranaire, un efflux de K⁺, un influx de H⁺, l'activation d'une cascade de kinases de type MAPK (« Mitogen Activated Protein Kinase »), la production d'espèces actives de l'oxygène, la production d'éthylène, un dépôt de callose et l'induction transcriptionnelle des gènes de défense (Jones & Dangl, 2006). Pour contourner la PTI, les agents pathogènes sécrètent dans les tissus de leur hôte des effecteurs capables de réprimer ces défenses basales. Les plantes ont développé à leur tour des systèmes de détection des effecteurs, conduisant à la mise en place de défenses ciblées, plus rapides et plus puissantes que l'on appelle ETI. Cette dernière est régulée par des protéines de résistance R de type NB-LRR (« Nucleotide Binding-Leucine-Rich Repeat »). Lorsqu'un effecteur sécrété par le pathogène est reconnu par une protéine R de la plante, l'effecteur est alors appelé protéine d'avirulence. Les défenses de type ETI aboutissent le plus souvent à une réponse d'hypersensibilité (HR) qui résulte en la mort cellulaire programmée des cellules végétales au niveau du site d'infection. Les défenses de type ETI permettent à la plante de lutter contre les pathogènes biotrophes et hémibiotrophes, en revanche ce type de défense est impuissant contre les nécrotrophes. Certains pathogènes ont la capacité de contourner l'ETI soit grâce à de nouveaux effecteurs capables d'inhiber les défenses spécifiquement induites par l'ETI soit par la perte ou la modification des protéines d'avirulence. La coévolution entraîne une acquisition séquentielle de nouvelles protéines R par les plantes et de nouveaux effecteurs par les pathogènes (Jones & Dangl, 2006).

Plusieurs travaux récents suggèrent que la plante est capable de percevoir une signature ou des éliciteurs des nématodes parasites de plantes appelés « nematode associated molecular patterns » ou NAMP. Une étude récente a montré que la répression de l'expression de l'homologue du gène *BRASSINOSTEROID-ASSOCIATED KINASE 1 (BAK1)* chez la tomate augmentait significativement la

sensibilité de la plante aux nématodes du fait d'un défaut de la résistance basale (Peng *et al.*, 2014). BAK1 forme en effet un complexe avec des protéines PRR pour réguler positivement les réponses de défense. Ces résultats suggèrent que des NAMP putatifs ou les dommages occasionnés par les nématodes « damaged associated molecular patterns », (DAMP) pourraient activer les défenses basales via BAK1 suite à la reconnaissance du nématode. Récemment, une analyse métabolomique des sécrétions de nématodes parasites de plantes a permis de montrer que les nématodes *M. incognita*, *M. hapla* et *H. glycines*, peuvent sécréter un jeu d'ascarosides similaires. Ces ascarosides sont des peptides qui régulent le développement et des traits de comportement chez *Caenorhabditis elegans* mais aussi chez d'autres espèces de nématodes (Ludewig, 2013). Parmi ces ascarosides identifiés, ascr8 est le plus abondant chez les nématodes parasites de plantes. Un traitement par ascr18 conduit à une activation des gènes de la PTI aussi bien locale que systémique chez *A. thaliana* (Manosalva *et al.*, 2015). De plus ces plantes traitées par ascr18 sont moins sensibles à un panel de pathogènes dont les nématodes en comparaison avec des plantes non traitées. Les auteurs concluent que la plante pourrait reconnaître les ascarosides menant à une activation de réponses de défense de la plante de type PTI. Néanmoins il est important de mentionner que le récepteur membranaire de ce premier NAMP n'a pas été identifié à ce jour (Manosalva *et al.*, 2015).

Au cours des interactions plantes-nématodes, l'expression des gènes de la plante impliqués dans la réponse aux blessures (*WUN1*, *POX*), dans la réponse au « burst oxydatif » (*CAT*), ou dans la biosynthèse de composés participant à la réaction de défense (*GST*, *Mia3*, *CHS1/3*) est modifiée (Gheysen & Fenoll, 2002). De plus la présence d'espèces réactives de l'oxygène dont l' H_2O_2 a été détectée par des analyses chimiques entre 12 et 48 hpi (heures après infection) dans les galles de tomate (Melillo *et al.*, 2006). L'expression des gènes marqueurs des défenses dépendantes de l'acide salicylique *PATHOGENESIS-RELATED PR-1*, *PR-2*, *PR-3* et *PR-5* est clairement induite dans les racines d'*A. thaliana* infectées par *M. incognita* à 9 jpi puis diminue à 14 jpi (Hamamouch *et al.*, 2011). De plus, l'analyse des transcriptomes de galles et cellules géantes par hybridation de puces à ADN a montré que la formation de la galle chez la tomate et *A. thaliana* s'accompagnait d'une répression des gènes impliqués dans les défenses de l'hôte (Jammes *et al.*, 2005; Barcala *et al.*, 2010; Damiani *et al.*, 2012). Chez *A. thaliana* à 14 et/ou 21 jpi, une forte proportion (~70%) de gènes différentiellement exprimés liés aux réponses de défense est réprimée comme le gène *PR-4* codant pour une chitinase; les gènes codant pour des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des phenylpropanoïdes (e.g. phenylalanine ammonia lyase); ou encore le gène *PAD4* codant pour une protéine de type lipase importante pour la biosynthèse de l'acide salicylique et pour la perception des signaux régulés par les gènes de résistance de type NBS-LRR (Jammes *et al.*, 2005). A 7 jpi, la répression du gène *LOX* codant pour une lipoxygénase suggère une inhibition de la voie de l'acide jasmonique associée à la défense

(Damiani *et al.*, 2012). Des réactions de défense sont également réprimées de façon précoce puisque le gène de défense *PR-1* est réprimé dans les cellules géantes à 3 jai (Barcala *et al.*, 2010). La répression des gènes *WRKY* lors de l'infection par les nématodes à galles illustre parfaitement cette répression globale des défenses lors de la relation parasitaire. Les gènes *WRKY* codent pour des facteurs de transcription agissant en aval de la voie de signalisation hormonale pour activer les gènes de défense de la plante. Une majorité de ces gènes *WRKY* est réprimée lors de l'interaction avec des nématodes à galles (Jammes *et al.*, 2005; Barcala *et al.*, 2010; Ibrahim *et al.*, 2011; Hamamouch *et al.*, 2011; Damiani *et al.*, 2012). En effet, chez *A. thaliana*, 17 des 21 gènes *WRKY* sont réprimés dans la galle à 7 et/ou 14 jai (Jammes *et al.*, 2005).

3.2.2.3 Hormones

Les phytohormones comme l'acide salicylique (SA), l'éthylène (ET) et l'acide jasmonique (JA) jouent un rôle essentiel dans la croissance et le développement de la plante ainsi que dans le contrôle de différents aspects de la réponse de défense contre les pathogènes. Plusieurs approches ont établi le rôle majeur de ces hormones lors de l'interaction plante-nématodes à galles. L'application exogène de SA, ET, et JA (ou de leurs analogues) ou des traitements chimiques qui affectent la synthèse de ces hormones affectent la sensibilité de la plante hôte (Cooper *et al.*, 2005; Bhattarai *et al.*, 2008; Fujimoto *et al.*, 2011; Nahar *et al.*, 2011; Fudali *et al.*, 2013). Les analyses des profils d'expression des gènes intervenant dans les voies de signalisation liées à ces hormones ont montré que ces voies sont ciblées par les nématodes à galles pour permettre l'induction ou la maintenance du site nourricier. Une répression générale des gènes liés à la voie du SA est observée dans les cellules géantes et dans les galles d'*A. thaliana* et de riz (Barcala *et al.*, 2010; Kyndt *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2013b). De plus, la surexpression de *NPR1* chez le tabac, un activateur de la voie de signalisation SA, induit une diminution du nombre de galles et de masses d'œufs lors de l'infection par *M. incognita* (Priya *et al.*, 2011). De la même façon chez le soja, la surexpression de *AtPAD4*, une protéine de type lipase impliquée dans la voie de signalisation du SA entraîne une résistance à l'infection par les nématodes à galles (Youssef *et al.*, 2013). Enfin la surexpression chez le riz du gène *NAHG*, codant pour une salicylate hydroxylase qui dégrade le SA, induit une augmentation de la sensibilité à *M. graminicola* (Nahar *et al.*, 2011). La voie de signalisation du JA et de l'ET jouent également un rôle important dans la réponse aux nématodes à galles. La sensibilité vis-à-vis de *M. graminicola* est accrue lors de la répression par ARNi de l'expression de *OsEIN2b*, un composant de la voie de signalisation de l'ET, ainsi que chez le mutant de riz de la voie de biosynthèse du JA *hebiba* (Nahar *et al.*, 2011). La signalisation de l'ET peut également moduler l'attraction des nématodes à galles vers l'hôte. Les graines d'*A. thaliana* possédant des mutations d'insensibilité à l'ET sont plus

attractives que les individus sauvages (Fudali *et al.*, 2013). D'autre part, de nombreux transcrits impliqués dans la biosynthèse du jasmonate sont réprimés dans les cellules géantes du riz induites par *M. graminicola* (Ji *et al.*, 2013). Toutefois cette répression n'a pas été observée au niveau de la galle complète. L'établissement du parasitisme nécessite donc une voie de signalisation JA non altérée, permettant la réalisation des premières étapes de la formation du site nourricier (Bhattarai *et al.*, 2008). En plus de leur rôle dans le développement, les brassinostéroïdes (BR) sont impliqués dans la réponse de la plante aux nématodes à galles (Kyndt *et al.*, 2012). Une induction constante des gènes impliqués dans la biosynthèse des BR a été observée dans l'interaction riz - *M. graminicola*. Il semblerait que les BR aient un effet antagoniste sur le jasmonate (Nahar *et al.*, 2013). Chez *A. thaliana*, l'ET, ainsi que l'auxine, semblent jouer un rôle clé dans la formation des sites nourriciers induits par les nématodes (Barcala *et al.*, 2010; Cabrera *et al.*, 2014b).

L'auxine ou IAA (acide indole-3-acétique) est un acteur clef de nombreux processus de développement de la plante tels que la régulation de la division cellulaire, la polarité et l'élongation cellulaire, et la détermination de l'identité cellulaire. L'auxine s'accumule dans les galles induites par nématodes à galles, ce qui renforce l'hypothèse du rôle essentiel de cette hormone lors de la formation du site nourricier (De Meutter *et al.*, 2005). Il a également été montré que *AUX1* codant pour un transporteur auxinique est induit spécifiquement dans les galles et les zones méristématiques (Mazarei *et al.*, 2003). De plus, l'auxine et les composés apparentés ont été détectés dans les sécrétions de nématodes à galles (De Meutter *et al.*, 2005). En utilisant l'approche "gène rapporteur" chez *A. thaliana*, *Trifolium repens* et *M. truncatula*, l'activation des promoteurs répondant à l'auxine (comme le promoteur *GH3* chez *T. repens* ou le promoteur *DR5* chez *A. thaliana*) a été détectée dans les cellules géantes de ces trois espèces végétales (Hutangura *et al.*, 1999; Karczmarek *et al.*, 2004; Absmanner *et al.*, 2013). De plus, les analyses de puces à ADN ont révélé une activation précoce dans les galles des gènes responsables de l'homéostasie de l'auxine et des gènes de réponse à l'auxine. En revanche, les gènes codant pour des répresseurs des gènes de réponse à l'auxine sont réprimés dans les galles d'*A. thaliana*. L'ensemble de ces résultats suggèrent donc un rôle majeur de l'auxine dans le succès de l'établissement du parasitisme (Hammes *et al.*, 2005; Jammes *et al.*, 2005; Barcala *et al.*, 2010; Cabrera *et al.*, 2014a). Enfin, l'induction dans les protoplastes du facteur de transcription régulé par l'auxine, LBD16, par les sécrétions des larves de *M. incognita* suggère que les nématodes à galles seraient capables de manipuler la voie de signalisation de l'auxine (Cabrera *et al.*, 2014b).

Les cytokinines sont associées à des rôles importants dans le développement des parties foliaires et racinaires en favorisant la division cellulaire et en régulant la différenciation cellulaire. L'identification de cytokinines dans les sécrétions de *M. incognita* induites *in vitro* ainsi que l'augmentation de la

quantité de cytokinines dans les cellules géantes suggèrent que ces composés pourraient avoir des fonctions cruciales dans la formation des cellules géantes (De Meutter *et al.*, 2003). Toutefois l'analyse du promoteur *TCS* senseur des cytokinines fusionné à un gène rapporteur ne montre aucune activité détectable dans les sites nourriciers induits par les nématodes à galles (Absmanner *et al.*, 2013). La forte expression du gène *YPE-A RESPONSE REGULATORS 5 (ARR5)* codant pour un récepteur des cytokinines dans les primordia racinaires (site d'initiation des cellules géantes) ainsi que sa répression au cours du développement de la cellule géante indiquent que les cytokinines pourraient jouer un rôle à la fois dans la stimulation et l'inhibition de la division cellulaire (Lohar *et al.*, 2004). Plus récemment, dans les cellules géantes microdisséquées, une répression des régulateurs négatifs de la signalisation des cytokinines a été observée (e.g. *ARR4*, *ARR5*, *ARR7*, *CK11* et *AHK1*) (Barcala *et al.*, 2010). La preuve directe du rôle des cytokinines dans la formation de cellules géantes provient de l'expression transitoire dans les racines de *Lotus japonicus* d'une cytokinine oxydase, responsable de la dégradation des cytokinines, qui se traduit par une résistance accrue aux nématodes à galles (Lohar *et al.*, 2004).

Enfin l'acide gibbérellique (GA) favorise la division et l'élongation cellulaire. Une induction générale des gènes impliqués dans la biosynthèse et la réponse au GA a été observée dans les galles de tomate et de riz, ainsi que dans les cellules géantes de riz (Bar-Orl *et al.*, 2005; Kyndt *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2013b). D'autres phytohormones mitogènes, telles que les petits peptides de signalisation phytosulfokines (PSK), pourraient également déclencher une différenciation des cellules géantes. L'analyse fonctionnelle des PSK chez *A. thaliana* et de leur récepteur PSKR1 a montré qu'au sein de la galle, l'expression de ces gènes était limitée aux cellules environnant les cellules géantes et que les mutants *pskr1* présentaient un défaut d'expansion des cellules géantes, entraînant une résistance aux nématodes (Rodiuc *et al.*, 2016).

3.2.2.4 Transport et Métabolisme

Les cellules géantes sont métaboliquement hyperactives et constituent une réserve d'eau et de nutriments pour le nématode. Dans ces cellules, il a été observé une activité accrue des voies de synthèse du pentose phosphate (PPP). Le PPP produit le NADPH qui est nécessaire à de nombreuses réactions de biosynthèse et génère également des composés intermédiaires pour la synthèse de nucléotides et de polymères de la paroi cellulaire. L'approche de piégeage de promoteurs a mis en évidence que l'expression du gène *RPE* codant pour une D-ribulose-phosphate-épimérase (RPE) dans les cellules géantes d'*A. thaliana* était essentielle aux premières étapes de la formation de cellules géantes (Favery *et al.*, 1998). Chez *Arabidopsis*, ce gène s'exprime dans les méristèmes racinaires de l'embryon mature et de la plantule ainsi que dans les primordia racinaires et les fleurs (Favery *et al.*,

1998). Ce gène est également surexprimé dans les premières étapes de la formation des cellules géantes induites par *M. incognita*. De plus, les mutants homozygotes *rpe* infectés par *M. incognita* présentent une forte diminution du nombre de galles. Ces résultats montrent que le gène RPE est impliqué dans la formation des galles.

Les gènes codant pour des enzymes impliquées dans la glycolyse, telles que les enzymes phosphoglycérate mutase (PGM) / bisphosphoglycérase mutase (bPGM) sont exprimés dans les premiers stades de la formation des cellules géantes (Mazarei *et al.*, 2003). De grandes quantités de solutés et d'eau sont transportées à partir du xylème à travers les invaginations de la paroi cellulaire des cellules géantes (Bartlem *et al.*, 2014). Une analyse transcriptomique de 635 gènes codant pour des transporteurs a permis d'identifier 50 gènes dont l'expression est modifiée à plusieurs temps d'infection dans les racines infectées par les nématodes à galles (Hammes *et al.*, 2005). Parmi ces gènes, ceux associés au transport de peptides ont tendance à être réprimés, alors que les gènes associés aux transporteurs d'acides aminés ont tendance à être surexprimés (Hammes *et al.*, 2005). De plus, la résistance aux nématodes à galles des plantes d'*A. thaliana* mutées pour les gènes *AtAAP3* ou *AtAAP6* codant des acides aminés perméases (Marella *et al.*, 2013) ainsi que la forte expression dans les galles d'*Arabidopsis* du gène *AtSUC1* codant pour un transporteur de saccharose, classiquement exprimé dans des cellules compagnes du phloème, suggèrent que ces protéines seraient impliquées dans l'activité de puits métabolique de la cellule géante (Hammes *et al.*, 2005). Le transport massif de l'eau dans les cellules géantes se traduit par la surexpression des gènes codant pour les protéines de canaux de transport de l'eau, telles que les aquaporines. Ainsi le gène de *M. truncatula* *NOD26* codant pour une aquaporine est surexprimé dans les galles (Favery *et al.*, 2002) de la même façon le gène *TobRB7* codant pour une aquaporine chez le Tabac est exprimé dans les cellules géantes (Opperman *et al.*, 1994). L'inhibition de l'expression de *TobRB7* par ARNi inhibe la reproduction des nématodes, ce qui suggère que l'expression de ce gène est nécessaire pour le développement ou le maintien du site nourricier. Chez *Arabidopsis*, les analyses de puces à ADN ont montré que les gènes d'aquaporine présentaient différents profils d'expression, trois gènes sont surexprimés dans les galles (un codant pour une protéine de type NOD26 et deux pour des protéines de la membrane plasmique), alors que sept gènes d'aquaporine sont réprimés. Grâce aux expériences de PCR quantitative et d'analyse d'activité de promoteur fusionnés au gène GUS, Hammes *et al.*, (2005) ont confirmé que le gène d'aquaporines *AtPIP2.5* était spécifiquement régulé dans les galles. Enfin chez la tomate, le gène d'aquaporine *TIP2* a récemment été identifié comme étant la cible végétale de l'effecteur de *M. incognita* Mi8D05 (Xue *et al.*, 2013). Ce dernier résultat conforte l'hypothèse du rôle des effecteurs dans la régulation du transport de solutés et d'eau au sein de la cellule géante.

Une analyse détaillée du glutathion (GSH), un tripeptide impliqué dans le potentiel redox du cytoplasme de la cellule, et du métabolisme de l'homoglutathion (hGSH) a démontré l'importance de ces composés pour le succès de l'infection des nématodes chez *M. truncatula* (Baldacci-Cresp *et al.*, 2012). La déplétion de hGSH induit la malformation des masses d'œufs de nématodes et modifie le sexe-ratio de la descendance. D'autre part, l'analyse de l'expression des gènes et les analyses métabolomiques ont montré une modification du métabolisme de l'amidon, du gamma-aminobutyrate, du malate et du glucose dans les galles déplétées en hGSH. Ces différents résultats suggèrent que l'hGSH joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme des cellules géantes. Par ailleurs, en utilisant des mutants *A. thaliana*, Cabello *et al.*, (2014) ont montré le rôle des enzymes dégradant le saccharose, la sucrose synthase et des invertases dans les interactions nématodes à galles-plantes.

3.2.2.5 Modification de la paroi

La croissance isotropique est une caractéristique importante des cellules géantes. Chaque cellule géante atteint un volume pouvant être multiplié d'un facteur 100 entre 3 et 40 jai chez *A. thaliana* (Cabrera *et al.*, 2015). Cette expansion cellulaire nécessite un processus d'extension de la paroi qui implique la synthèse et la dégradation de la paroi cellulaire végétale. La paroi cellulaire de la plante est une association complexe et dynamique de polysaccharides (principalement la cellulose, les hémicelluloses et la pectine), de protéines structurales et de substances aromatiques. L'expression des gènes impliqués dans le remodelage de la paroi est fortement induite lors de la formation des cellules géantes (Sobczak *et al.*, 2011). L'analyse de dix gènes codant pour des cellulose synthases chez *A. thaliana* montre une expression des gènes codant pour des celluloses synthases *CES4*, *CES5*, *CES7* et *CES8* dans les galles (Hudson, 2008). Plusieurs autres gènes codant pour des protéines structurales ou d'autres enzymes de synthèse de composants de la paroi sont différentiellement régulés au cours des interactions plante-nématodes à galles (e.g. xyloglucan endotransglycosylase, glycosyl hydrolase) (Jammes *et al.*, 2005; Barcala *et al.*, 2010; Ibrahim *et al.*, 2011). Les protéines modifiant la paroi comme les expansines, les endoglucanases, les polygalacturonases sont également impliquées dans l'extension de la paroi des cellules géantes (Sobczak *et al.*, 2011). Les analyses par puces à ADN ont confirmé que des gènes codant pour différentes enzymes de remodelage de la paroi, y compris des expansines et des xyloglucanes transglycosylases sont activées très tôt (dès 3 jai) dans la réponse de la plante aux nématodes à galles (Jammes *et al.*, 2005; Barcala *et al.*, 2010; Ibrahim *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2013a). Les expansines induisent rapidement l'extension des parois cellulaires de la plante en affaiblissant les interactions non covalentes. Chez la tomate, le gène codant pour l'expansine LeEXPA5 est exprimé dans la galle

au niveau des cellules qui entourent les cellules géantes. L'inhibition de l'expression du gène *LeEXP55* par ARNi affecte le développement des nématodes (Gal *et al.*, 2006). La dégradation de la paroi est également impliquée dans la formation de la cellule géante. Les gènes codant pour une pectine acétyl estérase et les endoglucanases sont surexprimés lors du développement des cellules géantes (Goellner *et al.*, 2001; Vercauteren *et al.*, 2002; Mitchum *et al.*, 2004). En plus des modifications de la paroi par les enzymes végétales lors de la formation des cellules géantes, les nématodes à galles sécrètent eux-mêmes une batterie d'enzymes diverses dégradant la paroi (Ding *et al.*, 1998; Jaubert *et al.*, 2002a; Mitreva-Dautova *et al.*, 2006; Ledger *et al.*, 2006; Abad *et al.*, 2008).

Les études de transcriptomique ont ainsi permis de montrer que l'induction des cellules géantes par les nématodes à galles est le résultat d'une vaste reprogrammation de l'expression génique des cellules racinaires ciblées. Chez les eucaryotes, les principaux régulateurs de l'expression génique sont les facteurs de transcription, la modification de l'état de la chromatine et les petits ARN. A ce jour on dispose de peu de connaissances quant au rôle de ces régulateurs dans la formation des cellules géantes. Au cours de ce travail de thèse je me suis particulièrement intéressée aux petits ARN régulateurs de l'expression génique et leur rôle dans la reprogrammation transcriptionnelle lors de la formation des galles. Les petits ARN sont des régulateurs majeurs de l'expression génique puisqu'ils ont un vaste panel de moyens de régulation alliant la régulation post-transcriptionnelle des gènes cibles (dont de nombreux facteurs de transcription) mais aussi une régulation transcriptionnelle impliquant des régulations par la méthylation de l'ADN.

4. Les petits ARN chez les plantes

4.1. Mécanisme général de l'extinction de gènes ou « gene silencing »

Le mécanisme d'inhibition de l'expression de gènes par ARN interférent (ARNi) appelé aussi extinction de gènes ou "gene silencing" a été découvert de façon fortuite chez les plantes dans les années 1990 par Napoli *et al.*, (1990) et van der Krol *et al.*, (1990). Afin de renforcer la couleur pourpre des pétales de pétunia, un vecteur portant la séquence codante du gène codant pour la chalcone synthase, impliquée dans la voie de biosynthèse du pigment pourpre, a été introduit dans la plante. La surexpression de ce gène a pourtant provoqué un phénotype révertant avec des fleurs partiellement ou totalement blanches. La surexpression de ce transgène a ainsi provoqué l'extinction du gène artificiel mais aussi celle du gène endogène. En 1994, Wassenegger *et al.* (1994) ont montré chez *A. thaliana* que l'introduction d'un ARN double brin déclenche la méthylation de l'ADN correspondant. Cette étude mit en évidence le rôle prépondérant de la molécule ARN double brin dans le « gene silencing » chez les plantes. Enfin en 1998, Andrew Z. Fire et Craig C. Mello ont montré de façon remarquable que l'expression des ARNm et protéines pouvaient être réduite spécifiquement dans les cellules du nématode modèle *Caenorhabditis elegans* en y introduisant un ARN double brin exogène. Ce phénomène fut alors nommé ARN interférence (Fire *et al.*, 1998). Le « gene silencing » ne se limite pas à l'introduction d'ARN exogène mais est également un mécanisme qui se produit dans la cellule et est déclenché par la présence d'ARN double brin endogène provenant de différentes origines. Chez les plantes, les ARN double brin endogènes se forment suite à 1) la transcription d'un ARN simple brin qui va se replier dans une conformation en tige boucle 2) l'hybridation de deux ARN distincts possédant des séquences complémentaires ou 3) la néo-synthèse d'un ARN complémentaire par une ARN polymérase ARN dépendante (RDR) à partir d'un ARN simple brin matrice (Fig. 21). Le précurseur double brin est reconnu et clivé par une protéine DICER-LIKE (DCL) produisant ainsi des duplex d'ARN d'une vingtaine de nucléotides (nt) (Hamilton & Baulcombe, 1999). Chez les plantes, les petits ARN non codant maturés par les protéines de la famille DCL ont une taille comprise entre 20 et 24 nt. Un des deux brins de ce duplex est alors chargé dans une protéine ARGONAUTE (AGO) qui constitue le composant central du complexe multiprotéique RISC (« RNA Induced Silencing Complex »). Une fois chargée dans AGO, le petit ARN guide le complexe RISC vers un ARN cible par complémentarité de séquence (Hannon *et al.*, 2000). Une grande variété de protéines AGO et DCL ont été identifiées chez les plantes, comme chez *A. thaliana* où 10 gènes AGO et 4 DCL ont été identifiés (Vaucheret, 2008). Les différentes DCL comme les différents clades d'AGO sont spécifiques d'un type de petit ARN. Selon le type de protéines AGO qu'il contient, le

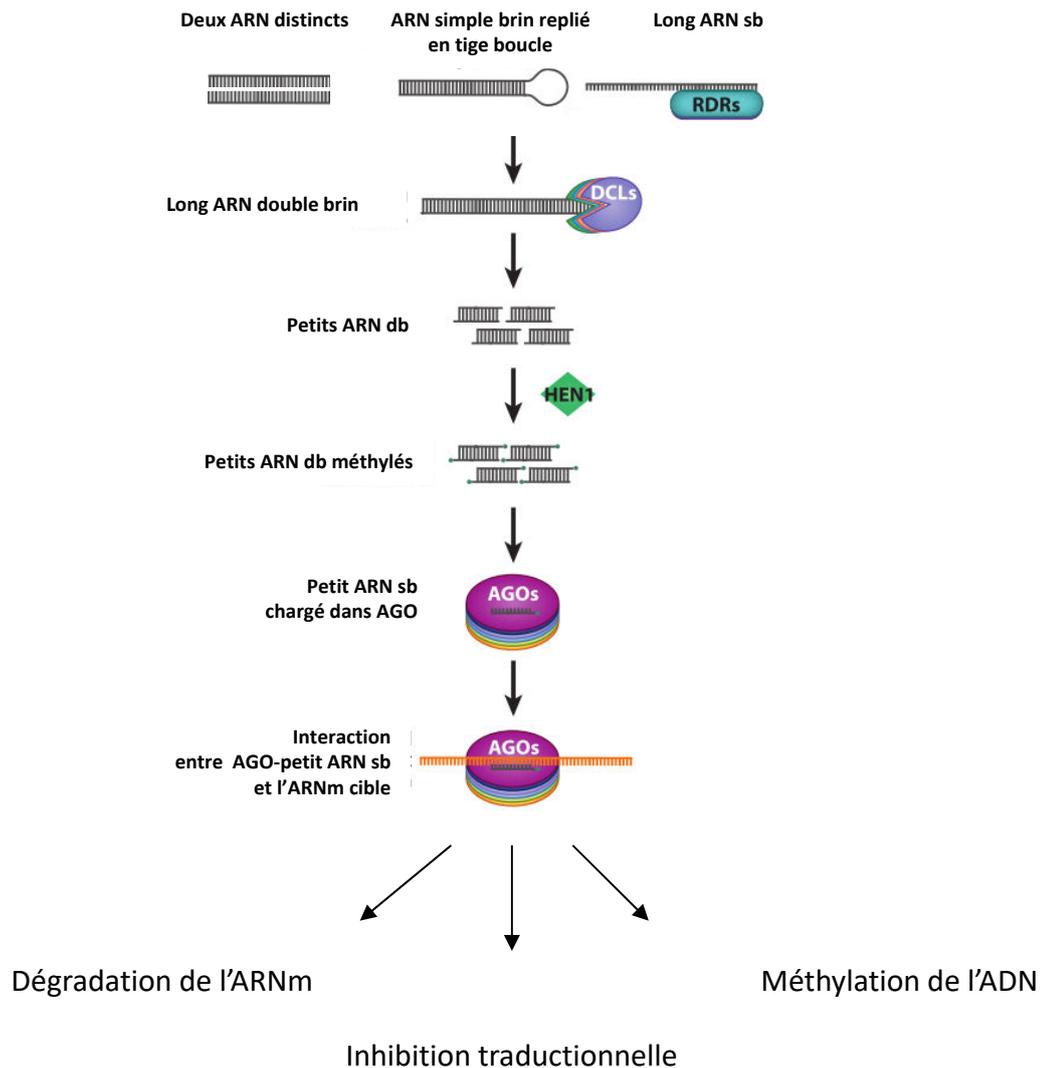


Figure 21 : Modèle général de l'action des petits ARN.

Les précurseurs ARN double brin sont issus d'un ARN simple brin replié en tige boucle (hairpin ARN) ou de l'appariement de deux brins complémentaires ou encore de la néosynthèse d'un brin complémentaire par une ARN polymérase ARN dépendante (RDR) à partir d'un ARN matrice . Le précurseur ARN double brin est clivé par une enzyme DICER-LIKE (DCL) en duplexes de petits ARN qui sont méthylés par HEN1 afin de les stabiliser et éviter leur dégradation. Un brin de ce duplex est ensuite chargé dans une protéine ARGONAUTE (AGO) et va guider la protéine de manière séquence spécifique vers un ARNm cible. La liaison entre le petit ARN et l'ARNm cible par complémentarité de séquences parfaite ou imparfaite entraîne le clivage de l'ARNm, la répression traductionnelle ou encore la méthylation de l'ADNg.

(D'après Bologna et al. 2014)

complexe RISC entraîne une régulation dans le cytoplasme dite « Post-transcriptionnelle » des ARNm cibles ou PTGS (« post-transcriptional gene silencing ») via leur dégradation ou leur inhibition traductionnelle (Mallory & Bouché, 2008) ou alors entraîne une régulation dite « transcriptionnelle » ou TGS (« transcriptional gene silencing ») des gènes dans le noyau en induisant le dépôt de marques chromatiniennes répressives au niveau de l'ADN génomique (Ekwall *et al.*, 2004). Quel que soit le type de régulation, transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle, ce mécanisme se traduit par la répression de l'expression du gène concerné (Fig. 21). Le type de régulation de l'expression génique transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle dépend donc du type de petits ARN régulateurs et des facteurs protéiques de la machinerie de « gene silencing ».

4.2. Les principaux acteurs de la régulation de l'expression génique par les petits ARN

La biosynthèse des petits ARN non codants ainsi que leur fonction requiert donc l'activité d'un jeu de protéines dont les principales sont DCL, AGO, et RDR (Fig. 22). Les propriétés de ces principales enzymes chez *A. thaliana*, notre modèle d'étude, seront développées ci-dessous.

4.2.1. Les ARN polymérases ARN dépendante ou RDR

Les ARN polymérases ARN dépendante ou RDR (« RNA-Dependent RNA Polymerases ») sont des enzymes qui synthétisent *de novo* un brin d'ARN à partir d'un ARN simple brin matrice. Elles jouent un rôle majeur dans la biosynthèse de la plupart des petits ARN interférent ou siARN. Les RDR ont été identifiées chez les virus à ARN, les champignons, les plantes, les protistes et les nématodes mais sont absents de la drosophile et les mammifères (Zong *et al.*, 2009). Les RDR eucaryotes sont divisées en trois clades : le clade RDR α , β et γ (Zong *et al.*, 2009). Les plantes possèdent les RDR des clades α et γ . *A. thaliana* possède six gènes codant pour des RDR mais seuls *RDR1*, *RDR2* et *RDR6* appartenant au clade α possèdent le motif DLDGD commun aux RDR eucaryotes, à l'extrémité C-terminal du site catalytique. Les RDR du clade α participent à la génération des précurseurs des différentes catégories de siARN (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006; Pandey & Baldwin, 2007; Hwezi *et al.*, 2008; Pumplin & Voinnet, 2013). Les différentes RDR, tout comme les DCL, peuvent présenter une redondance fonctionnelle. Par exemple, chez *A. thaliana*, la régulation PTGS RDR6-dépendante des transgènes via les petits ARN est amplifiée chez les plantes portant des mutations dans le gène codant pour la RDR2, elle-même impliquée dans la régulation de type TGS. Ce résultat suggère que ces deux enzymes sont en compétition pour convertir le produit du transgène en double brin (Jauvion *et al.*, 2012).

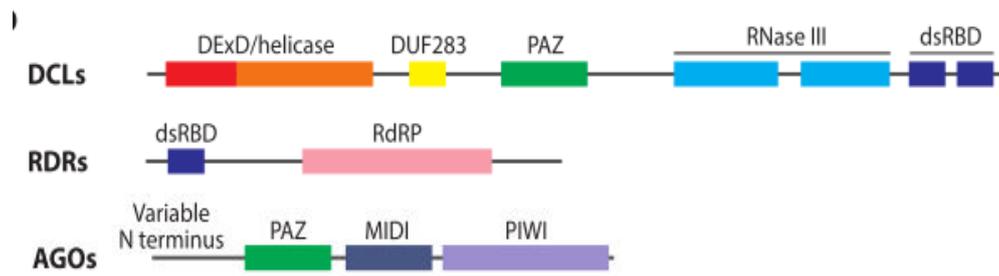


Figure 22 : Organisation des domaines conservés des protéines clés du « gene silencing ».
 DCL: Protéine Dicer-Like, RDR: ARN dépendante ARN polymerase, AGO: ARGONAUTE.
 (D'après Bologna et al. 2014)

4.2.2. Les protéines DICER-like ou DCL

Chez les plantes, la maturation des petits ARN nécessite l'action d'une ribonucléase à multi-domaines appelée DICER-like ou DCL. Cette enzyme possède un domaine DExD-box/helicase-C, un domaine de fonction inconnue (DUF283), un domaine PIWI/ARGONAUTE/ZWILLE (PAZ), deux domaines RNase-III, et un domaine de liaison à l'ARN double brin (dsRBD) (Margis *et al.*, 2006) (Fig. 22). Les domaines PAZ, RNase-III et dsRBD sont impliqués dans la liaison à l'ARN double brin et dans son clivage. Le domaine PAZ est directement connecté au domaine RNase-III par une hélice α et peut spécifiquement se lier aux deux bases en 3' de l'ARN double brin (MacRae *et al.*, 2006). L'intervalle entre le domaine RNase-III et le domaine PAZ détermine la longueur du duplex généré à partir du précurseur (MacRae *et al.*, 2006). DCL1, DCL2, DCL3 et DCL4 produisent respectivement des duplex de petits ARN de 21, 22, 24 et 21 nt. Les DCL sont une famille multigénique conservée aussi bien chez les animaux que les végétaux. Chez *A. thaliana* on dénombre 4 DCL chacune synthétisant une catégorie spécifique de petits ARN. Le type de DCL détermine non seulement la taille du duplex de petits ARN générés mais également le nucléotide présent en 5', deux caractéristiques qui influent sur le type de protéine ARGONAUTE (AGO) recrutée et donc sur le type de régulation réalisée.

4.2.3. Les protéines ARGONAUTES ou AGO

Les protéines AGO et AGO-like sont les protéines effectrices du « gene silencing ». Dans le génome d'*A. thaliana*, 10 gènes *AGO* ont été identifiés et sont regroupés en trois clades par une analyse phylogénétique : *AGO1,-5, et -10*; *AGO2,-3, et -7*; et *AGO4,-6,-8, et -9* (Mallory & Vaucheret, 2010a). Les AGO canoniques possèdent quatre domaines : un domaine N-terminal variable, et des domaines PAZ, MID, et PIWI hautement conservés (Mallory & Vaucheret, 2010b; Bologna & Voinnet, 2014) (Fig. 22). Le domaine MID est capable de reconnaître la base à l'extrémité 5' du petit ARN et le domaine PAZ se lie à son extrémité 3'. Ainsi, AGO1, -2, et -5 se lient préférentiellement aux petits ARN possédant à leur extrémité 5' une uridine, une adénosine et une cytosine respectivement (Mi *et al.*, 2008). Ensuite le domaine PIWI qui possède une activité d'endonucléase clive l'ARNm lié au petit ARN par complémentarité de séquence. Cette activité de clivage a été démontrée expérimentalement chez *A. thaliana* pour AGO1, -2, -7, et -10 et AGO4 (Zhu *et al.*, 2011; Manavella *et al.*, 2012; Carbonell *et al.*, 2012). Toutes les protéines AGO n'ont pas cette capacité de clivage, elles sont toutefois capables de bloquer la traduction en déstabilisant l'ARNm ou en le séquestrant dans des structures appelées « P-bodies » les rendant inaccessibles à la machinerie traductionnelle (Filipowicz *et al.*, 2008; Leung & Sharp, 2013). L'immunoprécipitation des protéines AGO de plantes a révélé un biais d'incorporation des petits ARN lié à la taille du petit ARN et à la nature du nucléotide à

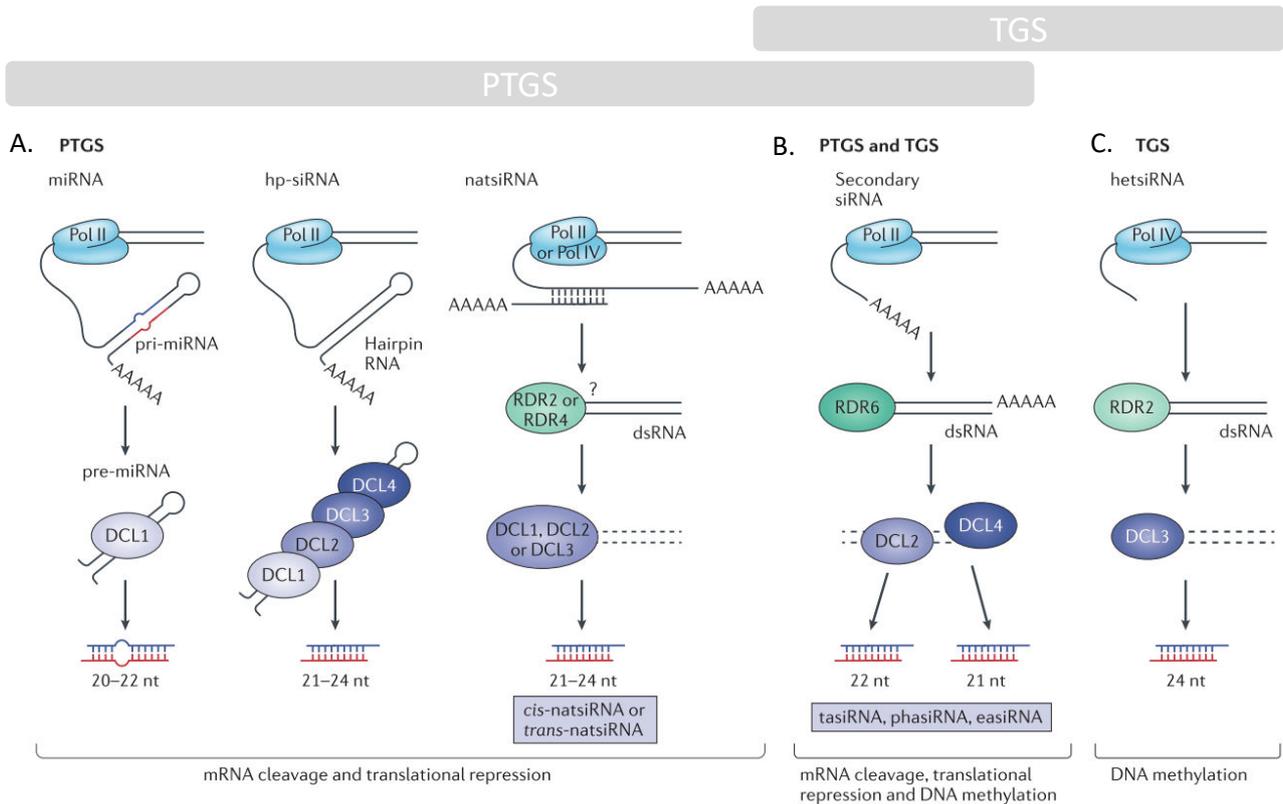


Figure 23: Biosynthèse des principales catégories de petits ARN de plantes.

A. Les microARN et siARN

Les gènes *MIR* sont transcrits par l'ARN polymérase II pour former des précurseurs repliés dans une structure tige-boucle appelé pri-miARN et maturés par DICER-LIKE 1 (DCL1) en des précurseurs plus courts appelés pre-miARN. Les pre-miARN sont maturés par DCL1 en duplex de miARN de 20-22nt. Les microARN sont impliqués dans la régulation PTGS (post-transcriptional gene silencing), ils provoquent le clivage des transcrits ou la répression traductionnelle. Les hp-siARN dérivés également de structures en tige-boucle sont produits à partir de séquences inversées-répétées et sont maturés par les protéines DCL1-4. Ces structures en tige-boucle pourraient évoluer en microARN et sont souvent désignées comme des proto-miARN. Les natural antisense siARNs (natsiARNs) sont produits à partir d'ARN double brin formés suite à la transcription de deux gènes se chevauchant (cis-natsiARNs) ou transcrits à différents *loci* mais présentant une complémentarité de séquences (trans-natsiARNs).

B. Les siARN secondaires

Les précurseurs des petits ARN secondaires sont transcrits par Pol II et peuvent être issus de loci non codant, de loci codant pour des protéines ou d'éléments transposables. Ces transcrits sont convertis en ARN double brins par la ARN-DEPENDENT ARN POLYMERASE 6 (RDR6) qui sont à leur tour maturés par DCL2 et DCL4 pour produire des petits ARN de 22 ou 21 nt respectivement. Les siARN secondaires sont divisés en trans-acting siARNs (tasiARNs), phased siARN (phasiARNs) et epigenetically activated siARNs (easiARNs). Les siARN secondaires sont pour la plus part impliqués dans la PTGS (phasiARN et tasiARN) mais les easiRNA peuvent également initier la ARN-directed DNA methylation (RdDM) à des loci spécifiques.

C. Les heterochromatic siARNs

Les heterochromatic siARNs (hetsiARNs ou hcsiARNs) sont dérivés d'élément transposables et de séquences répétées préférentiellement localisées dans les régions péri-centromériques. Leur biogénèse requiert Pol IV pour la transcription et RDR2 pour la synthèse de l'ARN double brin qui est par la suite maturé en petits ARN de 24 nt par DCL3. Ces petits ARN sont impliqués dans la TGS via la RdDM induisant principalement la méthylation des cytosines au niveau de l'ADN.

(De Borges et al. 2015)

son extrémité 5' (Zheng *et al.*, 2007; Mi *et al.*, 2008; Montgomery *et al.*, 2008). Ainsi AGO4, -6, and -9 sont associés aux petits ARN de 24 nt de long alors que AGO1, -2, -5, -7 et -10 se lient aux petits ARN de 21–22 nt de long.

4.3. Les petits ARN non codant chez les plantes

4.3.1. La régulation post-transcriptionnelle (PTGS) et les différents types de petits ARN associés à la PTGS

Chez les plantes, il existe une grande diversité des petits ARN régulateurs de l'expression génique. Certains petits ARN agissent au niveau post transcriptionnel. Les régulations de type PTGS induite par les petits ARN entraîne la dégradation du transcrite ciblé ou sa répression traductionnelle suite à l'appariement du petit ARN (chargé dans AGO) avec son ARNm cible sur la base de la complémentarité des séquences. Les catégories de petits ARN associés au PTGS sont (i) les microARN (miARN), (ii) les « hairpin » ARN (hpARN), (iii) les natural antisense-siARN (nat-siARN) et (iv) les siARN secondaires (phasiARN et tasiARN) (Fig. 23). Ces différentes catégories de petits ARN seront détaillées par la suite à l'exception des hpARN qui restent peu explorés à ce jour. Le degré de complémentarité de séquences entre le petit ARN et sa cible est crucial pour orienter la régulation PTGS vers le clivage de l'ARNm cible ou vers la répression traductionnelle. Le clivage de l'ARNm est généralement favorisé par une complémentarité parfaite ou quasi-parfaite entre la séquence du miARN/siARN et l'ARNm (Yekta *et al.*, 2004; Mallory *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2005). Les produits de clivage des petits ARN sont dégradés selon le même processus de dégradation que les ARNm c'est-à-dire l'adénylation du produit de dégradation et l'adressage à l'exosome où il sera dégradé par des endo- et exonucléases. Dans le cas de la répression traductionnelle, il a été montré que les « Processing bodies » ou « P-bodies », des structures granuleuses présentes dans le cytoplasme, contiennent des enzymes qui sont impliquées dans la dégradation de l'ARNm. Le lien entre les P-bodies et les miARN repose sur la colocalisation des ARGONAUTES et des polysomes associés à l'ARNm avec les P-bodies. Il semblerait donc que le P-body « séquestre » les ARNm liés aux AGO afin qu'ils ne soient pas accessibles à la machinerie de traduction (Valencia-Sanchez *et al.*, 2006).

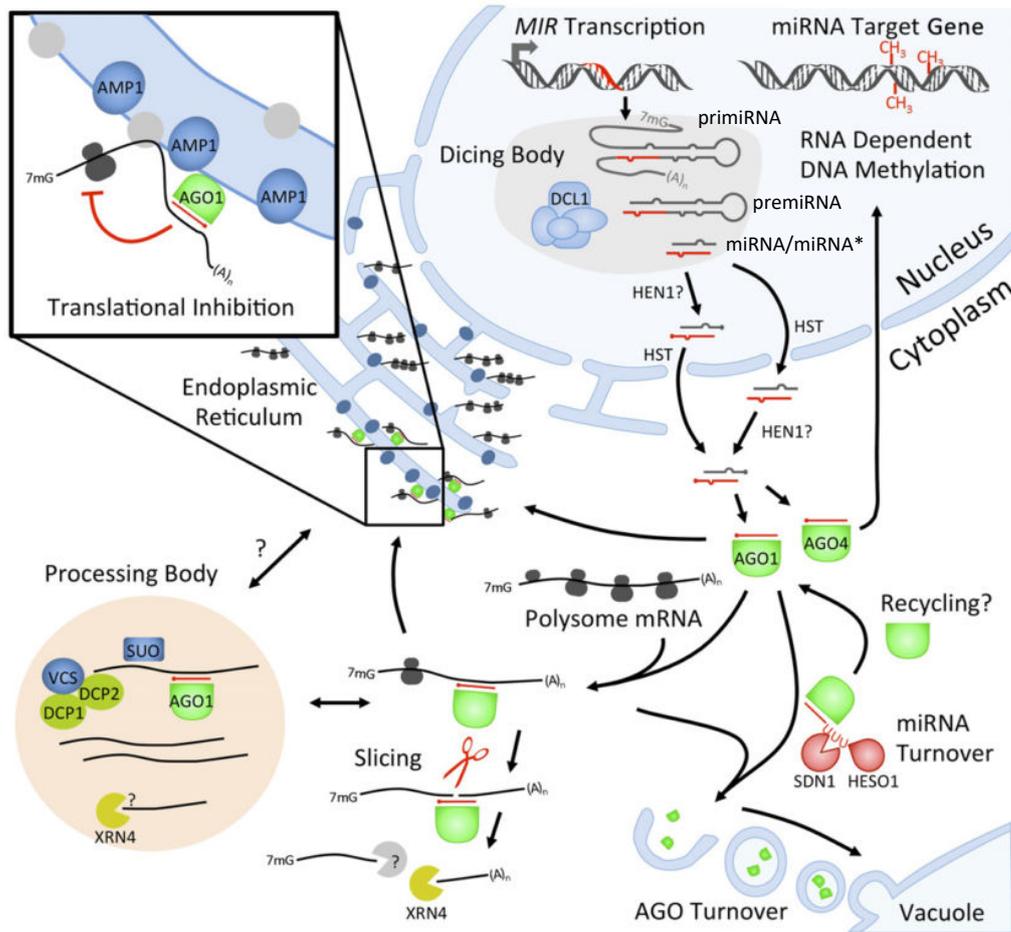


Figure 24: Régulation de l'expression des gènes par les microARN.

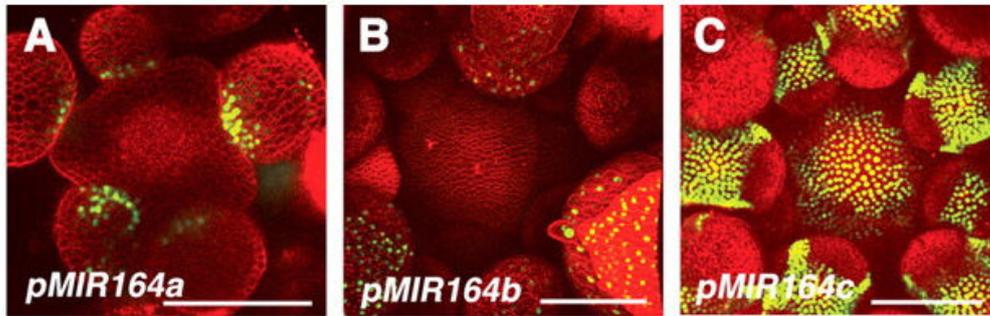
Dans le noyau, la transcription d'un gène *MIR* produit un précurseur ARN double brin avec une conformation en tige boucle appelé pri-miARN et mûré en pre-miARN par DICER-LIKE 1 (DCL1). Le pre-miARN est ensuite clivé par DCL1 en duplexes de microARN qui vont être méthylés par HEN1 et exportés vers le cytoplasme. Les microARN sont incorporés dans les protéines AGO et induisent l'inhibition de l'expression des gènes en induisant la dégradation des transcrits ou la répression traductionnelle. Les Processing bodies ou P-bodies sont associés aux microARN et à AGO1 et sont impliqués dans la répression traductionnelle probablement via la séquestration de l'ARNm. La protéine *ALTERED MERISTEM PROGRAM1* (*AMP1*) associée au réticulum endoplasmique est également associée à AGO1 et localise une partie de la répression traductionnelle dans le réticulum endoplasmique. La répression traductionnelle par les microARN est un phénomène rare chez les plantes. Dans quelques rares cas, les microARN associés à AGO4 peuvent également être relocalisés au noyau pour induire la méthylation des cytosines de l'ADN.

(Adapté de Rogers et al. 2013)

4.3.1.1 Les microARN ou miARN

Au sein du génome, les gènes *MIR* codant pour les précurseurs des miARN sont transcrits par l'ARN Polymérase II en un ARN simple brin appelé pri-miARN. En raison de sa séquence nucléotidique, le pri-miARN est capable de se replier sur lui-même dans une conformation de type tige-boucle (Fig. 23 et 24). Le pri-miARN est clivé dans le noyau au niveau des "dicing bodies" par DCL1 associée notamment à HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) et SERRATE (SE) pour produire une molécule plus courte, le "pré-miARN" (Schauer *et al.*, 2002; Kurihara *et al.*, 2006; Rogers & Chen, 2013). Le pré-miARN est à son tour clivé par DCL1 et ses cofacteurs dans les « dicing bodies » générant ainsi un duplex composé du miARN mature et son brin complémentaire dont la taille majoritaire est de 21 nt de long. La protéine HUA ENHANCER 1 (HEN1) dépose alors un groupe méthyl sur l'extrémité OH de chaque brin du duplex de miARN ainsi formé pour les protéger de la dégradation (Yu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005). Le duplex de miARN est ensuite activement transporté du noyau au cytosol grâce à une interaction avec l'orthologue (chez les plantes) de l'exportine 5 (de mammifères) nommé HASTY (HST) (Park *et al.*, 2005). Un des deux brins du duplex est alors chargé dans la protéine AGO1 qui est le constituant principal du complexe multi-protéique RISC de la voie PTGS. Le brin chargé dans AGO1 guidera le complexe RISC vers les ARNm cibles par complémentarité de séquence entraînant le clivage de la cible ou de l'inhibition de la synthèse protéique comme nous l'avons vu précédemment. Chez les plantes la complémentarité de séquence entre le miARN et sa cible s'étend sur toute la séquence du miARN à l'exception d'un ou deux mésappariements en 5' du miARN. La zone de clivage est généralement située au centre de la séquence du miARN sur la position 10 ou 11. Une complémentarité parfaite au niveau du site de clivage est indispensable pour induire le clivage de l'ARNm (Franco-Zorrilla *et al.*, 2007). La majorité des miARN de plantes induisent la dégradation des ARNm ciblés, toutefois il existe plusieurs exemples d'inhibitions traductionnelles induites par les miARN (Chen, 2004; Dugas & Bartel, 2008; Yan *et al.*, 2012; Zhang & Li, 2013). Par exemple, chez *A. thaliana*, miR172 réprime directement la traduction de la protéine APETALA2 (Chen, 2004). Récemment un nouveau type de miARN de 24 nt a été identifié chez le riz et *A. thaliana* dont la synthèse dépend d'une autre voie impliquant DCL3 (Vazquez *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010; Chellappan *et al.*, 2010). Ces miARN de 24 nt, appelés long miARN, agissent différemment des miARN classiques puisqu'ils sont capables de réprimer l'expression du gène cible en induisant la méthylation de l'ADN génomique (Wu *et al.*, 2010; Chellappan *et al.*, 2010). Ces long miARN appartiennent donc à la voie du TGS.

Chez *A. thaliana* une majorité des gènes *MIR* sont présents en plusieurs copies dans le génome constituant ainsi des familles multigéniques. Bien que la séquence des précurseurs des miARN de la



D.

	1	10	21
	-----+-----+		
ath-nir164a	TGGAGAAGCAGGGCACGTGCA		
ath-nir164b	TGGAGAAGCAGGGCACGTGCA		
ath-nir164c	TGGAGAAGCAGGGCACGTGCG		

Figure 25: Profil d'expression de *MIR164a*, *MIR164b* et *MIR164c* dans les inflorescences de plantes d'*A. thaliana* sauvages.

A-C. Images de microscopie confocale d'inflorescences appartenant à des plantes transgéniques portant la construction 3xVENUS-N7 (jaune/vert) sous le contrôle du promoteur de *MIR164a*, *MIR164b* et *MIR164c*

Barre d'échelles: 100µm.

(D'après Sieber et al. 2007)

D. Alignement des séquences matures de miR164a, miR164b et miR164c.

même famille diverge, la séquence des miARN matures ne varie que d'un ou deux nucléotides et partagent souvent les mêmes cibles (Palatnik *et al.*, 2007). En revanche, les membres d'une même famille diffèrent souvent par leur profil d'expression. C'est le cas de la famille miR164 composée de trois membres: miR164a, miR164b et miR164c chez *A. thaliana* (Fig. 25). Les promoteurs de *MIR164a* et *MIR164c* sont tous deux actifs dans les fleurs où ils ont un patron d'expression chevauchant à la frontière entre le méristème floral et le primordium floral ainsi que dans les jeunes bourgeons (Baker *et al.*, 2005; Sieber *et al.*, 2007). En revanche, le promoteur de *MIR164b* est actif dans les sépales mais apparaît comme exclu des méristèmes floraux (Sieber *et al.*, 2007).

Certaines familles de miARN sont très conservées au sein du règne végétal comme les familles miR167, miR398, miR156, miR157. Toutefois, de récentes études ont montré que le nombre de miARN spécifiques d'une espèce est plus important que le nombre de miARN conservés (Cui *et al.*, 2017). Néanmoins la plupart des miARN pour lesquels on dispose des données fonctionnelles et dont le rôle est démontré expérimentalement chez les plantes sont des miARN conservés. Des analyses *in silico* ont montré que parmi 155 espèces de plantes testées, 682 miARN avaient été prédits dont 15 familles de miARN conservées chez 11 espèces de plantes (Sunkar & Jagadeeswaran, 2008). Certaines familles de miARN sont particulièrement conservées comme miR319, miR156/157, miR169, miR165/166 et miR394 qui ont été identifiés dans plus de 40 espèces différentes de plantes (Sunkar & Jagadeeswaran, 2008). De plus les fonctions de ces miARN peuvent être conservées entre espèces comme miR165/miR166 et miR156 dont l'activité est indispensable au développement de la feuille et la transition florale respectivement chez le maïs et *Arabidopsis* (Willmann *et al.*, 2007). Certains miARN conservés peuvent également avoir les mêmes cibles chez différentes espèces (Jones-Rhoades, 2012) ou à l'inverse ils peuvent avoir des cibles différentes selon l'espèce de plante étudiée.

4.3.1.2 Les siARN : nat-siARN et Les siARN secondaires

Les siARN impliqués dans le PTGS sont des petits ARN de 20-24nt produits par la maturation de précurseurs ARN double brin issus de l'appariement de deux brins complémentaires ou de la néosynthèse d'un brin complémentaire à partir d'un transcrit matrice par l'action d'une ARN polymerase ARN dépendante (RDR). Les siARN constituent une famille complexe divisée en plusieurs sous familles selon leur mode de biosynthèse. On distingue les siARN anti-sens naturel ("natural anti-sens siRNA") ou nat-siARN et les siARN secondaires ("secondary siRNA"), ces derniers étant eux même sous-divisés en plusieurs catégories.

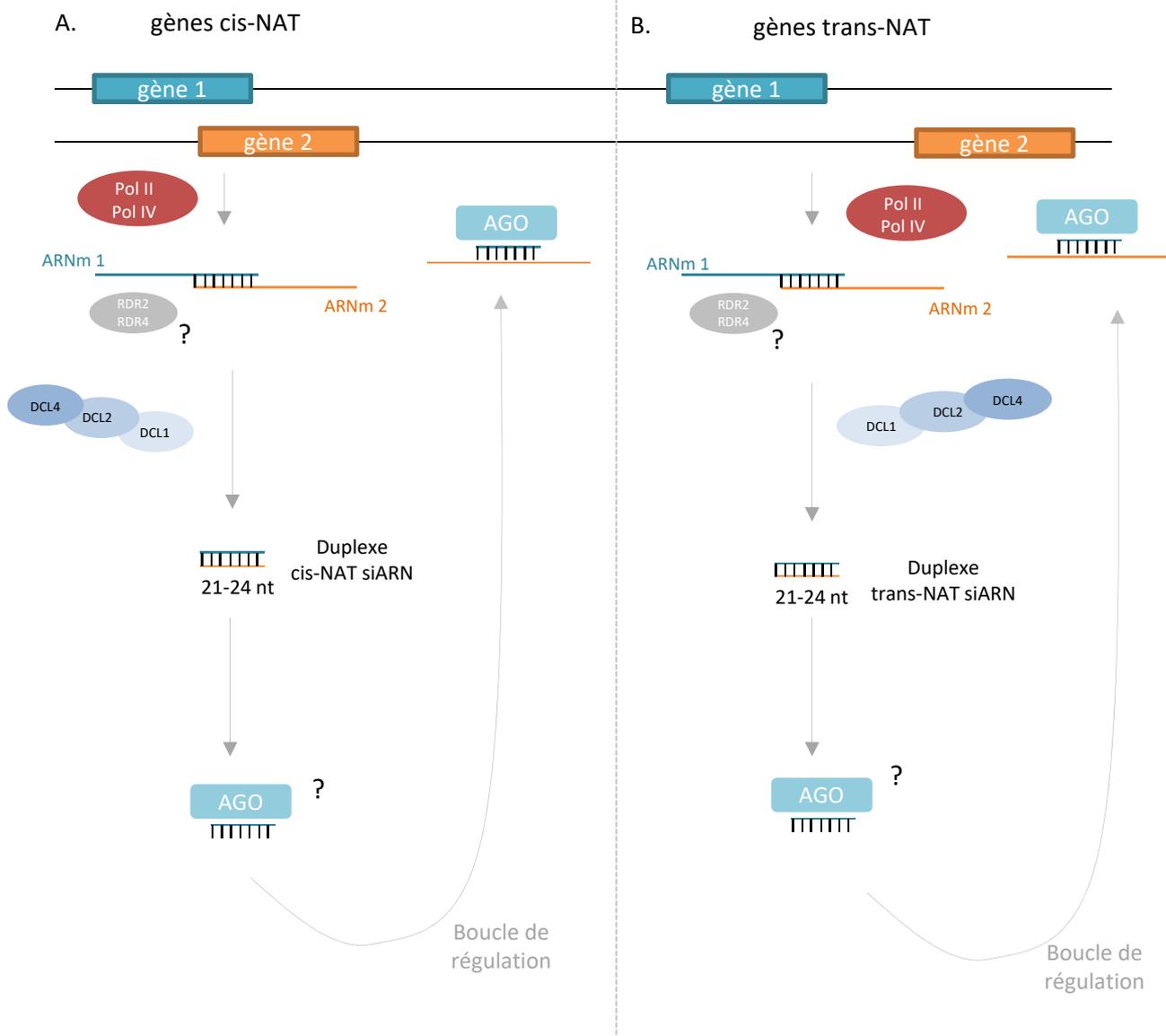


Figure 26 : Voie de biosynthèse et d'action des NAT siARN.

Les natural antisense siARNs (NAT siARNs) se divisent en deux catégories : les cis-NAT siARN (A) et les trans-NAT siARN (B). Les cis-NAT siARN sont produits à partir de la maturation d'un précurseur ARN double brin issu de la transcription de deux gènes chevauchant (gène 1 et gène 2). Les trans-NAT sont produits à partir de la maturation d'un précurseur ARN double brin issu de la transcription de deux gènes situés à des loci distincts mais présentant une complémentarité de séquences. La biogénèse des nat-siARN est encore mal connue, elle impliquerait Pol II et PolIV pour la transcription des deux gènes et RDR2 ou RDR4 pour la néoformation du précurseur ARN double brin. Les protéines DICER-LIKE 1 (DCL1), DCL2 et DCL4 découpent le précurseur ARN double brin en petits ARN de taille comprise entre 21 et 24 nt. Une boucle de régulation a été mise en évidence, les NAT siARN issus du gène 1 ciblent la répression PTGS du gène 2. Ainsi les profils de ces deux gènes apparaîtront anti-corrélés lorsque cette boucle de régulation est activée.

Les précurseurs ARN double brin des nat-siARN résultent de l'hybridation de deux brins d'ARNm issus de deux gènes différents co-exprimés et présentant une complémentarité de séquence sur une partie du transcrit. Lorsque les ARNm complémentaires sont issus de deux gènes dits "chevauchant" situés sur le même locus chromosomique mais sur des brins opposés, on parle de cis-nat-siARN (Fig. 26). Lorsque les ARNm complémentaires sont issus de gènes avec des localisations différentes, on parle de trans-nat-siARN. Seuls les cis-nat-siARN ont été décrits chez les plantes avec une validation fonctionnelle contrairement aux trans-nat-siARN dont la réalité biologique n'est pas encore démontrée (Axtell, 2013a). Une étude a montré que la production d'un cis-nat-siARN de 24 nt de long est induit par le stress salin et résulte du clivage d'un précurseur ARN double brin issu du chevauchement des gènes *P5CDH* (*At5g62530*) et *SRO5* (*At5g62520*) (Borsani *et al.*, 2005). De plus, un cis-nat-siARN de 22 nt de long a également été montré comme induit par la bactérie *Pseudomonas* à partir des transcrits des gènes *ATGB2* (*At4g35860*) – *PPRL* (*At4g35850*) (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2007). Par ailleurs Ron *et al.*, (2010) ont également démontré que les ARNm des gènes *KPL* (*At5g63720*) - *ARI4* (*At5g63730*) s'accumulent au cours du développement du pollen et sont associés à une accumulation de petits ARN de 21 nt au niveau de la région chevauchante. Dans le génome d'*A. thaliana* 1340 paires de gènes chevauchant (cis-nat) ont été identifiés dont 957 paires présentent une transcription active pour les deux gènes comme le confirme l'identification d'ADNc pleines longueurs correspondant aux deux transcrits dans les banques de données (Wang *et al.*, 2005a). Toutefois, tous les gènes cis-nat ne génèrent pas des siARN. Seul 6% à 16%, chez *A. thaliana* et le riz respectivement, des gènes cis-nat présentent une quantité de siARN conséquentes (plus de 10 siARN par millions de séquences) (Zhang *et al.*, 2012). Différentes protéines comme DCL1-HYL1-RDR2-SGS3 (Ron *et al.* 2010) ou DCL2-RDR6-SGS3 et NRPD1a (Borsani *et al.* 2005) ont été décrites comme impliquées dans la synthèse de certains nat-siARN, toutefois les facteurs impliqués semblent différer d'un nat-siARN à l'autre. Une étude globale des nat-siARN a récemment conclu que les nat-siARN de 21 nt dépendaient de l'action de RDR6-DCL1 et DCL2 alors que la synthèse des nat-siARN de 24 nt dépendait de RDR2 et DCL3 (Yuan *et al.*, 2015). Les gènes cis-nat peuvent former des boucles de régulation dans lesquelles les cis-nat-siARN dérivés du transcrit d'un des deux gènes chevauchant cible le transcrit de l'autre gène. Cette boucle de régulation se manifeste alors par une expression anti-corrélée des deux gènes chevauchant. Jin *et al.*, (2008) ont ainsi identifié chez *A. thaliana* 155 paires de gènes cis-NAT présentant des profils d'expression anticorrélés.

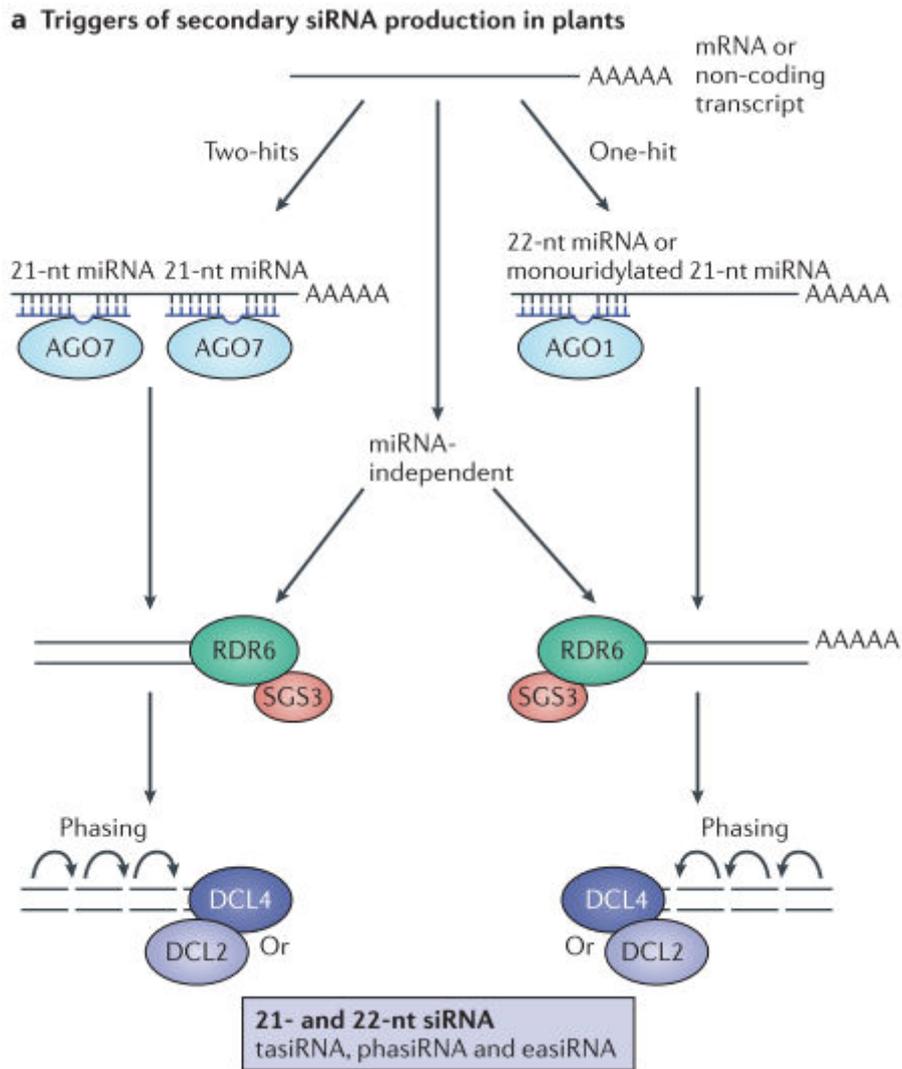


Figure 27 : Voie de biogénèse des siARN secondaires.

Les microARN sont capables d'induire la production de siARN secondaires à partir d'ARNm, d'ARN non codant ou issus d'éléments transposables. Le mécanisme admis pour la biogénèse des petits ARN secondaires comprenant les trans-acting siARN (tasiARN), les phased siARN (phasiARN) et les epigenetically activated siARN (easiARN) se distingue en deux voies. La première voie est appelée "two hit" dans laquelle deux microARN de 21 nt de long ciblent un même ARNm à deux positions distinctes et requiert la protéine ARGONAUTE 7 (AGO7). La seconde voie appelée "one-hit" implique un microARN de 22 nt de long incorporé dans AGO1 ou un variant de 22 nt qui est issu de la monouridylation d'un microARN de 21 nt. Dans les deux voies, ARN-DEPENDENT ARN POLYMERASE 6 (RDR6) et SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3 (SGS3) utilisent les produits de dégradation de l'ARNm ciblé par les microARN pour synthétiser un ARN double brin. Ce dernier sera ensuite maturé par DCL2 et DCL4 en petits ARN secondaires de 22 et 21 nt respectivement. D'après Borges et al. 2015

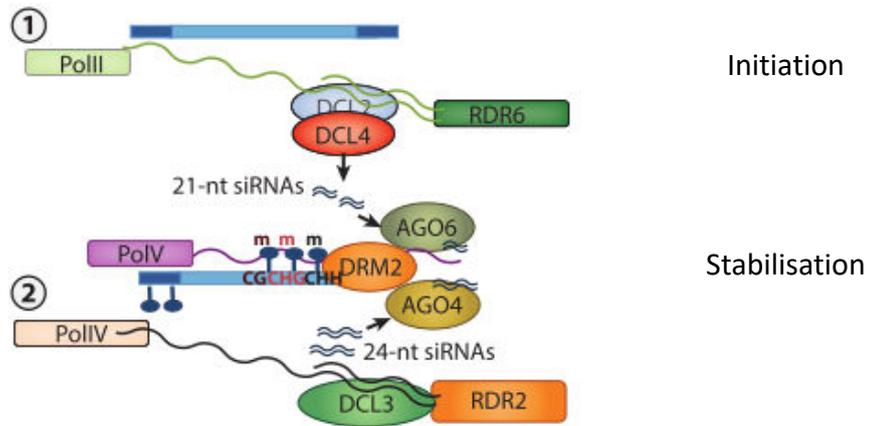
Les siARN secondaires sont issus de précurseurs ARN double brin formés à partir de produits de clivage résultant de l'action de deux miARN de 21 nt ou un seul miARN de 22 nt et d'AGO1 et AGO7 (Fig. 27) (Allen *et al.*, 2005; Yoshikawa *et al.*, 2005; Axtell *et al.*, 2006). Suite au clivage d'un ARNm par un miARN, les produits de clivage servent de brin matrice à la protéine RDR6 associée à son cofacteur SGS3 pour synthétiser un brin complémentaire générant ainsi un précurseur double brin qui est ensuite clivé par DCL4 et DCL2 en duplex de petits ARN de 21 et 22 nt respectivement. Il existe plusieurs catégories de siARN secondaires : les siARN phasés (« phased-siARNs ») ou phasiARN qui intègrent les trans-acting siARN (tasiARN) et les « epigenetically activated » siARN (easiARN) (Borges & Martienssen, 2015). Les easiARN régulant l'expression de leur cible au niveau transcriptionnel seront détaillés dans un paragraphe ultérieur dédié au TGS.

Les siARN secondaires sont phasés c'est-à-dire que l'enzyme DCL clive le transcrite cible du miARN tous les 21 ou 22 nt générant des siARN phasés (Allen *et al.*, 2005; Ronemus *et al.*, 2006; Axtell *et al.*, 2006). Lorsqu'ils agissent en *trans* et ciblent les transcrits d'un gène différent de celui à partir duquel les siARN ont été générés, on parle de siARN actifs en *trans* (« trans-activated siRNA ») ou tasiARN. Chez *A. thaliana*, les phasiARN sont rares dans les cellules somatiques. Seules quatre familles de gènes *TAS* ont été identifiées chez *A. thaliana*. Les transcrits des gènes *TAS1a*, *TAS1b*, *TAS1c* et *TAS2* sont ciblés par miR173, alors que les gènes *TAS3a*, *TAS3b* et *TAS3c* sont ciblés par miR390 et *TAS4* est ciblé par miR828 (Yoshikawa *et al.*, 2005; Rajagopalan *et al.*, 2006; Fei *et al.*, 2013). Le gène *TAS3* est le plus conservé puisqu'il est présent chez les gymnospermes et angiospermes (Fei *et al.*, 2013). Contrairement à *A. thaliana*, d'autres génomes de plantes tels que le riz, *Medicago* et le maïs contiennent des centaines de loci générateurs de phasiARN (Johnson *et al.*, 2009; Zhai *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013). Dans ces plantes, les phasiARN ciblent différentes familles de gènes et en particulier les gènes de la famille NB-LRR (Fei *et al.*, 2013)

4.3.2 La régulation transcriptionnelle (TGS)

Chez les plantes, la méthylation des cytosines de l'ADN génomique modifie la structure de la chromatine et impacte l'expression des gènes. Cette méthylation peut intervenir dans différents contextes : CG, CHG, CHH (ou H = A, C ou T) et dans les corps du gène comme dans les régions promotrices (Cokus *et al.*, 2008; Lister *et al.*, 2008). Le rôle principal de la méthylation de l'ADN est de maintenir l'intégrité du génome en empêchant l'activation des éléments transposables. Cette méthylation est décomposée en deux phases : une phase d'établissement de la méthylation et une phase de maintenance durant laquelle les méthylations de l'ADN sont conservées durant la réplication de l'ADN et les divisions cellulaires (Fig. 28). La phase d'établissement de la méthylation requiert l'action de siARN on parle alors de méthylation de l'ADN dirigé par l'ARN ou "RNA-directed

A. Etablissement de la méthylation de l'ADN



B. Maintenance de la méthylation de l'ADN

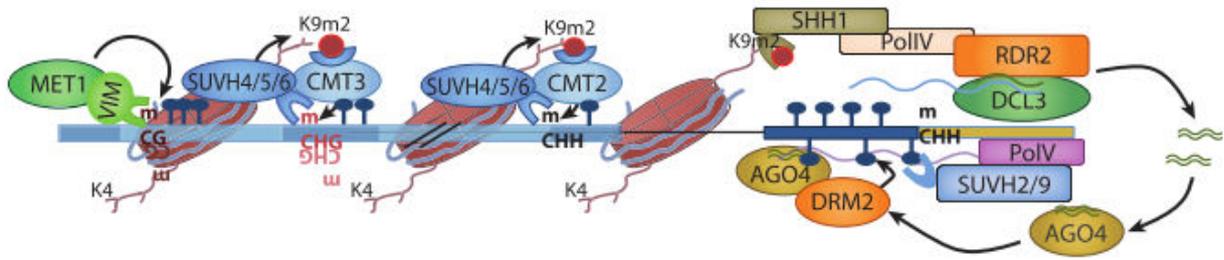


Figure 28 : La méthylation de l'ADN médiée par l'ARN (RdDM)

A. Etablissement de la méthylation de l'ADN.

Dans la voie PolV-RdDM, RDR6 reconnaît les transcrits dérivés d'éléments transposables produit par PolIII entraînant la néosynthèse d'un ARN double brin qui est mûré par DCL2 et DCL4 en petits ARN de 22 et 21 nt respectivement. Ces petits ARN sont chargés dans AGO6, qui guide DRM2 (et/ou DRM1) et induit la méthylation *de novo* au locus du TE, vraisemblablement d'une manière PolV dépendante. Le locus partiellement méthylé est ensuite transcrit par PolIV et RDR2 utilise ce transcrit pour générer un ARN double brin. Cet ARN double brin est mûré par DCL3 en petits ARN de 24 nt qui sont ensuite chargés dans AGO4 (et/ou AGO6/9) pour induire et stabiliser la méthylation *de novo* dans tous les contextes de séquences (e.g. CG, CHG, CHH)

B. Maintien de la méthylation de l'ADN.

Dans le cas de TEs longs et courts, les protéines VARIANT IN METHYLATION (VIM) reconnaissent les cytosines en contexte CG hémiméthylées et recrutent la méthyltransférase MET1, qui catalyse ensuite la méthylation sur le brin non méthylé lors la réplication. La méthylation des cytosines en contexte CHG est déposée par CMT3 lors de la liaison à la marque H3K9me2. Ce mécanisme est renforcé par les protéines SUVH (KYP) qui se lient aux cytosines méthylées CHG pour déposer la méthylation H3K9. Pour les TE long, CMT2 catalyse la méthylation en CHH, alors que chez les TE courts ou les gènes codant pour des protéines, la méthylation en CHH est réalisée par la voie RdDM. Les marques H3K9me2 recrutent la PolIV via SHH1. Un ARN double brin produit par RDR2 à partir d'une transcription dépendante de PolIV est ensuite mûré par DCL3 en heterochromatic siARN (hc-siARN) de 24 nt. Pour des TE courts, ces hc-siARN sont chargés dans AGO4 (et/ou AGO6/9) et interagissent de manière séquence spécifique avec un transcrit synthétisé par PolV pour recruter le DRM2, qui catalyse la méthylation des cytosines en CHH. (D'après Deleris et al. 2016).

DNA methylation" (RdDM). De même, la RdDM est un des mécanismes intervenant dans la phase de maintenance de la méthylation. La RdDM constitue donc un autre mécanisme d'action des siARN cette fois au niveau transcriptionnel, on parle donc de TGS. Je présenterai ici le mécanisme de la RdDM chez *A. thaliana* l'espèce pour laquelle le mécanisme a été le mieux décrit.

La phase d'établissement de la méthylation est elle-même décomposée en une étape d'initiation et une étape d'établissement. Au cours de l'étape d'initiation, RDR6 reconnaît les transcrits aberrants produits par la Polymérase II (Pol II) à partir des éléments transposables ou de séquences répétées et les utilisent comme brin matrice pour synthétiser un ARN double brin. Cet ARN double brin va être maturé par les enzymes DCL2 et DCL4 en petits ARN de 22 et 21 nt respectivement capables de réguler l'expression des gènes via la régulation de type TGS (Rigal *et al.*, 2012; Nuthikattu *et al.*, 2013; McCue *et al.*, 2015). Pour la régulation de type TGS, les petits ARN de 21 et 22 nt appelés siARN épigénétiquement activés (« epigenetically activated siRNAs ») ou « easiARN », dérivés des produits de clivage réalisé par un miARN, sont chargés dans la protéine AGO6 et s'hybrident par complémentarité de séquence à un ARN produit par la polymérase V (PolV). Ce processus aboutit à la méthylation de l'ADN par l'action de la *de novo* méthyltransferase DOMAINS REARRANGED METHYLASE 2 (DRM2); et potentiellement DRM1 dans tous les contextes de séquences (Eun *et al.*, 2011; Zhang & Zhu, 2012; McCue *et al.*, 2015; Duan *et al.*, 2015). Cette étape d'initiation de la phase d'établissement de la méthylation est aussi appelée voie « PolV-RNA-directed DNA methylation » (PolV-RdDM) (Matzke & Mosher, 2014). Une fois initiée, la méthylation est ensuite stabilisée. Le locus partiellement méthylé lors de l'étape d'initiation est ensuite transcrit par la Polymérase IV (PolIV ou NRPD1) générant un ARN simple brin. La protéine RDR2 utilise ce brin matrice pour synthétiser un ARN double brin qui ensuite est clivé par DCL3 en duplex de petits ARN de 24 nt appelés siARN hétérochromatiques (hc-siARN) (Matzke & Mosher, 2014). Les hc-siARN sont alors chargés dans AGO4, AGO6, ou AGO9 (Mi *et al.*, 2008; Havecker *et al.*, 2010) qui interagissent avec DRM2 (et potentiellement DRM1) induisant la méthylation des cytosines du locus qui a généré le transcrit ayant servi de matrice à PolV (Zhong *et al.*, 2014). Cette voie de stabilisation est également appelée PolIV-RdDM.

Une fois établie, les marques de méthylation de l'ADN sont maintenues au cours de la réplication de l'ADN et de la division cellulaire via différents mécanismes certains indépendants de la RdDM : les méthylation CG sont maintenues par la méthyltransferase MET1, les méthylation CHG sont maintenues par les chromométhylases 1 (CMT1) et CMT3 et les méthylation CHH sont maintenues par les CMT2 ou par la RdDM et les hc-siARN. Les types de mécanismes de méthylation de maintenance impliqués dépendent de la cible sur l'ADN génomique. La méthylation des longs éléments transposables (TE) riches en marques H3K9me2 est maintenue par un mécanisme

indépendant de la RdDM impliquant VARIANT IN METHYLATION (VIM) (Law & Jacobsen, 2010), CMT3 (Stroud *et al.*, 2013) et SUVH (KYP)(Du *et al.*, 2015). En revanche la méthylation établie au niveau des bordures des éléments transposables ou dans les éléments transposables plus courts et moins riches en H3K9me2 est maintenue par CMT3 et le mécanisme PolIV-RdDM précédemment décrit. La découverte et la compréhension du mécanisme de la RdDM sont relativement récentes et restent encore un sujet de recherche en cours d'investigation.

Les hc-siARN (24 nt) sont des acteurs centraux de la RdDM. Des hc-siARN sont retrouvés dans de multiples espèces et la machinerie enzymatique de biosynthèse et fonction associée aux hc-siARN est conservée dans le règne végétal (Nobuta *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010). Toutefois les hc-siARN sont absents de certains groupes comme les conifères (Morin *et al.*, 2008; Dolgosheina *et al.*, 2008) Les loci générant ces hc-siARN ne sont pas conservés. Par exemple, il n'y a aucun locus commun entre les 100 loci les plus abondants produisant des hc-siARN au sein des feuilles et inflorescences d'*A. lyrata* et d'*A. thaliana* (Ma *et al.*, 2010).

4.4. Rôle des petits ARN non codant dans le développement de la plante

Les petits ARN sont des régulateurs majeurs de l'expression génique contribuant à ou responsables de l'initiation, la différenciation et la croissance de certains organes comme les racines et les feuilles (Palatnik *et al.*, 2003; Marin *et al.*, 2010). Les mutants « perte de fonction » dans des gènes codant des protéines clés de la voie des miARN et tasiARN, tels que *ago1* ou *dcl1*, présentent des phénotypes développementaux drastiques avec une perte de la fertilité (Errampalli *et al.*, 1991; Castle *et al.*, 1993; Bohmert *et al.*, 1998; Morel *et al.*, 2002). Dans ces cas-là, l'étude de l'implication de ces gènes dans les différents processus biologiques nécessite ainsi l'utilisation de mutants hypomorphes et non perte de fonction.

Les miARN sont impliqués dans la prolifération et dans la différenciation cellulaire chez les plantes, deux processus majeurs intervenant dans la formation d'un nouvel organe (Rubio-Somoza & Weigel, 2011). Je détaillerai particulièrement l'implication des miARN et des tasiARN dans les étapes clés du développement de la plante : la formation du méristème racinaire et des racines et des parties aériennes incluant les organes reproducteurs et les feuilles.

4.4.1 Développement de la feuille : méristème foliaire et architecture de la feuille

Le développement de la feuille se déroule à partir d'un tissu méristématique appelé méristème apical caulinaire ou SAM pour « shoot apical meristem ». Il est composé d'un groupe de cellules souches totipotentes qui se différencient en divers types cellulaires nécessaires pour l'organogénèse. Une fois le méristème apical caulinaire mis en place, le développement foliaire est décomposé en 3 phases : l'initiation du primordium foliaire à partir des couches périphériques du méristème apical caulinaire (Byrne, 2005), la morphogénèse primaire avec l'établissement de la polarité et la phase finale de formation de la feuille. Chez *Arabidopsis*, différents miARN sont impliqués dans chacune de ces étapes.

Le méristème apical caulinaire est organisé en plusieurs couches de cellules : la couche externe L1 (protoderme), la couche sous épidermique L2 et la couche la plus interne L3 qui contient le centre d'organisation (Satina *et al.*, 1940). Six miARN (miR167, miR390, miR164, miR165/miR166 and miR394) régulent au niveau post-transcriptionnel les gènes clefs du développement du méristème apical caulinaire et agissent comme des signaux mobiles pour la maintenance des cellules méristématiques (Zhang & Zhang, 2012; Knauer *et al.*, 2013; Baumann, 2013; Zhou *et al.*, 2015). Par exemple, miR394 est exprimé dans le protoderme (L1) et confère au méristème sa totipotence en réprimant l'expression du gène *LEAF CURLING RESPONSIVENESS (LCR)* dans les trois couches cellulaires du méristème caulinaire L1, L2 et L3 (Knauer *et al.*, 2013) (Fig. 29). La répression de *LCR* est cruciale dans la maintenance du méristème apical caulinaire car elle permet au facteur de transcription *WUSCHEL* d'induire l'expression du gène codant pour le peptide *CLAVATA3* qui lui-même restreint l'expression de *WUSCHEL* au niveau du méristème apical caulinaire. Cette boucle de régulation définit l'identité du méristème ainsi que la délimitation de son expansion en contribuant à maintenir l'état indifférencié des cellules méristématiques (Schoof *et al.*, 2000).

Le développement de la feuille démarre avec l'initiation d'un primordium foliaire sur les bordures opposées du méristème apical caulinaire et requiert un contrôle de la division cellulaire ainsi qu'un contrôle de l'expansion cellulaire. La formation du primordium nécessite au départ, une séparation des cellules à la périphérie du méristème apical caulinaire qui vont se différencier (Byrne, 2005; Takeda *et al.*, 2011). Ainsi l'expression des gènes *CUP-SHAPED COTYLEDON1 (CUC1)* et *CUC2* qui participent à la délimitation des bordures du méristème apical caulinaire est régulée par miR164 (Laufs *et al.*, 2004). La mise en place de la polarité de la feuille est déterminée rapidement après l'initiation du primordium foliaire. La face abaxiale et adaxiale de la feuille sont déterminées par miR165/miR166 qui régulent la famille de gènes "*class III HOMEODOMAIN LEUCINE ZIPPER*" (HD-ZIP III) et miR390/TAS3 qui régulent les facteurs de transcription répondant à l'auxine *ARF3/ARF4* (Fig.

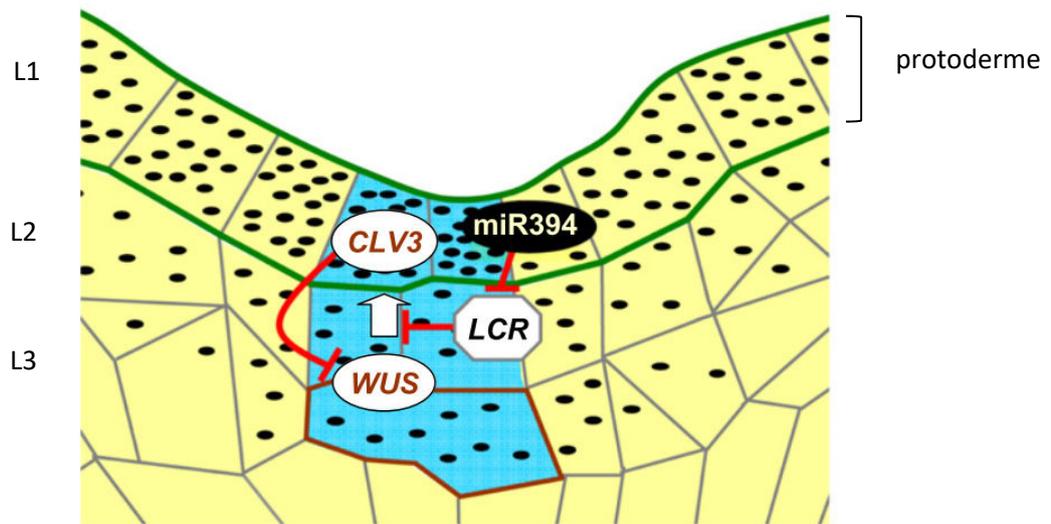


Figure 29 : Rôle de miR394 dans la régulation du développement du méristème apical caulinaire. miR394 est fortement exprimé dans le protoderme (L1) et réprime *LCR* dans les cellules voisines permettant au facteur de transcription *WUSCHEL* (*WUS*) de réguler l'identité méristématique en induisant l'expression du gène *CLAVAT3* (*CLV3*). (D'après Knauer et al. 2013)

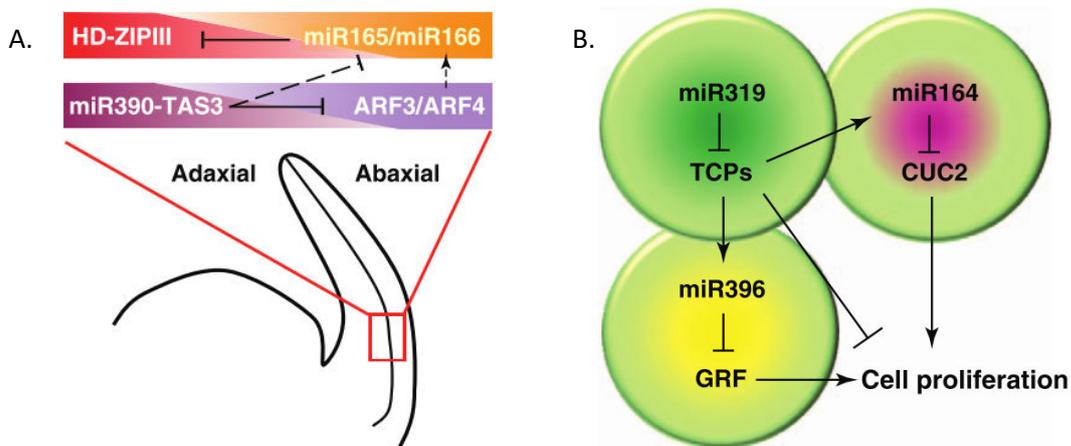


Figure 30 : Le rôle des microARN dans la polarité et la prolifération cellulaire de la feuille.

A. La polarité de la feuille est déterminée par la régulation des gènes *HD-ZIP III* par miR165/miR166 et *ARF3/ARF4* par miR390/tas3-siARN.

B. Les microARN miR164, miR319 et miR396 qui régulent respectivement les gènes codant pour des facteurs de transcription *CUC*, *TCP* et *GRF* interagissent entre eux pour réguler la prolifération cellulaire lors de la croissance des feuilles.

(D'après Rubio-Somoza & Weigel, 2011)

30A). L'expression de miR165/miR166 dans la partie abaxiale réprime l'expression des gènes HD-ZIPIII comme *PHAVOLUTA (PHV)*, *PHABULOSA (PHB)* et *REVOLUTA (REV)* confinant leur expression dans la face adaxiale alors que les tasiARN issus du clivage des transcrits du gène *TAS3* par miR390 dans la partie adaxiale confinent l'expression de *ARF3/ARF4* dans la face abaxiale. L'interaction de ces deux modules miARN-ARNm cibles définit la polarité de la feuille (Rubio-Somoza & Weigel, 2011). Enfin la taille et la forme du limbe sont également deux paramètres impliquant les miARN. La prolifération cellulaire détermine la complexité de la feuille avec des limbes dentelés, lobés ou multilobés. Trois miARN sont impliqués dans la forme et la taille du limbe : miR164 et ses cibles *CUC1* et *CUC2*, miR319 et ses cibles *TEOSINTE BRANCHED1*, *CYCLOIDEA*, *PCF 4 (TCP4)* et miR396 et ses cibles *GROWTH REGULATING FACTOR (GRF)* (Fig. 30B). Un exemple est le rôle de miR396 et des GRF dans la régulation de la croissance de la feuille. La surexpression chez *A. thaliana* de *MIR396a* et *MIR396b* réprime au niveau post transcriptionnel six gènes *GRF* induisant la diminution de la taille des feuilles probablement en atténuant la division et la prolifération cellulaire durant la croissance de la feuille (Rodriguez *et al.*, 2010). Ce mécanisme est conservé puisque chez *Medicago truncatula* miR396 régule six *MtGRF* (Bazin *et al.*, 2013) et chez le riz, la surexpression de *miR396* induit également des feuilles plus petites (Debernardi *et al.*, 2012).

4.4.2 Développement de la fleur ou la transition florale

Le passage de l'état végétatif à la phase de reproduction implique de nombreux miARN comme miR156, miR172, miR169, miR159, miR319, miR390, miR399, miR169, miR171, miR5200 ou miR824 (Teotia & Tang, 2015). MiR156 et miR172 ont été particulièrement étudiés car ils régulent la transition entre la phase dite « juvénile » et la phase « adulte » de la plante. *MiR156* et *miR172* ont des profils d'expression et des activités antagonistes : lors de transition florale l'expression de *miR156* diminue alors que celle de *miR172* augmente (Aukerman & Sakai, 2003; Wu & Poethig, 2006; Jung *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009) (Fig. 31). La surexpression de *miR156* chez le maïs, le tabac et *A. thaliana* retarde la floraison (Wu & Poethig, 2006; Chuck *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2015) alors que la surexpression de *miR172* accélère la floraison chez *Arabidopsis* (Aukerman & Sakai, 2003; Jung *et al.*, 2007). MiR156 et miR172 sont les orchestrateurs principaux de la voie de régulation de la floraison impliquant l'âge de la plante via la régulation de deux familles de facteurs de transcription : *APETALA2 (AP2)* et *SQUAMOSA PROMOTER BINDING LIKEs (SPLs)*. miR156 maintient la phase juvénile en réprimant l'expression des gènes *SPL* qui activent la floraison alors que miR172 active la transition florale en réprimant *AP2*, qui code pour un répresseur de la floraison (Teotia & Tang, 2015).

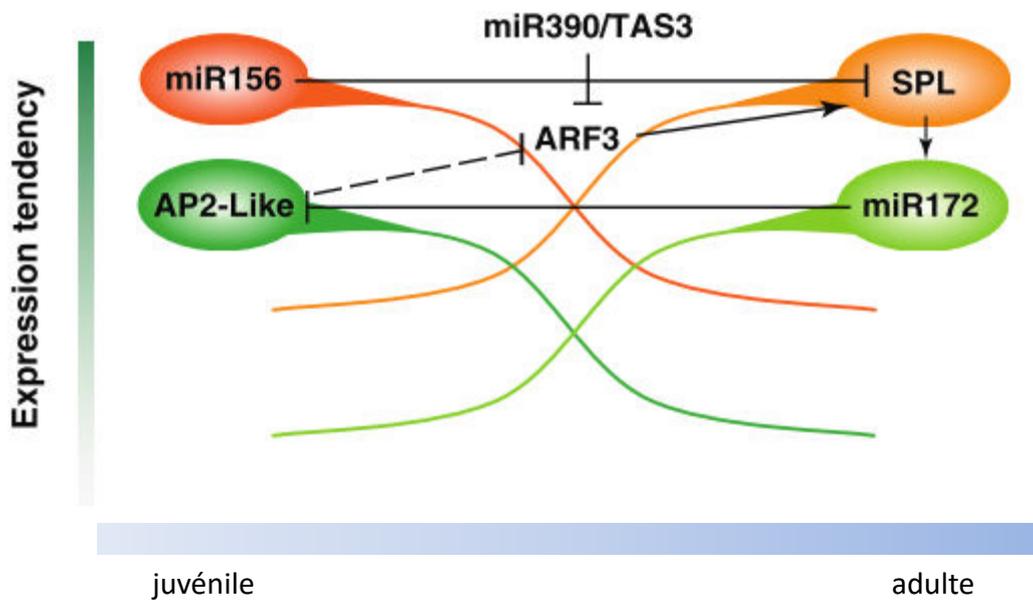


Figure 31 : Interactions de miR156, miR172 et miR390 avec leurs cibles dans la transition florale.

La phase de transition entre le stade juvénile et le stade adulte avec la formation de la fleur est déterminée par miR156 et miR172 qui ciblent respectivement les transcrits des gènes *SPL* et *AP2*. Ces deux microARN et leurs cibles ont des profils d'expression anti-corrélés. Le passage de l'état juvénile à la transition florale s'accompagne de la diminution de l'expression de miR156 et *AP2* et de l'augmentation de l'expression de miR172 et *SPL*. Un troisième microARN; miR390 est également impliqué dans la transition florale. En ciblant le transcript du gène *TAS3*, miR390 induit la production de ta-siARN qui induisent à leur tour la repression post-transcriptionnelle du gène *ARF3*. *ARF3* active l'expression de *SPL* et favorise la transition florale. MiR390 est donc un inhibiteur de la transition florale.

(D'après Rubio-Somoza & Weigel, 2011)

La régulation d'*ARF3* et *ARF4* par miR390 joue également un rôle dans la transition florale. La surexpression des cibles des siARN dérivés de *TAS3*, *ARF3* et *ARF4* induit la transition de la phase juvénile à la phase adulte alors que la surexpression de miR390 retarde la floraison en prolongeant la phase juvénile (Fahlgren *et al.*, 2006; Rubio-Somoza & Weigel, 2011) (Fig. 31). De plus, les plantes exprimant des transcrits *TAS3* insensibles au clivage par miR390 présentent un phénotype d'induction florale précoce. miR390 régule donc la transition florale réprimant indirectement *ARF3* et *ARF4* via l'induction de la production de tasiARN provenant du transcrit du gène *TAS3* (Montgomery *et al.*, 2008; Garcia, 2008; Rubio-Somoza & Weigel, 2013; Endo *et al.*, 2013).

Bien que les miARN et des tasiARN sont les principales familles identifiées comme impliquées dans ces processus de développement, les hc-siARN jouent également un rôle régulateur. Chez *A. thaliana* un élément transposable est inséré dans l'intron du gène *FLOWERING LOCUS C (FLC)* et induit la méthylation de l'ADN dirigée par les hc-siARN sur la région codante de *FLC*, réduisant son expression et retardant la floraison (Liu *et al.*, 2004). Il est important de noter que ce gène *FLC* est également régulé par la méthylation de la lysine 9 sur l'histone H3. Le facteur de transcription FWA également impliqué dans la floraison est exprimé dans l'albumen. Dans les autres tissus, le promoteur de FWA est réprimé par la méthylation de l'ADN (Soppe *et al.*, 2000). La perte de la méthylation du promoteur entraîne l'expression de FWA et un retard de la floraison. Ce sont deux répétitions en tandem présentes dans cette région promotrice qui engendrent la génération d'hc-siARN (Chan *et al.*, 2006).

4.4.3 Développement racinaire

Le développement du système racinaire s'effectue à partir du méristème apical racinaire appelé RAM pour « root apical meristem ». Le RAM est composé d'un groupe de cellules méristématiques appelé centre quiescent et est entouré de cellules souches appelées cellules initiales qui se divisent pour donner des types cellulaires différents (Couzigou & Combier, 2016). La coiffe protège le RAM et trois régions principales se distinguent dans la zone de transition: la zone d'initiation, d'élongation et de différenciation. Chez *A. thaliana* plus de 60 miARN matures sont exprimés dans les racines (Breakfield *et al.*, 2012) et la fonction de plusieurs miARN a été établie que ce soit dans le développement du méristème apical racinaire comme miR156, miR160 (Wang *et al.*, 2005c), miR396 (Rodriguez *et al.*, 2010; Bazin *et al.*, 2013), miR165/166 (Carlsbecker *et al.*, 2010) ou dans le développement des racines latérales et adventives comme miR160 (Mallory *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005c), miR390 (Marin *et al.*, 2010), miR164 (Li *et al.*, 2012a), miR393 (Parry *et al.*,

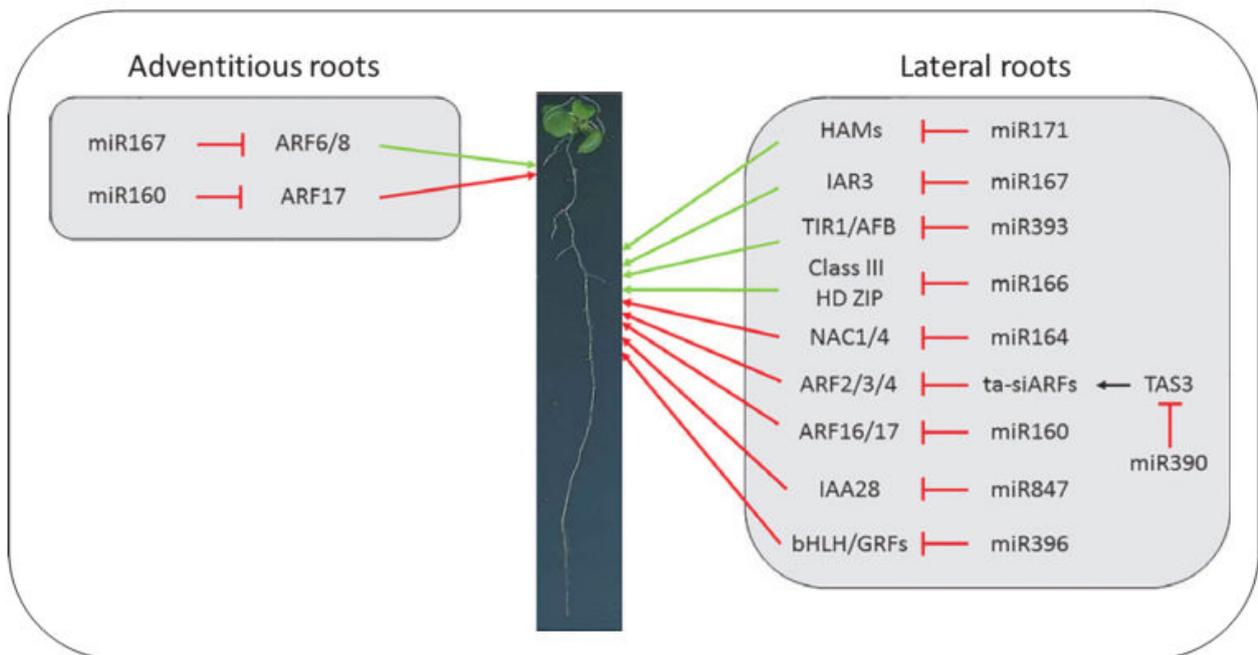


Figure 32 : Rôle des microARNs dans le contrôle de l'architecture racinaire chez *A. thaliana*.

Les flèches rouges et vertes matérialisent respectivement les impacts négatifs et positifs sur l'initiation et le développement des racines.

AFB, AUXIN SIGNALING F- BOX PROTEIN; *ARF*, AUXIN RESPONSE FACTOR; *bHLH*, basic helix-loop-helix; *GRF*, GROWTH-REGULATING FACTOR; *HAMs*, HAIRY MERISTEMS; *HD ZIP*, homeodomain leucine zipper; *IAR*, IAA-Ala RESISTANT; *NAC*, NAM, ATAF, CUC (NO APICAL MERISTEM, ARABIDOPSIS TRANSCRIPTION ACTIVATION FACTOR, CUP-SHAPED COTYLEDON); *TIR*, TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE.

(D'après Couzigou & Colombier 2016)

transcription. MiR165/166 contrôlent l'identité racinaire du méristème en restreignant au niveau apical l'expression de gènes codant pour les facteurs de transcription *PHV* et *PHB* permettant ainsi le développement correct du méristème racinaire (Grigg *et al.*, 2009; Miyashima *et al.*, 2013) (Smith & Long, 2010). Par ailleurs, la répression de *PHB* par miR165/166 contrôle également la différenciation du xylème racinaire (Carlsbecker *et al.*, 2010).

L'auxine est un modulateur majeur du développement racinaire (Gutierrez *et al.*, 2012; Orman-Ligeza *et al.*, 2013; Bellini *et al.*, 2014). L'auxine active ses cascades de transduction principalement via les facteurs de transcription "AUXINE RESPONSE FACTORS" (ARF) (Gray *et al.*, 2001; Zhao, 2010). Les miARN miR390, miR393, miR160, miR164, et miR847 interviennent dans la régulation du développement des racines latérales au travers de la régulation des ARF qui modulent l'expression des gènes liés à l'auxine (Fig. 32). Ainsi, la surexpression de miR160c induit une diminution du nombre de racines latérales et un défaut du gravitropisme, un phénotype retrouvé chez le double mutant des cibles de miR160 ; *arf10-2 arf16-2*. Ce phénotype est également retrouvé chez les mutants surexprimeurs de miR160 chez *Medicago truncatula* et le riz (Meng *et al.*, 2010; Bustos-Sanmamed *et al.*, 2013). MiR160 réprime également *ARF17* qui inhibe le développement des racines latérales. L'équilibre entre l'activité antagoniste de miR160 et miR167 régule le développement des racines latérales: miR160 réprimant *ARF17* et miR167 réprimant les activateurs des racines latérales *ARF6* et *ARF8* (Sorin *et al.*, 2005; Gutierrez *et al.*, 2009). Enfin miR169 qui a pour cible le transcrite de la sous unité A du facteur de transcription NF-Y a été identifié comme impliqué dans l'architecture racinaire (Sorin *et al.*, 2014). La répression du gène *NF-YA2* et *NF-YA10* par miR169defg est impliquée dans le contrôle de la croissance des racines latérales. L'expression spécifique d'une construction « mimicry » *MIM169defg* (exprimant une séquence cible chimérique de miR169defg bloquant l'activité de ces miARN) altère la dimension du méristème racinaire et l'initiation de racines latérales. Le développement racinaire est également régulé par des tasiARN (Fig. 32). Ainsi, la surexpression de *TAS3* chez *A. thaliana* induit l'élongation des racines latérales (Marin *et al.*, 2010). MiR390 est spécifiquement exprimé au niveau de l'initiation des racines latérales où il induit la biogénèse des tasiARN. Ces tasiARN inhibent *ARF2*, *ARF3*, et *ARF4*, levant ainsi la répression de la croissance des racines latérales (Marin *et al.*, 2010).

4.5. Les petits ARN non codant dans les interactions plantes-microorganismes

Les interactions entre les plantes et les microorganismes requièrent l'activation et la répression d'un vaste panel de gènes dans les cellules végétales. Les petits ARN de la plante jouent un rôle crucial dans la régulation de l'expression de ces gènes. Dans un premier temps, au travers de l'étude des différents facteurs de la voie de biosynthèse et de fonction des petits ARN, j'aborderai l'implication des mécanismes de PTGS et TGS dans la réponse de la plante à ces différents microorganismes. Puis dans un deuxième temps je présenterai les fonctions connues des miARN et des siARN dans les différentes interactions plantes-microorganismes en me focalisant sur ceux pour lesquels des évidences fonctionnelles ont été établies.

4.5.1. Interactions plantes-virus

Les virus à ARN (e.g. Tobacco rattle virus ou TRV) et à ADN (e.g. geminivirus) parasites de plantes ont été particulièrement étudiés notamment dans le cadre de l'étude du « gene silencing » chez les plantes. Les virus à ARN une fois dans la cellule végétale se multiplient grâce à une réplicase qui va répliquer l'ARN viral générant ainsi un ARN double brin. Afin d'éviter que ce double brin ne recrutent la machinerie du « gene silencing » de la plante, les virus à ARN produisent des supresseurs de silencing. Les virus à ADN produisent également ce type de supresseurs pour échapper à la RdDM de la plante qui méthyle l'ADN (Ruiz-Ferrer & Voinnet, 2009). Les facteurs de la voie des miARN et siARN sont impliqués dans la défense antivirale comme DCL1, DCL2, RDR1 et RDR6 ou AGO1 (Blevins *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Csorba *et al.*, 2007; Donaire *et al.*, 2008; Havelda *et al.*, 2008; Garcia-Ruiz *et al.*, 2010). Toutefois, nous ne détaillerons pas ici les études des mutants de la machinerie dans l'interaction plante-virus car elles reflètent le rôle de ces facteurs dans le traitement des ARN viraux plutôt que le rôle des petits ARN de la plante.

L'expression dans des plants de tabac ou d'*A. thaliana* de miARN artificiels dirigés contre des régions du génome viral déclenchent une réaction antivirale et présentent une résistance au *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) et *Turnip mosaic virus* (TuMV) (Niu *et al.*, 2006; Qu *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2009). Des approches bioinformatiques permettent de prédire les miARN qui ciblent les virus, pour autant les miARN semblent cibler sans préférences des virus de plantes autant que des virus d'animaux (Pérez-Quintero *et al.*, 2010). Par ailleurs, le TGS intervient également dans la réponse au virus. Ainsi *A. thaliana* a développé une résistance aux geminivirus en induisant la méthylation des cytosines et des histones du génome viral. Les mutants de cytosine méthyltransférases (*drm1 drm2, cmt3, and met1*), d'histone H3K9 méthyltransférases (*kyp2*), des

gènes impliqués dans la voie de méthylation de l'ADN (*ago4*, *ddm1*, and *nprpd2A*), ou des enzymes du cycle de méthylation (*adk1* and *adk2*) sont hyper sensibles aux virus (Raja *et al.*, 2008)

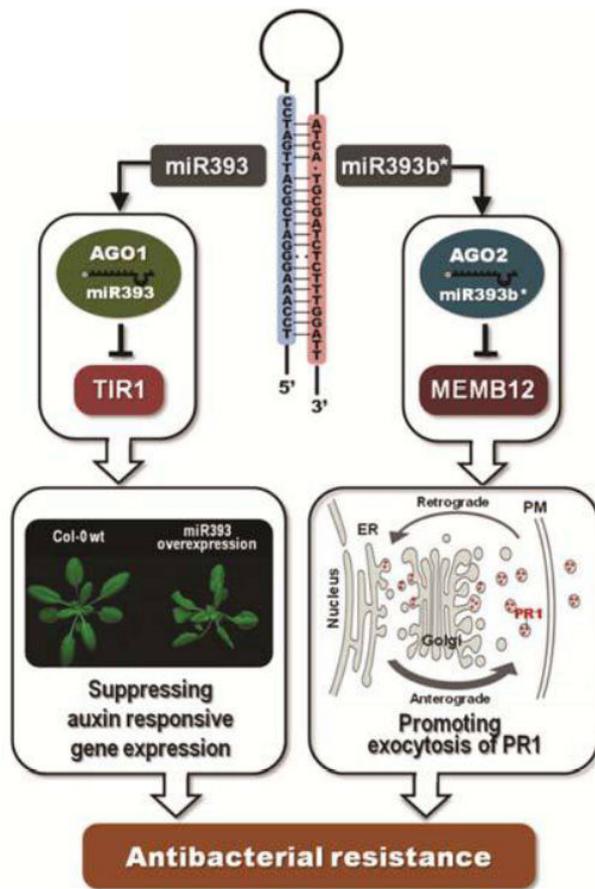
4.5.2. Interactions plantes-Champignons/oomycètes pathogènes

Les miARN et les siARN liés au PTGS sont impliqués dans la réponse aux champignons et oomycètes pathogènes. Ainsi, les mutants d'*A. thaliana* de la voie PTGS mutés pour les gènes *DCL4*, *AGO7*, *RDR2* et *RDR6* présentent une sensibilité accrue à *Verticillium dahliae* avec un retard de croissance et davantage de nécroses suggérant que les siARN associés aux régulation de type PTGS sont nécessaires pour les défenses antifongiques (Ellendorff *et al.*, 2009). Par ailleurs, les mutants *dcl1-9* et *dcl1-7* présentent une sensibilité accrue à *Botrytis cinerea* montrant ainsi le rôle des miARN dans la modulation des défenses antifongiques (Weiberg *et al.*, 2013). En revanche, les mutants *ago1* présentent une résistance accrue à *B. cinerea* et *V. dahliae* (Ellendorff *et al.*, 2009; Weiberg *et al.*, 2013). Cependant le rôle d'AGO1 dans l'interaction plante-champignon est complexe. La co-immunoprécipitation d'AGO1 révèle la présence de petits ARN appartenant à *B. cinerea* associés à la protéine. La protéine AGO1 de la plante est donc détournée par des siARN sécrétés par le champignon dans la cellule végétale comme le montre l'exemple de *B. cinerea* (Weiberg *et al.*, 2013).

Les régulations de type TGS interviennent également dans la régulation des gènes impliqués dans la réponse de la plante aux plantes-champignons/oomycètes. Les mutants d'*Arabidopsis* ayant une RdDM altérée, comme les mutants *ago4* et *nrpr1* présentent une sensibilité accrue à *Fusarium oxysporum* (Le *et al.*, 2014). Une deuxième étude montrent également que des mutants de la voie RdDM (*ago4*, *drd1*, *rdr2*, *drm1*, *drm2* et *nprpd2*) présentent une sensibilité accrue aux champignons nécrotrophes *B. cinerea* et *Plescospherella cucumerina* (López *et al.*, 2011). L'ensemble de ces études montrent l'implication des voies des petits ARN dans la réponse de la plante aux champignons aussi bien biotrophes que nécrotrophes.

La fonction des miARN et des siARN dans les interactions plantes-champignons a été principalement analysée chez *A. thaliana*. Par exemple la surexpression de *MIR844* ou de *MIR400* provoque une sensibilité accrue d'*A. thaliana* à *B. cinerea* alors que leur inhibition provoque une augmentation de la résistance (Park *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015). La cible de miR844 prédite *in silico* est le transcrite du gène *CYTIDINEPHOSPHATE DIACYLGLYCEROL SYNTHASE3* (*CDS3*). Des analyses de profils d'expression ont permis de montrer que la surexpression de *MIR844* est corrélée à une diminution de l'expression de *CSD3*. Il a également été montré que le rôle de miR844 dans la réponse antifongique s'effectue par la répression de *CSD3* (Lee *et al.*, 2015). De plus, miR400 confère une résistance à *B. cinerea* en induisant le clivage des transcrits de deux gènes codant pour la protéine PENTATRICOPEPTIDE

A.



B.

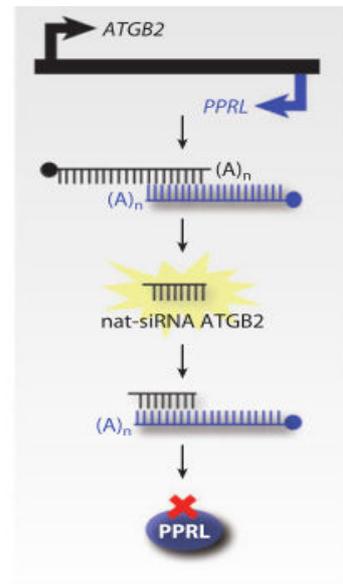


Figure 33 : Rôle de miR393 et du nat-siRNAATGB2 dans la réponse antibactérienne à *Pseudomonas syringae pv. Tomato*.

A. Rôle de miR393. La production de miR393 and miR393b* est induite par *Pseudomonas syringae pv. Tomato* et ils sont respectivement pris en charge par AGO1 et AGO2. miR393 via la répression de *TIR1*, un transporteur d'auxine, supprime l'expression des gènes de réponse à l'auxine. miR393b* via la répression de *MEMB12* (impliqué dans le transport vésiculaire golgien) induit l'exocytose de protéines anti-microbiennes comme la protéine PR1.

B. Rôle de nat-siRNAATGB2. Nat-siRNAATGB2 est produit à partir d'un précurseur double brin formé à partir de la transcrits issus de deux gènes chevauchant *ATGB2* et *PPRL*. Les nat-siARN ATGB2 induisent le clivage des transcrits du gène *PPRL* un potentiel régulateur négatif de la défense antibactérienne.

(D'après Ruiz-Ferre et Voinnet, 2009)

REPEAT 1 (PPR1) et PPR2 (Park *et al.*, 2014). Par ailleurs, des siARN semblent également impliqués dans la réponse de la plante à l'oomycète *Hyaloperonospora parasitica*. Le locus *RECOGNITION OF PERONOSPORA PARASITICA 5 (RPP5)* chez l'écotype Landsberg d'*A. thaliana* est composé de sept gènes de résistance de type NBS-LRR incluant le gène de résistance à *H. parasitica*, *SNC1*. La découverte de transcrits anti-sens et chevauchant ainsi que de siARN de 21 nt correspondant aux gènes de ce locus suggère une régulation de type PTGS par des siARN de ces gènes de résistance (Yi & Richards, 2007).

4.5.3. Interactions plantes-bactéries pathogènes :

Les mécanismes de PTGS et de TGS sont impliqués dans les défenses antibactériennes de la plante et ont été particulièrement étudiés chez les bactéries du genre *Pseudomonas*. L'interaction *A. thaliana* - *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) est ainsi l'interaction la mieux caractérisée, à l'heure actuelle, du point de vue des fonctions des miARN et siARN dans les interactions plantes-microorganismes.

4.5.3.1 *Pseudomonas* et PTGS

Chez *A. thaliana*, *AGO2* est fortement induit lors de l'infection par les souches de *Pst* (Zhang *et al.*, 2011) et les mutant des gènes *DCL1*, *RDR6*, *AGO2*, présentent une sensibilité accrue à *Pst* (Navarro *et al.*, 2008, Katiyar-Agarwal *et al.* 2006, Zhang *et al.*, 2011; Agorio & Vera, 2007). Par ailleurs, le mutant *ago1* présente une réponse de type PTI atténuée avec une diminution de la quantité de callose produite et une diminution significative de l'expression des gènes de réponses aux PAMP, *FRK1* and *WRKY29* (Li *et al.*, 2010b). De même, chez le mutant *ago7*, l'ETI déclenchée par la souche *Pst* (*avrRpt2*) est atténuée alors qu'aucune modification de la PTI n'est observée (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010b; Zhang *et al.*, 2011).

Chez *A. thaliana*, miR393 est le premier miARN qui a été découvert comme jouant un rôle dans la défense contre les pathogènes (Fig. 33A). L'expression de *MIR393* est induite par un PAMP, un peptide dérivé de la flagelline, Flg22 ainsi que par une souche de *Pst* incapable d'injecter des effecteurs bactériens dans les cellules végétales (Navarro *et al.*, 2006). Alors que la surexpression de *MIR393* chez *A. thaliana* restreint le développement de la bactérie, la surexpression d'une des cibles « *AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN* » (*AFB1*) partiellement résistante au clivage par miR393 augmente la sensibilité de la plante à l'infection bactérienne (Navarro *et al.*, 2006; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). MiR393 active les défenses basales en inhibant la voie de signalisation de l'auxine en ciblant les transcrits des récepteurs auxiniques TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1), AFB2 et

AFB3 (Navarro *et al.*, 2006). En effet l'auxine, qui est une hormone classiquement liée au développement, réprime la voie de l'acide salicylique qui est impliquée dans la mise en place des défenses (Wang *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007; Spoel & Dong, 2008). Le cas de miR393 est particulièrement intéressant et original car le brin complémentaire de miR393, nommé miR393*, n'est pas dégradé comme généralement pour les miARN. MiR393* cible les transcrits du gène *MEMBRIN 12 (MEMB12)*, un répresseur du gène de défense *PATHOGENESIS RELATED 1 (PR1)*. La surexpression de miR393* induit indirectement une augmentation de l'expression de *PR1* et ainsi une augmentation de la résistance à *Pst* (Zhang *et al.*, 2011). A l'inverse de miR393, Flg22 et les souches avirulentes de *Pst* répriment l'expression de *miR398* résultant en une dé-répression de la cible *CSD1* de miR398 ayant pour résultat une répression des défenses basales (Jagadeeswaran *et al.*, 2009).

Le nat-siRNAATGB2 de 22 nt est le premier cis-nat-siARN de plante découvert comme impliqué dans les défenses antibactériennes (Fig. 33B) Ce nat-siARN est généré à partir d'un précurseur constitué des transcrits chevauchant de deux gènes antisens, l'un codant pour une protéine RAB2-LIKE GTP-BINDING (ATGB2) et l'autre pour une protéine PENTATRICOPEPTIDE-LIKE (PPRL). Nat-siRNAATGB2 cible le gène de résistance "R" *PPRL* (réponse de type ETI) (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006). La production de nat-siRNAATGB2 est spécifiquement induite par *Pst* (avrRpt2) et induit le clivage du transcrit du gène *PPRL*. La surexpression d'un gène *PPRL* possédant une mutation rendant son transcrit résistant au clivage par nat-siRNAATGB2 induit un retard de la réponse hypersensible et une résistance atténuée.

4.5.3.2 Pseudomonas et TGS

La régulation de l'expression des gènes impliqués dans les défenses anti bactériennes repose également sur des régulations de type TGS. Ainsi les mutants présentant une RdDM altérée comme *ddc*, *drm1/drm2*, *nrp2*, *met1/nrp2*, *rdr2*, *drd1*, *nrd1a*, and *dcl2/3/4* présentent une résistance accrue à *Pst* (Downen *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2013). Cette altération de la RdDM semble limiter la propagation de la bactérie à travers le xylème. A l'inverse, le mutant du gène *ROS1* codant pour une déméthylase présente une propagation accrue de la bactérie (Yu *et al.*, 2013). Par ailleurs, *AGO4* et *AGO6* sont réprimés en réponse à l'infection bactérienne, suggérant le rôle négatif d'*AGO4* et *AGO6* dans l'immunité contre les bactéries (Yu *et al.*, 2013). Enfin, il a été établi que chez *A. thaliana* le gène de défense antibactérienne *RGM1*, contenant deux séquences répétées dérivant d'hélicons (éléments transposables) dans sa région promotrice, est réprimé par un mécanisme de RdDM. La méthylation de l'ADN résultant de ce mécanisme intervient au niveau de l'extrémité proximale de ces séquences répétées induisant une répression transcriptionnelle du gène *RGM1*. L'expression de *RGM1*

normalement réprimée par la RdDM en l'absence de pathogène est induite par flg22 grâce à la déméthylation de la région promotrice due à l'action de la DNA déméthylase *ROS1* (Yu *et al.* 2013).

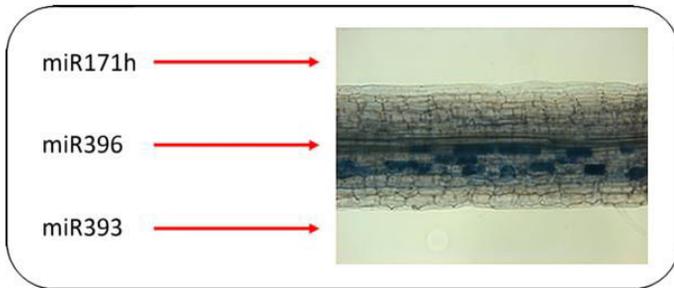
4.5.3.3 *Agrobacterium tumefaciens*

Plusieurs études ont montré l'implication des régulations de type PTGS et du TGS dans l'interaction entre *Arabidopsis* et la bactérie gallifère *Agrobacterium tumefaciens*. D'une part, l'accumulation de miR393 et miR167 est réduite dans les galls induites par la souche gallifère d'*A. tumefaciens* (Dunoyer *et al.*, 2006). Néanmoins l'infiltration d'une souche d'*A. tumefaciens* possédant les gènes liés au pouvoir pathogène de la bactérie dite « armée » dans les feuilles de tabac a montré qu'à des temps précoces (68 hai) *MIR393* est induit, ce qui n'est pas le cas avec la version désarmée de la bactérie (Pruss *et al.*, 2008). Par ailleurs, une forte augmentation de la croissance de la galle induite par *A. tumefaciens* a été montrée chez le triple mutant *drm1-drm2-cmt3 (ddc)* et le mutant *ago4* indiquant que la RdDM inhibe la croissance de ces tumeurs (Gohlke *et al.*, 2013). Cependant la restriction de la tumeur n'est probablement pas due à un mécanisme de TGS des gènes car un faible taux de méthylation a été détecté sur ces séquences dans les tumeurs des plantes sauvages. L'hypothèse la plus probable serait donc une restriction de la croissance de la tumeur via un mécanisme de RdDM entraînant la méthylation de gènes régulant positivement de la croissance de la tumeur.

4.5.4. *Les miARN et siARN dans les interactions symbiotiques*

Les paragraphes précédents étaient principalement dédiés aux interactions plante-microorganismes chez *Arabidopsis* qui constitue la plante pour laquelle ces mécanismes sont le mieux décrits à ce jour. Toutefois, d'autres plantes présentent des spécificités intéressantes concernant le rôle des miARN et siARN dans les interactions plantes-microorganismes qui n'existent pas chez *A. thaliana*. Ainsi les interactions avec des microorganismes symbiotiques sont spécifiques de certaines familles de plantes comme la symbiose fixatrice d'azote chez les légumineuses ou l'interaction avec les champignons mycorhiziens. Je consacrerai donc le chapitre suivant à la description des régulations impliquant des miARN et siARN dans les mycorhizes et dans les symbioses bactériennes chez les légumineuses.

A.



B.

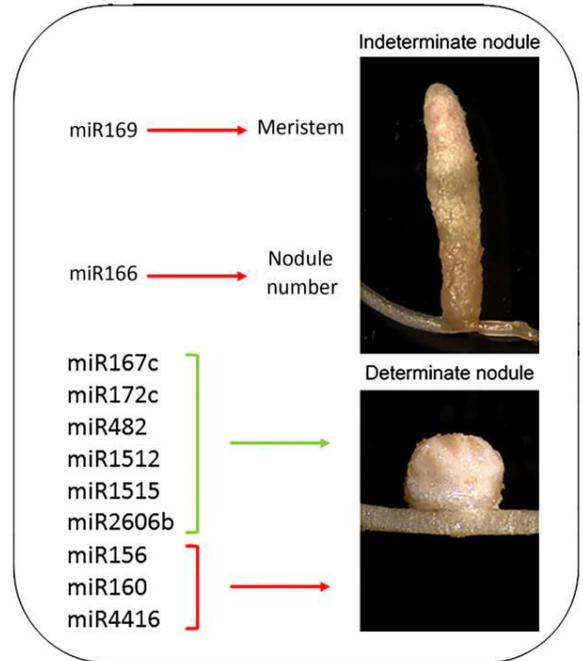


Figure 34: microARN impliqués dans la symbiose bactérienne (A) et dans la mycorhization (B).

Les flèches rouges et vertes matérialisent respectivement les impacts négatifs et positifs sur la mycorhization (A) ou sur (B) le développement des nodules déterminés (avec une activité méristématique cessant tôt) et indéterminés (activité méristématique maintenue).

(D'après Couzigou & Colombier 2016).

4.5.4.1 miARN et siARN dans les symbioses mycorhiziennes

Les interactions mycorhiziennes font partie des endosymbioses. La mycorhization consiste en la colonisation par les champignons des cellules racinaires corticales avec un échange de molécules au bénéfice des deux partenaires. Ces cellules racinaires corticales se spécialisent dans l'interaction et certains miARN ont été montrés comme jouant un rôle dans cette différenciation. Parmi ces miARN, miR396 cible les transcrits des gènes de la famille de facteurs de transcription GROWTH REGULATING FACTOR (GRF) et sa surexpression engendre une diminution du taux de colonisation alors que son inhibition provoque un effet opposé (Bazin *et al.*, 2013) (Fig.34A). Par ailleurs, la mycorhization chez *Medicago*, la tomate et le riz est stimulée par de faibles concentrations en auxine et s'accompagne d'une diminution de l'accumulation du précurseur pre-miR393 (Etemadi *et al.*, 2014). Le gène *NODULATION SIGNALING PATHWAY 2 (NSP2)* code pour un facteur de transcription régulé par une isoforme particulière de miR171 intervenant dans la nodulation (Oldroyd & Long, 2003) et qui est également requis pour la colonisation mycorhizienne chez *M. truncatula* (Maillet *et al.*, 2011; Devers *et al.*, 2011; Laressergues *et al.*, 2012) (Fig.34A). Les mutants de *M. truncatula* perte de fonction pour *NSP2* ou surexprimant *MIR171h* présentent un défaut de colonisation par le champignon suggérant que la régulation de *NPS2* par miR171h est cruciale pour la restriction de la croissance de *Rhizophagus irregularis* aussi bien quantitativement que spatialement (Laressergues *et al.*, 2012).

4.5.4.2 miARN et siARN dans les symbioses bactériennes

La fixation de l'azote chez les légumineuses est le résultat de l'association avec des bactéries symbiotiques et repose sur la néoformation d'une structure spécialisée fixatrice d'azote : le nodule. De nombreux miARN sont différentiellement exprimés lors de la nodulation, et on dispose d'évidences fonctionnelles pour plusieurs miARN comme: miR156, miR160, miR164, miR166, miR169, miR167, miR172, miR393, miR482, miR1512, miR1515, miR2606b et miR4416 (Li *et al.*, 2010a; Bustos-Sanmamed *et al.*, 2013; Turner *et al.*, 2013; Mao *et al.*, 2013; Wang & Chua, 2014; Wang *et al.*, 2015; Nova-Franco *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2015) (Fig.34B). Je détaillerai l'implication quelques miARN dans l'initiation, le développement et le fonctionnement du nodule pour exemples. Chez *Medicago truncatula*, miR166 cible les transcrits des gènes codant pour la famille de facteurs de transcription de classe III HD ZIP et la surexpression de *MIR166* a un impact négatif sur le nombre de nodules et la densité des racines latérales avec une organisation anormale des vaisseaux du xylème (Boualem *et al.*, 2008). De plus, chez *M. truncatula*, la surexpression de *MIR169* provoque un retard de la croissance du nodule et un arrêt du développement du méristème aboutissant à la formation

d'un nodule non fonctionnel pour la fixation d'azote (Combiere *et al.*, 2006a). MiR169 régule les transcrits du gène *HAP2-1* codant pour facteur de transcription impliqué dans la redifférenciation des cellules corticales en primordium nodulaire. L'expression d'un transcrit du gène *HAP2-1* ayant une mutation lui conférant une résistance au clivage par miR169 provoque le développement de nodules plus petits avec un défaut de croissance de la partie apicale suggérant que *HAP2-1* est impliqué dans l'organogénèse du nodule (Combiere *et al.*, 2006b). Au-delà de la légumineuse modèle *M. truncatula*, plusieurs miARN ont été décrits chez le soja (*Glycine max*) comme impliqués dans la régulation de la nodulation (Li *et al.*, 2010a; Turner *et al.*, 2013; Wang & Chua, 2014; Wang *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2015). Chez le soja, la surexpression de *MIR167c*, *MIR172c*, *MIR482*, *MIR1512*, *MIR1515* et *MIR2606* a un effet positif sur la formation du nodule alors que la surexpression de *MIR156*, *MIR160* et *MIR4416* a un effet opposé. Ainsi, miR482 cible un gène codant pour récepteur kinase de type NBS-LRR et présente un pic d'expression à 6 jai suggérant une implication dans les stades précoces du développement du nodule. La répression de *MIR482* entraîne en une diminution du nombre de nodules suggérant que la modulation des défenses via ce miARN pourrait être cruciale pour l'établissement de la symbiose.

L'ensemble des nombreux exemples que nous avons cité montre donc clairement le rôle clef des petits ARN dans les interactions entre les plantes et les microorganismes symbiotique et dans la mise en place de structures néoformées induites par ces microorganismes symbiotiques. Plusieurs études ont montré que la néoformation de structures racinaires induites par les bactéries symbiotiques partage des mécanismes moléculaires avec la formation des galles induites par les nématodes phytoparasites chez *Medicago truncatula* (Damiani *et al.*, 2012; Baldacci-Cresp *et al.*, 2012).

4.5.5. Les petits ARN dans les interactions plantes –nématodes phytoparasites

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, l'interaction entre les plantes et les nématodes phytoparasites implique la néoformation d'une structure nourricière dans la racine infectée ainsi qu'une répression des mécanismes de défense de la plante. Le développement du site nourricier induit par les nématodes à galles et à kystes s'accompagne d'une vaste reprogrammation transcriptionnelle. Afin d'étudier l'implication des petits ARN dans la régulation de l'expression génique de ces processus, des études ont été développées sur *A. thaliana*, la tomate (*Solanum lycopersicum*) et le soja (*Glycines max*) en interaction avec les nématodes à galles et à kystes.

4.5.5.1. Interactions plante - nématodes à kystes

L'analyse des petits ARN dans la réponse des plantes aux nématodes phytoparasites a été principalement étudiée dans le cadre des interactions plantes-nématodes à kystes. En 2008, la première étude réalisée sur le rôle des petits ARN dans l'interaction plante-nématodes à kystes a dans un premier temps évalué chez *A. thaliana* la sensibilité de mutants de la voie des petits ARN à l'infection par *H. schachtii* (Fig.35) (Hewezi *et al.*, 2008). Ces expériences ont permis de déterminer si les modifications de l'expression génique responsable de la formation du syncytia étaient contrôlées par des mécanismes de type PTGS ou TGS. Les mutants des gènes *RDR1*, *RDR2*, *RDR6* et *DCL2*, *DCL3*, *DCL4* codant pour des enzymes de biosynthèse des différentes voies des petits ARN ainsi que des doubles et triples mutants ont été inoculés avec des larves d' *H. schachtii*. Bien qu'une tendance globale à la résistance soit soulignée par les auteurs de cette étude, cette tendance n'est pas supportée par les analyses statistiques à l'exception des mutants *dcl2-1*, *dcl2-1/dcl3-1* et *dcl2-1/dcl3-1/dcl4-2* qui présentent une diminution significative de la sensibilité à *H. schachtii* dans deux réplicats sur trois. Par la suite le séquençage par la technologie 454 des petits ARN issus des syncytia d'*A. thaliana* induits par *H. schachtii* à 4 et 7 jai a permis d'identifier au total 30 miARN matures exprimés dans les syncytia appartenant à 19 familles (miR156, miR157, miR158, miR159, miR160, miR161, miR164, miR165, miR166, miR167, miR168, miR169, miR171, miR172, miR390, miR396, miR398, miR403 and miR775) à 4 et 7 jai. Les analyses statistiques basées sur les comptages de séquences correspondant à ces miARN entre racines infestées et racines saines ont identifiés 16 miARN appartenant à 13 familles comme différentiellement exprimés dans les kystes en réponse à l'infection par *H. schachtii* à 4 et 7 jai. Dans ce type d'études, le terme de « différentiellement exprimés » est utilisé pour indiquer une différence de quantité des miARN matures. Des analyses par PCR quantitative de l'expression des 15 cibles de 6 familles de miARN différentiellement exprimés (miR160, miR164, miR167, miR171, miR396, et miR398) dans des racines inoculées et non inoculées ont montré des profils anti-corrélés entre les miARN et leurs transcrits cibles. L'analyse des données de séquençage a également identifié 3 tasiARN, et 125 siARN putatifs dont la catégorie n'est pas spécifiée mais dont 2 à 3 % s'alignent sur des transposons à 4 et 7 jai. Parmi les 125 séquences de siARN putatifs, 15 séquences montrent une complémentarité parfaite avec des gènes codant pour des protéines et 18 séquences ont été identifiées comme identiques aux séquences sens ou antisens de transposons ou retro-transposons (Hewezi *et al.*, 2008).

A la suite de cette première étude, une analyse fonctionnelle a été réalisée sur un miARN réprimé dans les racines infestées par *H. schachtii* à 4 jai, miR396, afin de déterminer son rôle dans cette interaction (Fig. 36). L'étude du profil d'expression de six gènes codant pour des facteurs de

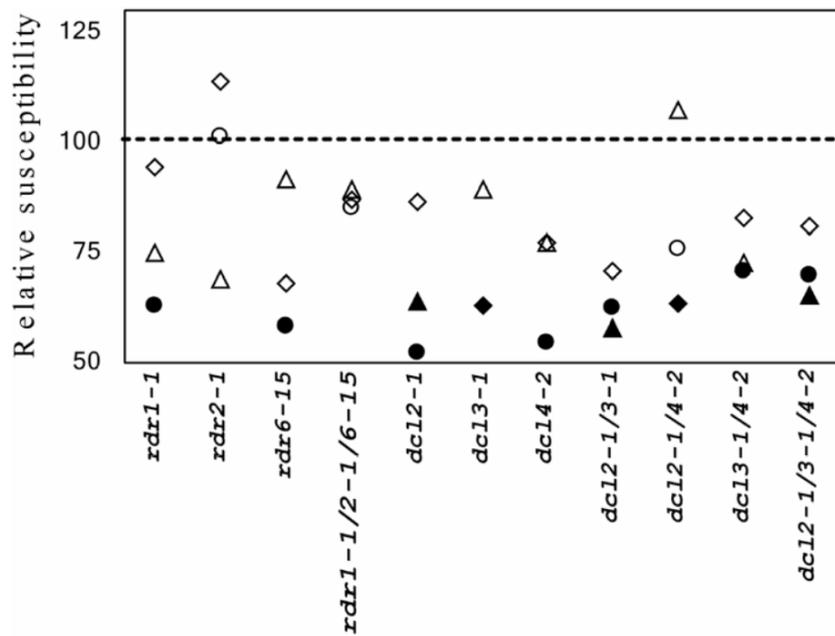


Figure 35 : Sensibilité des mutants d' *Arabidopsis thaliana* affectés dans les gènes DCL et RDR à l'infection par *Heterodera schachtii* en comparaison avec l'écotype sauvage Col-0.

La sensibilité relative a été déterminée par le comptage de J4 femelles à 15 jours après inoculation des mutants et des plantes sauvages. Trois réplicats indépendants sont représentés par les trois symboles différents. Les symboles « pleins » indiquent les lignées mutantes qui sont significativement différentes de l'individu sauvage selon le test statistique t-test ($P < 0.05$).

(D'après Hewezi et al. 2008)

transcription de type « GROWTH REGULATING FACTORS » (GRF), prédits comme étant ciblés par miR396 (Jones-Rhoades & Bartel, 2004), a montré la surexpression de *GRF1*, *GRF3* et *GRF8* à 1 et 3 jai dans les syncytia d'*A. thaliana* induits par *H. schachtii* (Hewezi *et al.*, 2012). Des analyses de promoteurs *pMIR396a* et *pMIR396b* fusionnés au gène rapporteur *GUS* ont confirmé l'absence d'activité de ces promoteurs au début de la formation du syncytium correspondant au stade J2-J3 du nématode et montré leur activation lors des étapes plus tardives de formation du syncytium (stade J3 mature et J4). A l'inverse, l'analyse de lignées possédant les promoteurs de *GRF1* et *GRF3* fusionnés au gène *GUS* ont confirmé l'activation du promoteur de *GRF1* et *GRF3* dans les étapes précoces de formation du syncytium (jusqu'à 3 jai) et une répression dans les étapes tardives (entre 8 et 14 jai). De plus, les mutants d'*A. thaliana* surexprimant *MIR396* ou possédant une cible *GRF* résistante au clivage par miR396 présentent des syncytia plus petits et une sensibilité réduite par rapport aux individus sauvages suggérant que la répression de *GRF1* et *GRF3* par miR396 est requise pour le bon développement du syncytium. Ces résultats suggèrent donc que l'homéostasie entre miR396 et ses cibles est cruciale pour le développement du syncytium. Ces résultats ont amené les auteurs à proposer le modèle suivant : à l'initiation du syncytium l'inactivation de *MIR396* entraîne une augmentation de l'expression de *GRF1* et *GRF3*. Ces facteurs de transcription pourront ainsi activer les gènes impliqués dans le processus de différenciation et de formation du syncytium. Une fois le syncytium établi, la répression de *MIR396* est levée entraînant la production de miR396 mature induisant la répression post-transcriptionnelle des cibles *GRF1* et *GRF3* constituant ainsi le signal de l'entrée dans la phase de maintenance du syncytium (Hewezi *et al.*, 2012).

Par la suite, cette même équipe a réalisé une analyse fonctionnelle d'un miARN chez *A. thaliana* qui n'avait pas été identifié par les analyses de séquençage : miR827 qui cible les transcrits du gène *NITROGEN LIMITATION ADAPTATION (NLA)* (Hewezi *et al.*, 2016). MiR827 est connu pour inhiber la réponse immunitaire chez le riz lors de l'infection par le champignon *Magnaporthe oryzae* (Li *et al.*, 2014). L'analyse de l'activité des promoteurs des gènes *MIR827* et *NLA* fusionnés au gène rapporteur *GUS* révèlent que i) le promoteur de *MIR827* est activé au cours des étapes de développement et de maintien du syncytium et que ii) cette expression de *MIR827* s'accompagne de la répression de *NLA* tout au long du développement du syncytium. De plus, les mutants d'*A. thaliana* surexprimant *miR827* présentent une sensibilité accrue à *H. schachtii*. En revanche, les mutants bloquant l'activité de miR827 par mimétisme de la cible (stratégie « target mimicry » ; mutants exprimant une séquence cible artificielle résistante au clivage mais pour laquelle le microARN a une affinité supérieure à la cible endogène) présentent une diminution de la sensibilité à *H. schachtii*. Bien que la surexpression de *NLA* n'affecte pas la sensibilité à *H. schachtii*, la surexpression d'une cible *NLA* mutée et résistante au clivage par *miR827* entraîne une réduction de la sensibilité. *MIR827* fonctionnerait donc comme

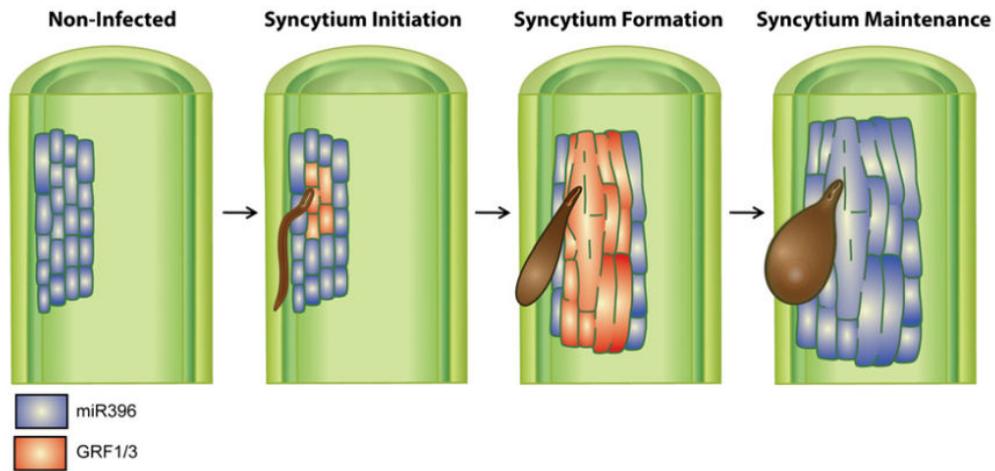


Figure 36 : Le module régulateur miR396-GRF1/3 contrôle la phase de transition entre l'initiation/ la formation du syncytium et son maintien.

En condition « non infectée », miR396 est fortement exprimé dans les tissus vasculaires. Suite à l'infection par *H. schachtii*, miR396 est fortement réprimé lors des phases d'initiation/formation du syncytium et cette répression est corrélée à l'augmentation de l'expression de *GRF1* et *GRF3* jusqu'à un seuil spécifique qui permet à ces facteurs de transcription de réguler les événements liés à la reprogrammation de l'expression génique qui pourraient être nécessaire à la redifferentiation des cellules racinaires matures en syncytium. Une fois que la formation du syncytium est terminée, l'expression de miR396 augmente fortement dans le syncytia et réprime post-transcriptionnellement l'expression de *GRF1* et *GRF3*. La répression de l'expression de *GRF1* et de *GRF3* met fin à la phase d'induction/formation du syncytium et conditionne le syncytium à entrer dans la phase de maintenance.

(D'après Hewezi et al. 2012)

un régulateur négatif de l'immunité de la plante en réponse à *H. schachtii* en supprimant l'activité de *NLA* dans le syncytium grâce à une régulation post-transcriptionnelle contribuant ainsi au succès du parasitisme.

Le rôle des petits ARN dans l'interaction plantes-nématodes à kystes a également été étudié chez le soja (*Glycine max*) infecté par le nématode *H. glycines*. Dans une première étude, les petits ARN de racines infestées et des racines saines de soja ont été séquencés par la technologie Illumina à partir d'un cultivar résistant et d'un cultivar sensible à *H. glycines* (Li *et al.*, 2012b). Des séquences correspondant à 364 miARN répertoriés dans la base de données de référence miRBase ont ainsi été détectées dans au moins une banque mais plus de la moitié des miARN présentaient de faible niveau d'expression (moins de 100 séquences). De plus, 101 miARN appartenant à 40 familles ont été identifiés comme différentiellement exprimés entre les racines saines et les racines infestées dans au moins un des deux cultivars analysés. La majorité de ces miARN sont réprimés en réponse à *H. glycines*, seuls six sont surexprimés (miR171c, miR319, Mir390b, miR862, miR5372 et 4 membres de la famille miR169). Une étude similaire a été réalisée en séquençant les populations de petits ARN exprimés dans les racines saines de deux autres cultivars de soja, un résistant et un sensible à l'infection par *H. glycines* (Xu *et al.*, 2014). Des séquences correspondant à 420 miARN connus et 258 nouveaux miARN de soja ont été détectées. Parmi ces nouveaux miARN, gma-miR393, gma-miR1507, gma-miR1510, gma-miR1515, gma-miR171 et gma-miR2118 ont été identifiés comme inducteur de la production de phasiARN. De plus, 34 miARN sont différentiellement exprimés dans les deux types de cultivars. Enfin, l'expression différentielle lors de la réponse à l'infection par *H. glycines* a été établie par qPCR pour sept miARN (gma-miRC6, gma-miRC46, gma-miRC18, gma-miRC38, gma-miRC31, gma-miRC32, gma-miRC58).

Enfin une étude très récente a mis en évidence de nouvelles cibles potentielles de miARN dans les syncytia 3 et 7 jai par *G. rostochiensis* chez la tomate (Świąćicka *et al.*, 2017). Le transcriptome des syncytia a ainsi permis de caractériser des transcrits différentiellement régulés dans les syncytia, par comparaison avec les racines non inoculées, et correspondant à une cible prédite de miARN. L'analyse de l'expression par PCR quantitative de couples miARN/cible prédite codant pour des protéines NB-LRR impliquées dans la mise en place de défense a permis d'identifier 9 couples montrant une corrélation négative entre l'expression du miARN et leur cible, dont *MIR167* et *MIR396* réprimés dans les galles et *MIR159* surexprimé dans les syncytia (Świąćicka *et al.*, 2017).

Deux études de la méthylation de l'ADN ont été réalisées sur les syncytia de soja et d'*A. thaliana* induits par *Heterodera glycines* et *H. schachtii* respectivement (Rambani *et al.*, 2015; Hewezi *et al.*, 2017). Rambani *et al.* (2015) ont montré que l'infection par les nématodes à kystes induit une

hypométhylation du génome dans des proportions supérieures à l'hyperméthylation. Ainsi 2465 régions sont hyperméthylées et 4692 sont hypométhylées dans les racines infectées en comparaison avec les racines non infectées. De plus, 703 et 1346 gènes uniques sont identifiés comme colocalisés avec des régions hyper- ou hypométhylées respectivement. 278 gènes ont été identifiés comme différemment méthylés dans les syncytia. Ces gènes sont associés aux régulations épigénétiques, à la signalisation hormonale, à l'architecture de la paroi, à la transduction de signal et à l'ubiquitination. Une seconde étude de la méthylation de l'ADN vient d'être réalisée chez *A. thaliana* en réponse à *H. schachtii*. Hewezi *et al.*, (2017) ont réalisé un séquençage bisulfite de l'ADN extrait à partir des syncytia 5 et 10 jai et de racines non inoculées. L'infection par *H. schachtii* induit une hypométhylation générale sur les gènes codant pour des protéines ou sur les éléments transposables préférentiellement situés à proximité de gènes codant pour des protéines. Parmi les gènes différemment exprimés entre le syncytium et la racine saine, il y a un enrichissement en gènes différemment méthylés (25% du total des gènes différemment exprimés) et plus particulièrement ceux liés au métabolisme et à la réponse aux stimuli. Ces résultats suggèrent un rôle de la méthylation de l'ADN dans l'interaction plante – nématode à kystes.

4.5.5.2. Interactions plantes - nématodes à galles

L'étude du rôle des petits ARN dans l'interaction plantes- nématodes à galles n'a été initiée que récemment et aucun article sur ce sujet n'avait été publié au commencement de mon travail de thèse. La première étude des petits ARN en réponse à l'infection par les nématodes à galles décrit l'étude de la réponse systémique de la plante entière lors des étapes précoces de l'interaction (Zhao *et al.* 2015). En se basant sur le constat que l'acide jasmonique est efficace pour lutter contre les nématodes à galles chez la tomate (Cooper *et al.*, 2005; Fujimoto *et al.*, 2011; Nahar *et al.*, 2011), les auteurs ont adopté un approche systémique en identifiant par séquençage Illumina les populations de petits ARN exprimés dans des plantes entières de *Solanum lycopersicum* inoculés avec *M. incognita* à des étapes précoces de l'infection : 6, 12, 24, and 72 heures après inoculation. Pour chaque point de cinétique, deux banques de petits ARN ont été séquencées : l'une à partir de plantes sauvages (*Solanum lycopersicum* var. Castlemart), l'autre à partir d'un mutant affecté dans la voie de biosynthèse de l'acide jasmonique *spr2*. Au total 263 miARN déjà répertoriés chez la tomate et 441 nouveaux miARN sont apparus comme différemment exprimés entre le cultivar sauvage et le mutant *spr2* lors de l'infection par *M. incognita*. Après avoir validé les résultats de séquençage par PCR quantitative pour cinq miARN (miRNA156a, miRNA159a, miRNA172a, miR319b et miR396b), les auteurs ont mis en évidence un profil d'expression anti-corrélé pour les miARN différemment

exprimés et leurs transcrits cibles lors de l'infection pour les couples: miR156a/SPL, miR319/TCP4 et miR159a/MYB. Les auteurs se sont ensuite focalisés sur le couple miR319/TCP4 en raison de son rôle décrit dans la réponse des plantes aux stress biotiques (Palatnik *et al.*, 2003; Ori *et al.*, 2007; Koyama *et al.*, 2010). Dans les racines de tomate infectées, l'expression de *TCP4*, la cible principale de miR319 (Palatnik *et al.*, 2003; Ori *et al.*, 2007; Koyama *et al.*, 2010) diminue entre 0 et 72 hpi alors que l'expression de *MIR319* au contraire augmente. La surexpression dans des plants de tomate d'une forme de *TCP4* mutée au niveau du site de clivage de miR319 dont le transcrit est résistant au clivage induit par miR319 présentent une diminution du nombre de galles et donc une résistance accrue à *M. incognita*. A l'inverse, les lignées de tomates surexprimant *Ath-MIR319* présentent un niveau de sensibilité supérieur aux plantes sauvages. Ces résultats suggèrent donc que miR319 réprime l'expression de *TCP4* qui est un régulateur positif de la voie de signalisation de l'acide jasmonique résultant en une diminution du niveau endogène d'acide jasmonique et modulant négativement la réponse de défense systémique à une infection par les nématodes à galles.

La seconde étude du rôle des petits ARN dans les interactions plantes-nématodes à galles a été publiée en 2016 et décrit l'étude des étapes précoces de l'interaction entre *A. thaliana* et *M. javanica* (Cabrera *et al.* 2016 ; Annexe 1. Cette étude a été réalisée en collaboration avec notre équipe et j'ai contribué à l'obtention de certains résultats présentés dans cet article. A la différence de l'étude précédente réalisée sur plante entière, Cabrera *et al.*, ont ciblé leur étude sur les galles en séquençant spécifiquement les petits ARN dans des galles d'*A. thaliana* induites par *M. javanica* à 3 dpi et dans des entre nœuds racinaires issus de racines non infectées (tronçon racinaire compris entre l'émergence de deux racines). L'analyse des séquences ainsi obtenues montrent d'une part un nombre accru de séquences de 24 nt dans les galles par rapport aux racines et localisées pour la plus part au niveau d'éléments transposables. Les siARN de 24 nt qui ciblent les éléments transposables sont majoritairement associés au mécanisme de la RdDM. Cette surreprésentation des séquences de 24 nt dans les galles suggère donc que la RdDM pourrait être impliquée dans la régulation de l'expression des gènes lors des étapes précoces de la formation de la galle. D'autre part, cette étude a identifié au total 62 miARN différentiellement exprimés entre galles et racines saines dont 11 miARN surexprimés et 51 miARN réprimés dans les galles. Cette majorité de miARN réprimés rappelle les résultats obtenus dans les syncytia à 4 jai (Hewezi *et al.*, 2008). La plupart des 51 miARN réprimés dans les galles ont déjà été décrits pour avoir un rôle dans la réponse au stress ou aux changements de statut nutritionnel (e.g. miR169, miR391, miR399 et miR780) ou dans le développement comme miR165/166 impliqués dans le méristème apical racinaire et dans la floraison. Les auteurs se sont ensuite focalisés sur miR390 qui est fortement surexprimés dans les galles à 3 jai. L'action de miR390 implique la production de petits ARN secondaires issus du clivage du

des gènes de la famille des *ARF* (*ARF2*, *ARF3*, *ARF4*). Ce module très fortement conservé du point de vue évolutif est notamment impliqué dans la polarité de la feuille ainsi que dans le contrôle de la formation des racines latérales secondaires (Hunter *et al.*, 2006; Marin *et al.*, 2010). Une approche gène rapporteur chez *A. thaliana* a permis de montrer que les promoteurs de *miR390a* et *TAS3* sont coactivés dans les galles, et plus particulièrement dans les tissus vasculaires et dans les cellules géantes. De plus, les mutants *A. thaliana* perte de fonction de *MIR390* et *TAS3* présentent un nombre de galles réduit et des galles plus petites que chez l'écotype sauvage reflétant une résistance accrue à *M. javanica*.

Ces études apportent les premiers éléments pour comprendre l'implication des petits ARN dans la réponse systémique de la plante à l'infection par les nématodes à galles ainsi que dans la formation des galles. Toutefois, ces études couvrent les trois premiers jours de l'infection et sont donc focalisées sur les étapes précoces du développement de la galle. A ce jour, aucune information n'est disponible sur le rôle des petits ARN dans les étapes de développement et de maintien du site nourricier. De même, ces études se sont focalisées sur les miARN et à ce jour nous disposons de peu d'informations sur les siARN dans l'interaction plantes – nématode à galles et notamment sur les régulations TGS et PTGS associées aux siARN dans la régulation de l'expression des gènes différentiellement exprimés lors de la formation de la galle.

Objectifs de la thèse

Objectifs de la thèse : Caractérisation des petits ARN régulateurs impliqués dans la formation des galles induites par les nématodes phytoparasites du genre *Meloidogyne*.

L'introduction de ce manuscrit de thèse a permis de montrer que de nombreux mécanismes moléculaires sont ainsi manipulés, directement ou indirectement, par les nématodes à galles afin de transformer les cellules racinaires en cellules géantes nourricières. Différentes approches, en particulier d'analyses transcriptomiques à l'échelle globale et de génétique moléculaire, ont permis de caractériser de très nombreux gènes différentiellement exprimés dans les galles et/ou dans les cellules géantes et de démontrer le rôle essentiel de quelques-uns dans ce processus. Ces gènes dont l'expression est modulée au cours de la formation des cellules géantes sont associés à différents processus biologiques comme le cycle cellulaire, le cytosquelette, les voies de signalisation hormonales, les modifications de la paroi ou la réponse immunitaire. Cependant peu de données sont disponibles sur les acteurs de cette reprogrammation de l'expression génique lors de la formation de la galle. L'expression génique peut être modulée par les petits ARN régulateurs, les facteurs de transcriptions et les modifications de l'état de la chromatine. Lors de mon travail de thèse, j'ai choisi de me focaliser sur l'étude du rôle de ces petits ARN régulateur dans la formation de la galle induite par les nématodes à galles chez la plante modèle *A. thaliana*.

L'objectif de mon projet de thèse était donc de caractériser les petits ARN différentiellement exprimés dans les galles d'*A. thaliana* induites par *M. incognita* à 7 et 14 jours après infection (jai). Ces deux points de cinétiques correspondent à deux étapes importantes de la formation de la galle : une phase active de mise en place des cellules géantes avec des divisions nucléaires sans cytokinèse et une phase de croissance et de maintien du site nourricier associé à des phénomènes d'endoréduPLICATIONS nucléaires. Cette étude était complémentaire de projets développés en parallèle par d'autres équipes pour caractériser les étapes plus précoces de la formation de la galle (3 jai) au niveau de la galle (Cabrera *et al.*, 2016) ou de la réponse systémique de la plante aux nématodes à galles (Zhao *et al.*, 2015).

Une stratégie de séquençage NGS de l'ensemble des petits ARN – dont la taille est comprise entre 17 et 50 nt - des galles et des racines non inoculées d'*A. thaliana* a ainsi été développée à ces deux points de cinétique. Dans un premier temps, je me suis concentrée sur l'analyse des miARN, des petits ARN non codants issus de la transcription de gènes MIR endogènes qui régulent post-transcriptionnellement l'expression des gènes via la dégradation du transcrite ou la répression traductionnelle. J'ai établi un catalogue des miARN matures exprimés dans les galles et les racines saines et identifié les miARN différentiellement exprimés dans les galles. Afin de valider ces profils

d'expression et de caractériser le rôle de ces miARN et de leurs cibles dans la formation de la galle, une analyse fonctionnelle a été développée. Cette analyse fonctionnelle comprenait l'analyse de lignées d'*Arabidopsis* exprimant un gène rapporteur sous contrôle des promoteurs de miARN ou de leurs cibles, des analyses d'hybridation *in situ* afin de détecter le miARN mature dans les cellules géantes et les galles ainsi que des analyses de mutants d'*Arabidopsis* dans ces miARN ou de gènes clés de la machinerie de ces miARN.

Dans un deuxième temps j'ai étudié la famille des siARN dont le rôle est de réguler l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel et transcriptionnel. J'ai identifié les régions du génome accumulant différemment les siARN entre les conditions galles (7 et 14 jai) et racines saines dans l'objectif d'avoir une vue pangénomique des régions (gènes, régions promotrices, éléments transposables) qui pourraient être régulés par les petits ARN en réponse à l'infection par les nématodes à galles.

Au travers de l'identification des petits ARN impliqués dans la formation de la galle, ces résultats permettront également d'aborder les aspects fondamentaux de la différenciation cellulaire, du cycle cellulaire, de la signalisation hormonale chez les végétaux. A plus long terme, l'analyse fonctionnelle des petits ARN différemment régulés et de leurs cibles permettra de proposer des pistes innovantes afin de développer de nouveaux moyens de lutte contre ces ravageurs.

Chapitre 1 :
Caractérisation des microARN
d'*A. thaliana* dans les galles induites
par les nématodes *Meloidogyne spp.*

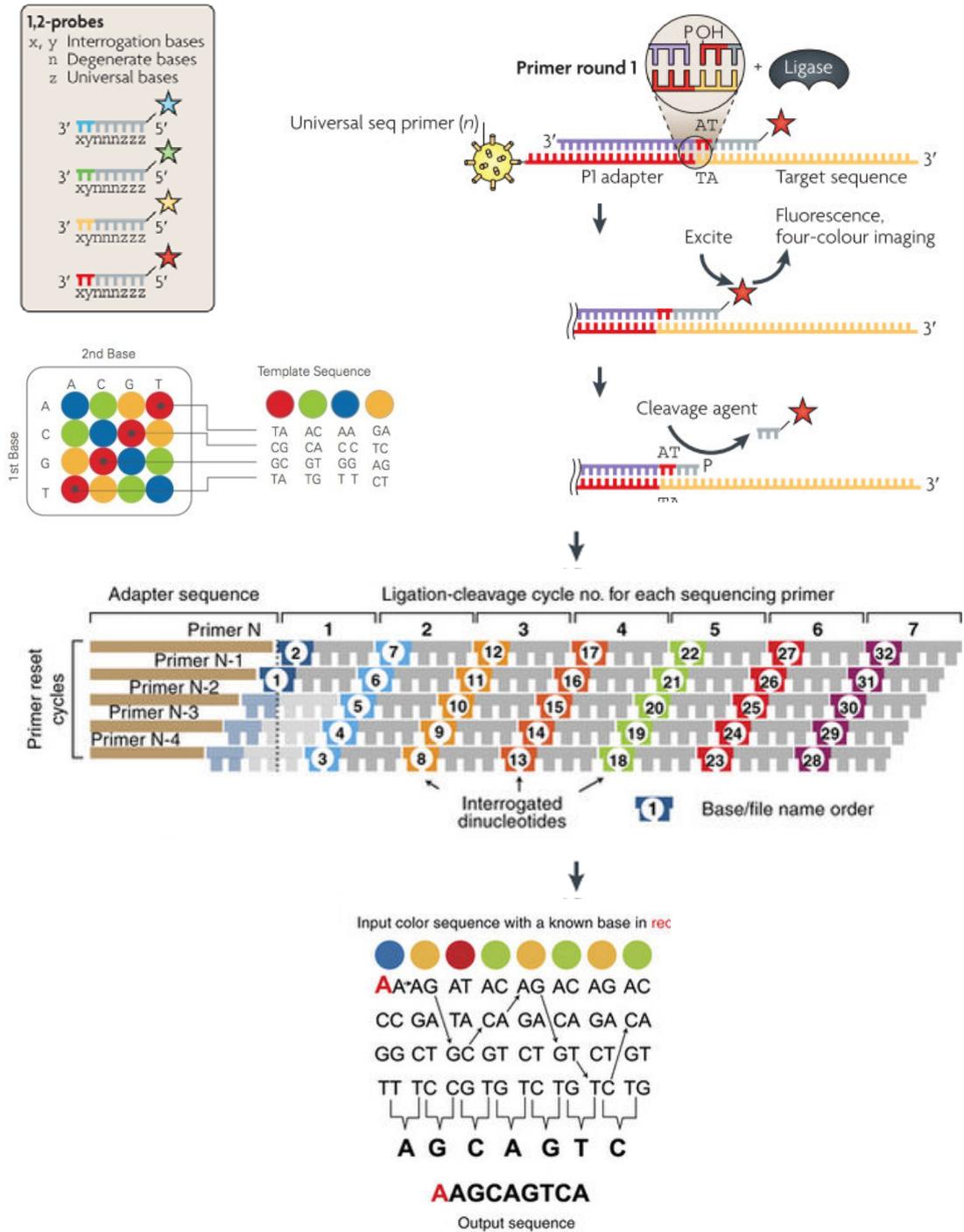


Figure 37 : Technologie de séquençage haut débit SOLiD.

Suite à l'hybridation d'une amorce universelle, un set d'amorces est ajouté. Ces amorces ont la particularité d'avoir en 3'OH un premier nucléotide (x) et un deuxième nucléotide (y) (x et y = A,T,G ou C). Les autres bases sont des bases dégénérées ou universelles. Il existe ainsi 16 combinaisons d'associations x et y qui sont encodées par 4 couleurs, ainsi une couleur correspond à 4 combinaisons de x et y. Les sondes marquées au fluorochrome (bleu, jaune, vert ou rouge) selon la combinaison des deux premiers nucléotides en 3'OH s'hybrident selon la complémentarité de séquence. Après la lecture des fluorochromes une partie de la séquence est clivée puis éliminée et une autre sonde marquée est ajoutée. Les cycles SOLiD sont répétés dix fois ensuite le primer universel est changé 4 fois pour une amorce complémentaire de la séquence n-1. Dans ce processus chaque base est interrogée dans deux réactions de ligation indépendantes par deux différentes amorces. Selon le code couleur, chaque base est associée à deux couleurs. L'alignement s'effectue en espace couleur et est retranscrit en séquence ADN. (D'après Metzker et al. 2008)

Les résultats de mon travail sont présentés sous la forme de deux chapitres, composés principalement de deux articles scientifiques. Le 1^{er} chapitre traite de la caractérisation des miARN d'*A. thaliana* dans les galles induites par les nématodes à galles du genre *Meloidogyne*. Il est complété avec un second chapitre qui présente les résultats de l'analyse de la famille des siARN différentiellement régulés lors de la formation de la galle.

Chapitre 1 : Caractérisation des miARN d'*A. thaliana* dans les galles induites par les nématodes à galles du genre *Meloidogyne* spp.

Cette première étude vise d'une part à identifier les miARN dont l'expression est modifiée lors de la formation des galles d'*A. thaliana* et d'autre part à étudier leur fonction. Afin d'analyser le rôle global des miARN dans l'interaction, des mutants hypomorphes *ago1-25*, *ago1-27*, *ago2-1* et le double mutant *ago1-27/ago2-1* affectés dans les régulations PTGS associées aux petits ARN, ont été infectés par les larves de *M. incognita*. La diminution du nombre de masses d'œufs observée chez ces mutants par rapport aux plantes de l'écotype sauvage suggère un rôle de la voie PTGS et des petits ARN associés dans la formation des galles induites par *M. incognita*. Afin d'étudier le rôle des miARN dans l'interaction plante - nématodes à galles plus en détail, les petits ARN de racines non inoculées d'*A. thaliana* et des galles 7 jai et 14 jai par *M. incognita* ont été séquencés avec la technologie SOLiD (Fig 37). Les séquences s'alignant sur les positions des miARN matures répertoriées dans le génome d'*A. thaliana* ont été comptées et une analyse statistique a permis d'identifier les miARN différentiellement régulés entre la condition « galles » et « racines non infectées ». Au total 10 et 20 miARN ont été identifiés comme différentiellement exprimés à 7 et 14 jai respectivement. L'analyse de lignées portant des constructions de promoteurs de gènes *MIR* fusionnés au gène *GUS* (*MIR167*, *MIR164*, *MIR394*, *MIR390* et *MIR408*) ont permis de confirmer l'activité de ces cinq promoteurs dans les galles. Les profils d'expression des constructions pMIR390b::GUS, pMIR408::GUS, pMIR167d::GUS et pMIR394b::YFP ont permis de confirmer les résultats de séquençage. Ces analyses désignent les miARN des familles miR167, miR390 et miR394 comme des candidats prometteurs pour intervenir dans la formation de la galle. De plus, la réponse à l'infection par *M. incognita* des mutants « mimicry », perte de fonction ou surexpresseurs a été testée pour 7 miARN différentiellement exprimés afin de déterminer le rôle de ces gènes dans la formation des cellules géantes. Ces résultats ont permis de mettre en évidence le rôle important des miARN de la famille miR159 dont les formes matures ont pu être localisées, par une expérience d'hybridation *in situ*, dans les cellules géantes et les cellules voisines de la galle. Enfin l'analyse de l'expression d'une fusion traductionnelle de *MYB33*,

une des cibles des miR159, montre que la surexpression de miR159a et miR159c observée à 14 jai par séquençage est corrélée à une diminution de l'expression de *MYB33*.

L'ensemble de ces résultats font l'objet d'un article soumis à la revue internationale à comité de lecture *The New Phytologist* et qui est actuellement en révision.

Article 1: Characterisation of microRNAs from Arabidopsis galls highlights a role for miR159 in the plant response to the root-knot nematodes *Meloidogyne incognita*.

Clémence Medina, Martine da Rocha, Marc Magliano, Alizée Ratpopoulo, Benoît Revel, Nathalie Marteu, Virginie Magnone, Kevin Lebrigand, Javier Cabrera, Marta Barcala, Ana Cláudia Pereira da Silva, Anthony Millar, Carolina Escobar, Pierre Abad, Bruno Favery & Stéphanie Jaubert-Possamai.

En révision

J'ai contribué à cet article en participant à la collecte du matériel nécessaire au séquençage, en réalisation les analyses bio-informatiques permettant l'identification des miARN exprimés dans les galles et les racines saines ainsi que l'identification des miARN différenciellement exprimés entre les deux conditions. J'ai également contribué à la localisation de l'expression des promoteurs des gènes *MIR* pour les miARN différenciellement régulés miR408, miR167a/b/c/d, miR164c et miR394b et à la rédaction de l'article.



Characterisation of microRNAs from Arabidopsis galls highlights a role for miR159 in the plant response to the root-knot nematodes *Meloidogyne incognita*.

Journal:	<i>New Phytologist</i>
Manuscript ID	NPH-MS-2017-23960.R1
Manuscript Type:	MS - Regular Manuscript
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Medina, Clemence; INRA CNRS UCA, ISA da Rocha, Martine; INRA CNRS UCA, ISA Magliano, Marc; INRA, Université Côte d'Azur, CNRS, Institut Sophia Agrobiotech Ratpopoulo, Alizee; INRA CNRS UCA, ISA Revel, Benoît; INRA CNRS UCA, ISA Marteu, Nathalie; INRA CNRS UCA, ISA Magnone, Virginie; CNRS, IPMC, Université Côte d'Azur, Sophia-Antipolis, Valbonne, France, IPMC Lebrigand, Kevin; CNRS, IPMC, Université Côte d'Azur, Sophia-Antipolis, Valbonne, France, IPMC Cabrera, Javier; Universidad de Castilla la Mancha, Facultad de Ciencias Ambientales y Bioquímica Barcala, Marta; Universidad de Castilla-La Mancha, Facultad de Ciencias Ambientales y Bioquímica Silva, Ana Cláudia; Universidad de Castilla-La Mancha, Facultad de Ciencias Ambientales y Bioquímica Millar, Anthony; Australian National University Research School of Biology, Division of Plant Science Escobar, Carolina; Universidad de Castilla-La Mancha, Facultad de Ciencias Ambientales y Bioquímica Abad, Pierre; INRA CNRS UCA, ISA Favery, Bruno; INRA, Université Côte d'Azur, CNRS, Institut Sophia Agrobiotech Jaubert-Possamai, Stéphanie; INRA CNRS UCA, ISA; INRA
Key Words:	gall, giant cell, microRNA, root-knot nematode, small RNA, transcriptome, Arabidopsis

1 **Characterisation of microRNAs from *Arabidopsis* galls highlights a role for miR159 in**
2 **the plant response to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*.**

3 **Clémence Medina¹, Martine da Rocha^{1*}, Marc Magliano^{1*}, Alizée Ratpopoulo, Benoît**
4 **Revel¹, Nathalie Marteu¹, Virginie Magnone², Kevin Lebrigand², Javier Cabrera³,**
5 **Marta Barcala³, Ana Cláudia Silva³, Anthony Millar⁴, Carolina Escobar³, Pierre Abad¹,**
6 **Bruno Favery¹ & Stéphanie Jaubert-Possamai^{1**}.**

7
8
9 **1** INRA, Université Côte d'Azur, CNRS, ISA, France

10 **2** UCA Genomix, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR6097,
11 Sophia Antipolis, France

12 **3** Universidad de Castilla-La Mancha, Facultad de Ciencias Ambientales y Bioquímica,
13 Toledo, Spain

14 **4** Plant Science Division, Research School of Biology, Australian National University,
15 Canberra, 2601, ACT, Australia

16

17 ****** Corresponding author: stephanie.jaubert@inra.fr ; +33(0)492386504

18 ***** These authors contribute equally to this work

19

20

21 **Word Count. 6,264**

22 Introduction: 1,126 words

23 Materials and Methods: 1,120 words

24 Results: 2192 words

25 Discussion: 1,933 words

26 Acknowledgements: 192 words

27

28 Number of Figures: 8 (All figures except figure 2 to be published in colour)

29 Number of Tables: 1

30 Supporting information: 7 figures and 5 tables.

31

32

33 **Summary**

34

- 35 • Root knot nematodes are root parasites that induce the genetic reprogramming of
36 vascular cells into giant feeding cells and the development of root galls. MicroRNAs
37 regulate gene expression during development and plant responses to various stresses.
- 38 • Disruption of post transcriptional gene silencing in *Arabidopsis ago1* or *ago2* mutants
39 decrease the infection rate of RKN suggesting a role for this mechanism in the plant-
40 nematode interaction.
- 41 • By sequencing small RNAs from uninfected *Arabidopsis* roots and from galls seven and
42 14 days post infection with *Meloidogyne incognita*, we identified 24 miRNAs
43 differentially expressed in gall as putative regulators of gall development. Moreover,
44 strong activity within galls was detected for five miRNA promoters.
- 45 • Analyses of nematode development in an *Arabidopsis miR159abc* mutant had a lower
46 susceptibility to RKN, suggesting a role for the miR159 family in the plant response to
47 *M. incognita*. Localization of mature miR159 within the giant and surrounding cells
48 suggested a role in giant cell and gall. Finally, overexpression of miR159 in galls at 14
49 dpi was associated with the repression of the miR159 target *MYB33* which expression is
50 restricted to the early stages of infection.

51 Overall, these results implicate the miR159 in plant responses to RKN.

52 **Key words**

53 gall, giant cell, microRNA, root-knot nematode, small RNA, transcriptome, Arabidopsis

54

55

56

57 **Introduction**

58

59 Small RNAs are non-coding RNAs of 20 to 24 nucleotides in length. In plants, they act as key
60 transcriptional and post-transcriptional regulators of gene expression in diverse biological
61 processes (Chen, 2009; Bologna & Voinnet, 2014; Matzke & Moshier, 2014). Plant small
62 RNAs are classified into two predominant classes, according to their biogenesis: microRNAs
63 (miRNAs) and small interfering RNAs (siRNAs) (Axtell, 2013). MiRNAs are generated by
64 the transcription of *miRNA* genes by RNA polymerase II to produce an RNA precursor that
65 forms a double stranded RNA hairpin structure, known as the pri-miRNA. This is then
66 processed by DICER to firstly generate a shorter secondary RNA precursor called the pre-
67 miRNA, and a 20-22 nt-long miRNA:miRNA* duplex. The mature miRNA of the duplex is
68 then incorporated into the RNA-induced silencing complex (RISC) and guides the major
69 protein of the RISC, ARGONAUTE1 (AGO1), to the targeted messenger RNA (mRNA) on
70 the basis of sequence complementarity. The AGO1-bound miRNA hybridizes with the target
71 mRNA, inducing its degradation or inhibiting its translation (Bologna and Voinnet, 2014).
72 Most plant *miRNA* genes are members of gene families, where mature miRNAs of each
73 family may differ from one another by several nucleotides. Despite this, most miRNAs from a
74 given family are predicted to regulate the same mRNA targets, as shown for the miR159
75 family (Palatnik *et al.*, 2007).

76 Plant miRNAs play a key role in regulating gene expression in various processes,
77 including development (Lelandais-Brière *et al.*, 2010; Chitwood *et al.*, 2014), metabolism
78 (Liang *et al.*, 2015; Paul *et al.*, 2015), responses to abiotic stresses (Barciszewska-Pacak *et al.*,
79 2015), hormone signalling (Curaba *et al.*, 2014), and plant responses to pathogens or
80 symbiotic micro-organisms (Pumplin & Voinnet, 2013; Weiberg & Jin, 2015). For example,
81 *Arabidopsis thaliana* miR393 was the first miRNA shown to play a role in plant immunity to
82 bacteria. This miRNA, induced by a bacterial PAMP peptide, flg22, represses auxin signalling
83 by targeting the mRNAs encoding the auxin receptor responsible for restricting the growth of
84 *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (Navarro *et al.*, 2006). Furthermore, miR396 has
85 been shown to be involved in successful interactions between *Medicago truncatula* and the
86 symbiotic fungus *Rhizoglyphus irregularis*, and in root growth (Bazin *et al.*, 2013). Plants
87 overexpressing miR396 display lower levels of fungal colonisation than wild-type plants and
88 have a lower root biomass and weaker expression of six growth factor genes (*MtGRF*) and
89 two *bHLH79-like* target genes.

90 Root-knot nematodes (RKN) *Meloidogyne* spp. are highly polyphagous sedentary plant
91 parasites capable of infesting most crop species (Blok *et al.*, 2008; Abad & Williamson,
92 2010). After penetrating host roots, RKN larvae migrate toward the vascular cylinder and
93 reprogram gene expression in several vascular root cells, to induce their development into
94 hypertrophied multinucleate giant feeding cells (GCs). These GCs are metabolically
95 overactive, and serve as the sole source of the nutrients required for RKN development. The
96 growth of the GCs and divisions of the surrounding cells lead to a root deformation known as
97 a knot or gall. GCs are initiated during the first three days after infection and they endure
98 successive nuclear divisions coupled with cell expansion, during the first 10 days post
99 infection (dpi) in *Arabidopsis* (Jones & Payne, 1978; Caillaud *et al.*, 2008). By 21 dpi,
100 differentiated giant cells have formed and have undergone extensive endoreduplication
101 (Wiggers *et al.*, 1990; de Almeida Engler & Gheysen, 2013a). The redifferentiation of
102 vascular cells into GCs results from the extensive reprogramming of gene expression in root
103 cells, in response to RKN signals (Escobar & Fenoll, 2015). The expression of genes
104 encoding proteins involved in metabolism, the cytoskeleton, cell cycle, cell rescue, defence,
105 hormones, cellular communication and cellular transport are modified in galls and giant cells
106 from various plant species (Favery *et al.*, 2016). We started to decipher the genetic pathways
107 that are modified in infected roots, leading to the formation of GCs, but little is known about
108 the regulators of this reprogramming of gene expression.

109 Changes in the root miRNA repertoire in response to infection with sedentary plant parasitic
110 nematodes have been reported. The first studies focused on plant responses to cyst nematodes
111 (CN). Cyst nematodes are another subgroup of sedentary parasitic nematodes that induce a
112 multinucleate feeding structure, the syncytium, in plant roots. GCs and syncytia differ in
113 terms of their biogenesis, with the syncytium resulting from the induction of an initial
114 syncytial cell within the root parenchyma that then integrates several hundred of the
115 surrounding cells through cell wall dissolution (Sobczak & Golinowski, 2008). Sequencing
116 approaches identified 30 miRNAs in *A. thaliana* and 40 miRNAs in soybean that are
117 differentially expressed in response to CN infection (Hewezi *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012).
118 Functional analyses then revealed key roles for two of these miRNAs, miR396 and miR827,
119 in the reprogramming of root cells to form syncytial cells and the suppression of plant
120 defences respectively, in *A. thaliana* (Hewezi *et al.* 2012; 2012; Hewezi *et al.*, 2016). The
121 expression profile of miRNAs during RKN infection has been investigated more recently.
122 Zhao *et al.*, 2015 described the expression profiles of five miRNA genes (*MIR156*, *MIR159*,
123 *MIR172*, *MIR319* and *MIR396*) during the systemic response to RKN infection. They

124 provided evidence for very early regulation of miR319b and its target, TCP4, in the root,
125 within the first 24 h, and showed that TCP4-overexpressing mutants were more resistant to
126 RKNs, whereas miR319-overexpressing plants were more susceptible to RKNs. They showed
127 that miR319b acts as a systemic signal modulating the systemic defence response to RKN via
128 jasmonic acid. The only study reported so far on the global sRNAs profiles within the RKN
129 feeding sites is the sequencing of small RNAs from hand dissected *M. javanica* galls at early
130 infection times, 3 dpi in *A. thaliana* (Cabrera *et al.*, 2016). 62 miRNAs were identified as
131 differentially expressed between the uninfected roots and early developing galls. Furthermore,
132 a role of the miR390/TAS3 regulatory module in plant responses to RKN was demonstrated,
133 with miR390 KO mutant lines infected with *Meloidogyne javanica* displaying significantly
134 lower rates of infection. Gall formation requires miR390/TAS3, through the effects of auxin-
135 responsive factors. In this paper, we have aimed to obtain a complete miRNA profile
136 throughout gall development, by sequencing the population of *A. thaliana* small RNAs
137 expressed in galls induced by the model RKN species *M. incognita* at two key points during
138 giant cell/gall development: 7 dpi, corresponding to the phase of successive nuclear divisions
139 without cytokinesis; and 14 dpi, corresponding to an increase of DNA levels through
140 endoreduplication without nuclear divisions (de Almeida Engler & Gheysen, 2013b) . This
141 analysis adds also crucial data to understand the global changes on sRNA population along
142 RKN infection. We identified 24 miRNAs as differentially expressed in galls 7 and/or 14 dpi
143 as compared to uninfected roots, and established a role for miR159 in the plant-nematode
144 interaction.
145
146

147 **Materials and Methods**

148

149 *Biological material, growth conditions and nematode inoculation*

150 Seeds of *A. thaliana* (ecotype Wassilewskija) or *Solanum lycopersicum* cv. “Saint Pierre”
151 were surface-sterilised and sown on Murashige & Skoog (Duchefa) medium agar plates (0.5 x
152 MS, 1% sucrose, 0.8% agar, pH 6.4). Plates were kept at 4°C for two days, and then
153 transferred to a growth chamber (20°C with 8 h light and 16 h darkness). *M. incognita* strain
154 “Morelos” was multiplied on tomato plants in a growth chamber (25°C, 16 h light and 8 h
155 darkness). For *in vitro* nematode infection, J2 larvae were surface-sterilised with HgCl₂
156 (0.01%) and streptomycin (0.7%) as described elsewhere (Caillaud & Favery, 2016). We
157 inoculated 25-day-old seedlings grown *in vitro* individually with 200 sterilised J2s each,
158 resuspended in Phytigel. Seven and 14 days post inoculation (dpi), galls were hand dissected
159 from the infected roots. We also dissected internodes from uninfected roots (without apical
160 and lateral root meristems) at the same time point than gall samples for use as a negative
161 control. Samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Three
162 independent biological replicates were established for each set of conditions.

163 *Meloidogyne javanica* population was maintained *in vitro* on cucumber (*Cucumis*
164 *sativus* cv Hoffmanns Giganta) and egg masses hatching according to Diaz-Manzano *et al.*,
165 2016.

166 All mutant and transgenic lines tested for susceptibility assays with RKNs are listed
167 in table S1 with references.

168

169 *Construction and sequencing of small RNA libraries*

170 Total RNA, including small RNAs (less than 200 nt long), was isolated from galls or
171 uninfected roots at 7 and 14 dpi. Approximately 150 galls or internode fragments from
172 uninfected roots were independently ground into powder in liquid nitrogen, with a mortar.
173 Total RNA was extracted from these samples with the miRNeasy Mini Kit (Qiagen),
174 according to the manufacturer’s instructions, with three additional washes in RPE buffer. The
175 quality and integrity of the RNA were assessed with a Bioanalyzer (Agilent). Small RNA
176 libraries were generated by ligation, reverse transcription and amplification (11 cycles) from
177 total RNA (2 µg), with the reagents of the NEBNext Small RNA Library Prep Set for SOLiD.
178 Libraries were then quantified with the Bioanalyzer High Sensitivity DNA Kit (Agilent) and
179 sequenced on a SOLiD 5500 wildfire sequencer (Life Technologies) at the Nice-Sophia

180 Antipolis functional genomics platform (France Génomique, IPMC, Sophia Antipolis,
181 France).

182

183 *Bioinformatic miRNA analysis*

184 For each library, adapters were trimmed and reads matching ribosomal RNA, mitochondrial
185 RNA and repeat sequences were removed by performing Blast analyses with the sequences
186 listed in the Rfam database (Nawrocki *et al.*, 2015). The Bowtie aligner was then used to align
187 the trimmed reads (Langmead *et al.*, 2009) on a virtual concatenated genome generated from
188 the *A. thaliana* genome (TAIR10.21) and the *M. incognita* genome (Abad *et al.*, 2008). Each
189 read was attributed to the *A. thaliana* and/or *M. incognita* genome on the basis of the best
190 alignment obtained (2 colour mismatches allowed). Reads with identical best alignment hits
191 for the two genomes were attributed to both the nematode and the plant. If one read aligned to
192 multiple genomic locations, a single read was attributed to each locus.

193 Low-quality mapped reads were removed (more than four colour mismatches, zero
194 sequence mismatches and zero unknown nucleotides “N”), and reads corresponding to
195 molecules of between 20 and 24 nt in size were retained for further analysis. The htseq-count
196 package (Anders *et al.*, 2014) was used to count reads mapping perfectly onto the predicted *A.*
197 *thaliana* mature miRNA sequence (TAIR10). Reads mapping to multiple loci were counted
198 for each of the loci concerned. The counts for mature miRNAs from each replicate were used
199 for differential expression analysis with the R package EdgeR (Robinson *et al.*, 2010).
200 Differentially expressed miRNAs, identified with a false discovery rate of 5% (adjusted
201 pvalue<0.05; Benjamini-Hochberg adjustment), were retrieved.

202

203 *Infection assays*

204 For infection assays, 20 to 29 *A. thaliana* plants for each line (mutants and wild-type) were
205 grown in a mixture of 50% sand and 50% soil, in a growth chamber. We inoculated each plant
206 with 200 *M. incognita* J2s 21 days after germination. Six weeks after infection, the roots were
207 collected, washed and stained with eosin. Stained roots were weighed and galls and egg
208 masses were counted for each root under a binocular microscope. Mann and Whitney tests
209 ($\alpha=5\%$) were performed to determine the significance of the differences in the numbers of
210 egg masses and galls per root observed between mutants and the wild type.

211

212 *Localisation of miRNA expression*

213 We localised *miRNA* promoter activity in *A. thaliana* lines expressing various reporter genes
214 (GUS, VENUS or YFP) fused to the promoter of one of the selected *miRNA* genes: *MIR167a*,
215 *MIR167b*, *MIR167c*, *MIR167d*, *MIR408*, *MIR164c* and *MIR394b* (Table S1). We inoculated
216 21-day-old seedlings in soil and *in vitro*, as described above. We collected inoculated roots
217 and washed them in water 7, 14 and 21 dpi. GUS staining was performed as previously
218 described (Favery *et al.*, 1998), and the roots were observed under a Zeiss Axioplan 2
219 microscope. For promoter activity of *pMYB33::MYB33::GUS*, GUS expression analysis was
220 performed as described in Cabrera *et al.*, (2014). VENUS/YFP-expressing whole galls and
221 primary and secondary uninfected roots were observed with a Zeiss LSM880 confocal
222 microscope. For GUS lines, stained galls were dissected, fixed in 1% glutaraldehyde and 4%
223 formaldehyde in 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.2, dehydrated, and embedded in
224 Technovit 7100 (Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany) as described by the manufacturer.
225 Sections were cut and mounted in DPX (VWR International Ltd, Poole, UK), and observed
226 under a Zeiss Axioplan 2 microscope (Zeiss, Jena, Germany). For YFP- and VENUS-
227 expressing lines, galls and root fragments were dissected, embedded in 6% agarose and sliced
228 (100 μ m) with a HM560V vibratome (Microm), as described by Caillaud & Favery (2016).

229

230 *In situ* hybridisation of miRNAs

231 Plant miRNAs were localised in galls *in situ*, by applying a published protocol (Díaz-
232 Manzano *et al.*, 2016) to tomato galls. “Saint Pierre” tomato plants were grown *in vitro* on
233 Murashige & Skoog (Duchefa) medium agar plates (0.5 x MS, 1% sucrose, 0.8% agar, pH
234 6.4). Tomato roots were inoculated with 200 sterilised J2 10 days after germination, as
235 described above for *Arabidopsis*. Galls were dissected out by hand 14 days after infection and
236 fixed by incubation in 2.5% glutaraldehyde (Sigma) in 0.1% Tween in PBS for seven days at
237 4°C. The galls were dehydrated through ethanol bath and Histo-Clear II then embedded in
238 Paraplast (Sigma) for the cutting of sections. The paraffin was then removed and the 10 μ m
239 sections were prehybridised as described by Díaz-Manzano *et al.* (2016), before being
240 hybridised overnight at 55°C with labelled miR159-LNA probes (Exiqon) at a concentration
241 of 10 nM. Digoxigenin let-7 LNA probes (Exiqon) were used as a negative control, because
242 this miRNA has no orthologue within the tomato genome.

243

244

245 **Results**

246

247 *Post-Transcriptional Gene Silencing disruption alters plant-RKN interaction*

248 We first investigated a possible role for miRNAs in the plant-RKN interaction, by analysing
249 the response to RKN of *A. thaliana* plants with mutations of genes encoding two of the main
250 components of the post-transcriptional gene silencing machinery (PTGS): the ARGONAUTE
251 (AGO) 1 and 2 proteins. AGO1, the main component of the RISC complex, plays an essential
252 role in the miRNA-mediated regulation of development and stress responses (Zhang *et al.*,
253 2011), but it also binds 21nt siRNAs. AGO1 mutants have highly impaired PTGS (Carbonell
254 *et al.*, 2012). In *Arabidopsis*, AGO2 also binds miRNAs, but with a bias for 5' adenosine
255 residues and functions in antibacterial and antiviral immunity (Zhang *et al.*, 2011). We
256 selected the hypomorphic mutants *ago1-27* and *ago1-25*, which have been reported to lack
257 PTGS but to display few developmental defects (Morel *et al.*, 2002), the *ago2-1* mutant, and
258 the *ago1-27 ago2-1* double mutant. These mutants have dark, highly serrated leaves (Morel *et al.*,
259 2002), but they have well-developed root systems (Fig. 1a). We quantified the infection
260 rate by RKN of these mutants by counting the number of mature females with egg masses per
261 root, as an indicator of the complete development and reproduction of the nematode,
262 comparing the results obtained with those for wild-type plants, used as a control. The two
263 *ago1* mutants, *ago1-27* and *ago1-25* (Fig. 1b and Fig. S1), had 55 to 76.5% fewer egg masses
264 than the wild type. The *ago2-1* mutant shown also a decreased infection rate, but this decrease
265 was not as strong as that of the *ago1* mutants (Fig. 1b and Fig. S1). Finally, the *ago1-27/ago2-1*
266 double mutant had fewer egg masses than the wild-type, the decrease in the number of egg
267 masses being similar to that for the single *ago1-27* mutant (Fig. 1b and Fig. S1). The decrease
268 of infection rate induced by hypomorphic *ago1* mutations clearly supports a role for PTGS in
269 the plant-RKN interaction.

270

271 *Overview of the miRNAs detected in galls and control roots*

272 We sequenced the small RNAs expressed in roots and galls at different time points in the
273 plant-RKN interaction. Twelve small RNA libraries corresponding to three independent
274 replicates of galls at 7 and 14 dpi and uninfected roots were sequenced (Fig. 2). Between 31
275 and 70 million reads were obtained for gall and root libraries at 7 and 14 dpi (Fig. S2).
276 Filtering reads against adaptors, ribosomal RNA, mitochondrial RNA and repeat sequences
277 removed only 0.09% to 0.4% of the total number of reads, demonstrating the high quality of

278 the sequenced libraries (Fig. S2). Galls consist of a mixture of plant and nematode tissues and
 279 therefore contain a mixture of *A. thaliana* and *M. incognita* reads. Between 67.2% and 80.2%
 280 of the filtered reads in all samples mapped to the concatenated genome constructed from the
 281 *A. thaliana* and *M. incognita* genomes, indicating a high degree of homogeneity between the
 282 replicate samples (Fig. S2). An analysis of the size distribution of the sequenced reads
 283 revealed a major peak at 24 nucleotides corresponding to the canonical size of
 284 heterochromatic-siRNAs (Fig. 2 and Fig. S3). Of the 427 predicted mature miRNAs and the
 285 325 precursors of miRNAs from *A. thaliana* listed by miRbase version 21 (Kozomara &
 286 Griffiths-Jones, 2014), 235 precursors and 215 mature miRNAs were identified in at least one
 287 library at 7 and 14 dpi, respectively (Table S2 and Table S3). Between 5 to 10% of filtered
 288 gall reads mapped to the genome of *M. incognita* (Table S2). Within *M. incognita* genome, a
 289 significant number of gall reads mapped to eight loci that were previously predicted as
 290 putative *MiRNA* genes on *M. incognita* genome V1 (Abad *et al.* 2008) (Table S3). Among
 291 these eight *MiRNA* genes, four were conserved in other organisms as the free-living nematode
 292 *Caenorhabditis elegans* or the lepidopteran *Bombyx morii* and four had no homology with
 293 *MiRNA* genes listed in miRBase version 21 (Kozomora and Griffiths-Jones 2014).

294

295 *Identification of miRNAs differentially expressed in galls*

296 Statistical analyses performed with EdgeR (Robinson *et al.*, 2010) identified 10 miRNAs
 297 differentially expressed (DE) in galls at 7 dpi from eight miRNA families. Five of these
 298 miRNAs were more abundant and the other five were less abundant in galls (Table 1). At 14
 299 dpi, 20 DE miRNAs from 15 miRNA families were identified: 16 DE miRNAs were more
 300 abundant and the other four were less abundant. Six DE miRNAs (miR164c, miR319c,
 301 miR390a, miR390b, miR398a, miR408) had similar expression profiles at 7 and 14 dpi (Table
 302 1). Galls are complex organs composed of a mixture of plant and nematode tissues. To limit
 303 counting errors due to miRNAs conserved between *M. incognita* and plants, only reads
 304 strictly identical to mature *Arabidopsis* miRNA sequence were counted. We checked the
 305 conservation of the 24 DE *Arabidopsis* miRNAs in *M. incognita* and none had sequences
 306 identical to a sequence from *Meloidogyne*, excluding the possibility of differences in read
 307 counts due to the inclusion of nematode reads. These DE miRNA belonged to 12 miRNA
 308 families including 18 miRNA genes that are strongly conserved in the plant kingdom
 309 (miRBase 21; Kozomara & Griffiths-Jones, 2014). Most of the DE miRNAs identified were
 310 well supported by a significant number of reads with an average read number superior to 25 in
 311 at least one condition. However, five DE miRNAs (miR156h, miR163, miR2111a-3p,

312 miR831, miR861-5p) were eliminated from further analyses because of their very low
313 coverage. Based on conservation and expression support, we selected 10 of the 18 families of
314 miRNAs DE in galls for further functional analysis. These families contained 16 miRNA
315 genes that are conserved and display robust expression: *MIR159a-c*, *MIR164c*, *MIR167d*,
316 *MIR319c*, *MIR390a-b*, *MIR394a-b*, *MIR398a-b-c*, *MIR399b-c* and *MIR408*.

317 We investigated expression pattern of biologically validated targets for the miRNAs that were
318 shown as differentially expressed in galls at 7 and or 14 dpi by screening results from
319 previous transcriptomic analyses (Jammes *et al.* 2005). Among the 49 genes listed as targeted
320 by the DE miRNA in plants (Table S4) eight are differentially expressed galls according to
321 microarrays (Table S5). Among these eight genes, four displayed an anticorrelated expression
322 profile with their corresponding miRNAs supporting a gene regulation by these miRNAs.

323

324 *Temporal and spatial expression profiles for miRNAs differentially expressed in galls and*
325 *roots*

326 Previous analyses of pMIR390a activity showed this promoter to be highly active in galls
327 induced by RKNs (Cabrera *et al.*, 2016), consistent with our sequencing results. We
328 investigated the tissue-specific expression of *miRNA genes* DE in gall and root, by analysing
329 the pattern of promoter activation in *A. thaliana* reporter lines. Seven lines carrying the
330 *miRNA* promoter fused to various reporter genes were tested (Table S1). The activation
331 patterns of the promoters of the miR167, miR408, miR394 and miR164 families clearly
332 showed activity in roots and/or galls.

333 The miR167 family includes four *miRNA genes* in *A. thaliana*: *MIR167a*, *MIR167b*, *MIR167c*
334 and *MIR167d*. We followed the activity of the four *MIR167* promoters in the *A. thaliana* lines
335 described by Wu *et al* (2006). We found that pMIR167b and pMIR167c had no detectable
336 activity in galls (Fig. S5), whereas pMIR167a and pMIR167d were highly active in uninfected
337 roots and in galls at 7 dpi, but weakly active in galls at 14 dpi (Fig. 3a-h). The pMIR167a and
338 pMIR167d promoters were both highly active in galls at 7 dpi, but these two promoters had
339 different expression profiles in uninfected roots: pMIR167a was strongly expressed in
340 secondary roots (Fig. 3a), whereas pMIR167d activity was restricted to the root tip (Fig. 3d).

341 These expression patterns are consistent with our sequencing results, which showed *MIR167d*
342 to be the only *MIR167* gene significantly more abundant in galls, but with a time lag, as
343 statistical analyses of sequenced reads identified a specific over-expression of mature
344 miR167d at 14 dpi. We further investigated the cellular distribution of pMIR167a and
345 pMIR167d activity in semi-thin 7 dpi gall sections, by GUS staining (Fig. 3g and 3h). GUS

346 activity was observed in the whole central part of galls for pMIR167a, whereas it was
347 restricted to the giant cells and neighbouring cells for pMIR167d.

348 Unlike the other miRNAs analysed to date, miR408 is encoded by a single *MIR408*
349 gene. Analysis of the pMIR408::GUS line showed that this promoter was highly active in
350 galls on 7 and 14 dpi (Fig. 3i and 3j). In uninfected root, pMIR408 was activated specifically
351 in secondary roots (Fig. 3k).

352 *A. thaliana* has two miR394 genes, *MIR394a* and *MIR394b*, with identical mature
353 sequences, and therefore both were identified, by sequencing, as more abundant in galls. The
354 distribution of *MIR394b* expression was investigated in an *A. thaliana* line carrying the ~3 kb
355 promoter region of *MIR394b* fused to *NLS-YFP* (Knauer *et al.*, 2013). We detected
356 pMIR394b in galls and in the vascular cylinder of both infected and uninfected roots. In
357 uninfected roots, the nuclear YFP signal was observed in root vascular cylinder cells of both
358 primary and secondary roots (Fig. 4a-c). Only a few YFP-stained nuclei were observed in 7
359 dpi galls (Figure 4d), but larger numbers of YFP-stained nuclei were observed at 14 dpi (Fig.
360 4e) and 21 dpi, when numerous stained nuclei were observed throughout the gall (Fig. 4f).

361 The miR164 family has three genes in *A. thaliana*: *MIR164a*, *MIR164b* and *MIR164c*.
362 However, only miR164c was found to be less abundant at 7 and 14 dpi, according to
363 sequencing data. We investigated the activation of pMIR164c in *A. thaliana* plants carrying
364 the promoter of *MIR164c* fused to the VENUS reporter gene and the N7 nuclear localisation
365 signal (Sieber *et al.*, 2007). In uninfected roots, a strong nuclear VENUS signal was detected
366 in vascular cylinder cells, with a stronger signal in secondary roots than in primary roots (Fig.
367 5a-c). In infected roots, we observed a clear nuclear VENUS signal within galls at 7, 14 and
368 21 dpi, and in surrounding roots (Fig. 5d-f). The pattern of pMIR164c activation was not
369 consistent with the repression of miR164c suggested by statistical analysis of the sequencing
370 reads.

371 We identified five promoters of *miRNA genes* (*MIR167a*, *MIR167d*, *MIR164c*,
372 *MIR394b* and *MIR408*) as activated within galls at 7 and/or 14 dpi. The activation patterns of
373 these promoters in galls and uninfected roots confirmed the upregulation of *MIR167d*,
374 *MIR394b* and *MIR408* highlighted by sequencing analyses.

375

376 *A role for miR159 in the plant response to RKN*

377 We investigated the role of five conserved DE miRNA families (miR408, miR159, miR398,
378 miR319 and miR399) in gall development, using available transgenic mutant lines. Given the
379 redundancy between miRNA family members, wherever possible, we chose to use mutants in

380 which all the members of a miRNA family were affected: overexpressing (OE) lines or
381 multiple knockout (KO) lines. Wild-type, KO and OE lines were inoculated with *M. incognita*
382 J2s and the susceptibility of these lines was quantified by counting the galls and egg masses
383 produced by the adult females at the root surface. OE and KO miR408, OE miR398, OE
384 miR319 and OE miR399 mutants had similar numbers of egg masses to wild-type plants (Fig.
385 S6 and Fig. S7). By contrast, a strong and significant ($p < 0.05$) decrease, of between 40 and
386 50%, in the number of galls and egg masses was observed for the *miR159abc* triple mutant
387 (Allen *et al.*, 2010) relative to the wild type (Fig. 6).

388 Infection assays suggested a role for the miR159 family in the plant response to RKN
389 infection. We further investigated the role of miR159 in plant responses to RKNs, by
390 analysing the cellular distribution of the mature forms within galls by *in situ* hybridisation. As
391 the miR159 family has been conserved throughout evolution in the plant kingdom (Axtell &
392 Bartel, 2005), we were able to perform *in situ* hybridisation studies on sections of 14 dpi
393 tomato galls. Hybridisation were performed on tomato instead of *Arabidopsis* gall sections
394 since preservation of tomato galls tissues after sectioning and hybridisation is enhanced as
395 compared to *Arabidopsis* and therefore resolution is improved. Hybridisation with the
396 miR159 LNA probe corresponding to the tomato miR159 sequence gave an intense specific
397 signal within the giant cells and in the neighbouring cells (Fig. 7a), whereas a very faint signal
398 was detected in any other part of the infected roots (Fig. 7b), and no signal was detected with
399 the negative control probe, miRNA *let-7* (Fig. 7c). This distribution suggests with a role for
400 miR159 in gall development during the plant response to RKN. The members of the miR159
401 family control several transcription factors of the MYB family, by inducing the cleavage of
402 their mRNA (Palatnik *et al.*, 2007). We investigated the expression profile of the transcription
403 factor MYB33, one of two major miR159 targets, in *Arabidopsis* lines expressing a
404 pMYB33::MYB33::GUS translational fusion (Millar & Gubler, 2005). This construct was
405 susceptible to post-transcriptional gene silencing by miR159. MYB33::GUS expression was
406 clearly observed within galls at early stages of gall development, at 3 and 7 dpi (Fig. 8a-b), at
407 14 dpi no signal was observed (Fig. 8c). This gradual decrease in MYB33::GUS expression
408 during gall development was correlated with the significant overexpression of miR159a and -
409 c in galls observed at 14 dpi in sequencing analyses (Table 1). Overall, these results suggest
410 that the miR159 family is involved in plant responses to RKN, at medium-late infection
411 stages, probably through the repression of MYB33 transcription.

412
413

414 Discussion

415

416 Differentially expressed miRNAs in galls

417 Plant parasitic nematodes have a striking ability to manipulate normal parenchyma root cells
418 and turn them into hypermetabolic feeding cells. Multiple transcriptomic analyses have been
419 carried out and we are now beginning to decipher the massive reprogramming of transcription
420 underlying the formation of these feeding structures. By contrast, the molecular mechanisms
421 regulating this reprogramming of gene expression are still poorly understood. Two recent
422 analyses identified nematode-responsive miRNAs very early (3 dpi) in the plant-RKN
423 interaction in tomato and *Arabidopsis* revealing a role for tomato miR319 and its target TCP4
424 and for the *Arabidopsis* miR390/TAS3 module in response to RKNs (Zhao *et al.*, 2015;
425 Cabrera *et al.*, 2016). Initial functional analyses revealed a role for the *Arabidopsis*
426 miR390/TAS3 module and for tomato miR319 and its target TCP4 in response to nematodes.
427 In this study, we aimed to extend these findings by identifying miRNAs expressed in
428 *Arabidopsis* galls and roots at key later stages of giant cell formation: 7 and 14 dpi.
429 Expression studies were also performed in three time points that correspond to different
430 phases of gall formation: 3 dpi corresponds to the first nuclear divisions without cytokinesis;
431 the polyploidy of giant cells then increases due to successive divisions, until 7 dpi (Starr,
432 1993), and, by 14 dpi, nuclear division has stopped but the nuclei and giant cells continue to
433 increase in size, due to endoreduplication. By sequencing whole small RNAs from
434 *Arabidopsis* galls and uninfected roots, we identified 24 miRNAs as differentially expressed
435 in galls at 7 and/or 14 dpi. We established the expression profiles of five of these miRNAs in
436 galls and provided evidences supporting a role for miR159 in galls.
437 Repressed miRNAs were overrepresented among the 62 miRNAs DE at 3 dpi (Cabrera *et al.*,
438 2016), whereas the proportions of overexpressed- and repressed miRNAs in galls were similar
439 at 7 dpi and overexpressed miRNAs were overrepresented (16/20) at 14 dpi. A similar switch
440 in miRNA expression profile between early and later stages of feeding site formation was
441 observed in *Arabidopsis*, in the syncytia induced by the cyst nematode *H. schachtii*, in which
442 a global repression of miRNAs was observed at 4 dpi whereas overexpressed miRNAs were
443 more numerous in syncytia at 7 dpi (Hewezi *et al.*, 2008). Compared to miRNAs DE at 3 dpi
444 in galls (Cabrera *et al.*, 2016), only two miRNA families, miR390 and miR319, displayed
445 significant differential expression with the same profile at the three time points of gall
446 development considered (Fig. S5). The other miRNA families were differentially expressed at

447 a specific single time point or at only two time points, as for miR399, which was differentially
448 regulated at 3 and 7 dpi, miR408, miR398 and miR164, which were differentially regulated at
449 7 dpi and 14 dpi, and miR167 and miR159, which were differentially regulated at 3 and 14
450 dpi. Most of the miRNAs differentially expressed in galls (19/24) have been conserved
451 throughout evolution and have orthologs in multiple plant species. As RKNs induce similar
452 galls and giant cells in a wide range of plant species, conserved miRNAs are of particular
453 interest as possible regulators of the gene networks underlying gall formation.

454 Thirteen miRNA families in *Arabidopsis* have been identified as differentially
455 expressed at 4 or 7 dpi in syncytia induced by the cyst nematode *Heterodera schachtii*
456 (Hewezi *et al.*, 2008). Four miRNA families — miR157, miR164, miR167 and miR398 —
457 were differentially expressed in galls and syncytia at 7 dpi, but, with the exception of miR164,
458 these miRNAs had opposite expression profiles in galls and syncytia. This finding highlights
459 the differences in biogenesis between these two structures, despite their morphological
460 similarities.

461 We analysed expression pattern of 71 genes that were defined as biologically validated
462 targets of the miRNAs DE in galls. We identified five genes with an expression profile in
463 galls anti-correlated with their corresponding miRNAs. This result also underlines that the use
464 of microarrays is not the best approach to investigate mRNA targeted by miRNAs partly
465 because of its lack of sensitivity for transcription factors and also because RNA cleavage
466 products may hybridize with arrays. Analysis of cleavage product resulting from miRNA
467 activity by high throughput sequencing, also named “degradome” method would represent an
468 accurate approach to identify miRNA targets that needs to be developed for the plant-
469 nematode interaction.

470

471 **Functional analysis of DE miRNAs in galls**

472 The *in vivo* expression patterns of the DE miRNAs in galls were investigated in *Arabidopsis*
473 lines carrying reporter genes fused to the *miRNA* promoters. The expression patterns we
474 observed are consistent with the strong expression in galls suggested by the sequencing results
475 obtained for miR394b, miR408 and miR167d. However, there was a time lag between
476 promoter activity and the detection of mature miRNA for miR167d, with strong promoter
477 activity observed in galls at 7 dpi that subsequent decreased, eventually disappearing at 14
478 dpi, whereas sequencing analyses identified the mature form of miR167d as statistically more
479 abundant only in galls at 14 dpi. The expression profiles obtained for the four different genes
480 of the miR167 family were consistent with the sequencing results, which showed only

481 miR167d to be overexpressed in galls, with miR167a strongly expressed in both galls and
482 roots. Surprisingly, we observed strong miR164c promoter activity in galls and uninfected
483 roots, whereas sequencing identified miR164c as less abundant in galls. In uninfected roots,
484 the miR164c promoter was much more active in secondary roots than in primary roots. Most
485 of the gall samples were collected from primary roots, whereas healthy internodes were
486 collected from both primary and, mostly, secondary roots. Thus, the repression in galls
487 suggested by sequencing analysis for miR164c may thus be due to differences in expression
488 between primary and secondary roots, rather than a difference in expression specific to galls.
489 We investigated the susceptibility to RKNs of plants with modified patterns of expression for
490 several miRNAs. There is only one copy of *MIR408* in the *Arabidopsis* genome, but the
491 miR398, miR319 and miR159 multi-*miRNA* gene families each contain several genes with
492 mature sequences differing by one or a few nucleotides, often targeting the same mRNAs
493 (Palatnik *et al.*, 2007; Bouché, 2010). Hence, we overcame the issue of redundancy due to
494 multigene families, by selecting *Arabidopsis* lines in which the whole miRNA family was
495 affected: multiple insertion mutant (*miR159abc*) or OE lines. No change in susceptibility was
496 observed for miR408, miR398c, miR319a or miR399c lines. Thus, these miRNAs, may not be
497 essential for the *Arabidopsis*-RKN interaction although overexpression of *MIR319a* in tomato
498 increased susceptibility to RKN infection (Zhao *et al.*, 2015).

499

500 **MiR159 a new player of the plant-nematode interaction**

501 The miR319 and miR159 families are both ancient and closely related, with 17/21 nucleotides
502 in common (Palatnik *et al.*, 2007). These two families have different targets, with miR159
503 regulating MYB transcription factors and miR319 guiding the cleavage of TCP transcription
504 factors. However, some of these mRNAs may be targeted by members of both families. For
505 example, MYB33 and MYB65 can also be targeted by miR319 (Palatnik *et al.*, 2007; Zhao *et*
506 *al.*, 2015). Strong resistance to RKNs was observed in the *miR159abc* triple mutant,
507 indicating a role for the miR159 family in the formation of galls induced by RKN in
508 *Arabidopsis*. The miR159 family contains three genes in *A. thaliana*, in which miR159a and
509 miR159b are the most abundant forms, with very low levels of miR159c expression observed
510 in flowers, in a narrow range of cell types (Allen *et al.*, 2010). Results of *in situ* hybridization
511 confirmed the expression of the miR159 family within galls and giant cells. However this
512 technique does not discriminate between the different members of the miR159 family that
513 have highly similar mature sequences. Production and analysis of *A. thaliana* lines expressing
514 reporter gene fused to the promoters of *MIR159a*, *MIR159b* and *MIR159c* and infected with

515 *M. incognita* should complete our *in situ* hybridization results and shed light on the
516 member(s) of this family expressed within gall cells. Most analyses of the miR159 family
517 have been performed in flowers, in which, miR159c was considered obsolete due to its very
518 weak expression, the apparently low level of selection pressure on this gene and the absence
519 of phenotypic defects and target deregulation in miR159c mutants (Allen *et al.*, 2010; Alonso-
520 Peral *et al.*, 2012). Whereas miR159b has been shown to be repressed in galls at 3 dpi
521 (Cabrera *et al.*, 2016), miR159a and c were more abundant in galls at 14 dpi. Comparisons of
522 the normalised abundances of the various members of the miR159 family (Table S2 and Table
523 S3) showed miR159c to be the most abundant form in roots and galls, at both 7 and 14 dpi.
524 This finding suggests that miR159c may play a specific role in roots. Our infection assays on
525 the miR159abc triple mutant demonstrated that miR159 played a key role in the plant
526 response to RKN, but further specific functional analyses for each individual gene of the
527 miR159 family are now required to determine the specific role of miR159c in the plant-
528 nematode interaction. The observation of gall sections and measurement of giant cell size in
529 the various *miR159* mutants are required to determine if these microRNAs are involved in the
530 giant cell formation. Predicted miR159 cleavage sites have been identified in 7 gibberellin-
531 and abscisic acid (ABA)-regulated MYB, GAMYB-like, transcription factors (Palatnik *et al.*,
532 2007), with MYB33 and MYB65 identified as the major targets. Gibberellic acid (GA) has
533 been implicated in plant response to RKN. GA promotes cell division and elongation, and a
534 general induction of genes involved in GA biosynthesis and response was observed in galls
535 and/or giant cells from tomato (Bar-Orl *et al.*, 2005) and rice (Kyndt *et al.*, 2012; Ji *et al.*,
536 2013). In galls, MYB33 expression has been shown to be inversely correlated with the
537 expression of miR159 family members, as assessed by sequencing. Whereas miR159 was
538 repressed at 3 dpi and overexpressed at 14dpi, *MYB33* was strongly expressed and translated
539 at 3 dpi, and its MYB33::GUS protein level decreased to undetectable levels at 14 dpi. While
540 *MYB33* transcripts have been detected by microarrays in galls at 7 and 14 dpi (Jammes *et al.*
541 2005), the undetectable level of MYB33 protein at 14 dpi showed by our results suggest an
542 inhibition of *MYB33* translation at 14 dpi. Altogether, these results suggest that miR159 may
543 play a role during gall development by inhibiting *MYB33* translation as it was previously
544 demonstrated (Li *et al.* 2014). However, identification of miR159 cleavage products by
545 degradome sequencing (Addo Quaye 2008) is required to identify the various targets of
546 miR159 in galls. The members of the miR159 family also target several other MYB
547 transcription factors. Further functional analyses are now required to investigate the other

548 targets of miR159 in galls, to decipher the miR159 pathway involved in the plant-nematode
549 interaction and the role of miR159 in root development.

550 Despite the strong resistance to RKN observed in hypomorphic *ago1* mutants,
551 suggesting a role for small RNAs and PTGS in plant-nematode interactions, most of the
552 miRNAs, except miR159, we have investigated to date were found to have no effect on the
553 plant response to *Meloidogyne*. AGO1 is a key protein of the RISC, a multiprotein complex
554 involved in both miRNA and siRNA pathways that is targeted by pathogens (Weiberg *et al.*,
555 2013). In plants, siRNAs regulate gene expression at the transcriptional and post-
556 transcriptional levels, and siRNA involvement in plant responses to pathogens is increasingly
557 being reported (Cabrera *et al.*, 2016; Katiyar-Agarwal, Gao, Vivian-Smith, & Jin, 2007;
558 Pumplin & Voinnet, 2013). The sequencing results obtained in this work should now be
559 processed with a dedicated algorithm to identify siRNAs produced in galls and to investigate
560 siRNA-mediated regulation pathways and their role in gall formation.

561

562 **Acknowledgements**

563 The authors thanks Christine Lelandais (IPS2, Paris-Saclay, France) and Nicolas Bouché
564 (IJPB, Versailles, France) for helpful discussions, Jason W. Reed (University of North
565 Carolina, USA) for providing the pMIR167::GUS lines, Thomas Laux (University of
566 Freiburg, Switzerland) for providing the pMIR394b:NLS:YFP lines, Lei Li (Beijing
567 University) for providing the pMIR408::GUS lines lines, Tzyy-Jen Chiou (Agricultural
568 Biotechnology Research Center, Taiwan) for providing the *mir399* mutant lines, Olivier Pierre
569 (ISA, France) for providing help for microscope observation and Marc Bailly Béchet (ISA,
570 France) for his advices in statistics. C.M. was supported by “Santé des Plantes et
571 Environnement” INRA department and Provence Alpes Côte d’Azur fellowship. This work
572 was funded by INRA and by the French Government (National Research Agency, ANR)
573 through the ‘Investments for the Future’ LabEx SIGNALIFE: program reference #ANR-11-
574 LABX-0028-01 and by the Plant-KBBE program NESTOR (ANR-13-KBBE-0003-06). Work
575 was also supported by the Spanish government (grants AGL2013-48787; AGL2016-75287-R
576 to CE). ACS was supported by a fellowship from the University of Castilla-La Mancha, co-
577 founded by the European Social Fund. This Work was supported by France Génomique
578 National infrastructure, funded as part of “Investissement d’avenir” program managed by
579 Agence Nationale pour la Recherche (contrat ANR-10-INBS-09) ”.

580

581 **Author contributions**

582 C.M. performed the research, data analysis, interpretation; M.M. collected biological samples
583 and performed ISH experiments; M.D.R., KL and C.M. performed the bioinformatic data
584 analysis; N.M. produced the nematodes; V.M. prepared libraries for sequencing; A.R.
585 performed infection assays; B.R. performed GUS analyses; C.E. J.C. M.B. and A.P.
586 performed GUS MYB-33 analysis; S.J.P. and B.F. supervised the experiments and data
587 analyses; S.J.P, B.F. and P.A. supervised the research; C.M., S.J.P. and B.F. wrote the paper.

588

589 **References**

590

591 **Abad P, Gouzy J, Aury J-M, Castagnone-Sereno P, Danchin EGJ, Deleury E, Perfus-**
 592 **Barbeoch L, Anthouard V, Artiguenave F, Blok VC, et al. 2008.** Genome sequence of the
 593 metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature biotechnology* **26**: 909–15.

594 **Abad P, Williamson VM. 2010.** Plant Nematode Interaction: A Sophisticated Dialogue.
 595 *Advances in Botanical Research*. 147–192.

596 **Allen RS, Li J, Alonso-Peral MM, White RG, Gubler F, Millar AA. 2010.** MicroR159
 597 regulation of most conserved targets in *Arabidopsis* has negligible phenotypic effects. *Silence*
 598 **1**: 18.

599 **de Almeida Engler J, Gheysen G. 2013a.** Nematode-Induced Endoreduplication in Plant
 600 Host Cells: Why and How? *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**: 17–24.

601 **de Almeida Engler J, Gheysen G. 2013b.** Nematode-induced endoreduplication in plant host
 602 cells: why and how? *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **26**: 17–24.

603 **Alonso-Peral MM, Sun C, Millar AA, Filipowicz W, Bhattacharyya S, Sonenberg N,**
 604 **Voinnet O, Huntzinger E, Izaurralde E, Bartel D, et al. 2012.** MicroRNA159 Can Act as a
 605 Switch or Tuning MicroRNA Independently of Its Abundance in *Arabidopsis* (D
 606 Bhattacharya, Ed.). *PLoS ONE* **7**: e34751.

607 **Anders S, Pyl PT, Huber W. 2014.** HTSeq - A Python framework to work with high-
 608 throughput sequencing data. *Bioinformatics (Oxford, England)* **31**: 166–169.

609 **Axtell MJ. 2013.** Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annual review of*
 610 *plant biology* **64**: 137–59.

611 **Axtell MJ, Bartel DP. 2005.** Antiquity of MicroRNAs and Their Targets in Land Plants. **17**:
 612 1658–1673.

613 **Bar-Orl C, Kapulnik Y, Koltai H. 2005.** A broad characterization of the transcriptional
 614 profile of the compatible tomato response to the plant parasitic root knot nematode
 615 *Meloidogyne javanica*. *European Journal of Plant Pathology* **111**: 181–192.

616 **Barciszewska-Pacak M, Milanowska K, Knop K, Bielewicz D, Nuc P, Plewka P, Pacak**
 617 **AM, Vazquez F, Karlowski W, Jarmolowski A, et al. 2015.** *Arabidopsis* microRNA
 618 expression regulation in a wide range of abiotic stress responses. *Frontiers in Plant Science* **6**:
 619 410.

620 **Bazin J, Khan GA, Combier J-P, Bustos-Sanmamed P, Debernardi JM, Rodriguez R,**
 621 **Sorin C, Palatnik J, Hartmann C, Crespi M, et al. 2013.** miR396 affects mycorrhization

- 622 and root meristem activity in the legume *Medicago truncatula*. *The Plant journal : for cell and*
623 *molecular biology* **74**: 920–34.
- 624 **Blok VC, Jones JT, Phillips MS, Trudgill DL. 2008.** Parasitism genes and host range
625 disparities in biotrophic nematodes: the conundrum of polyphagy versus specialisation.
626 *BioEssays* **30**: 249–259.
- 627 **Bologna NG, Voinnet O. 2014.** The Diversity, Biogenesis, and Activities of Endogenous
628 Silencing Small RNAs in *Arabidopsis*. *Annual Review of Plant Biology* **65**: 473–503.
- 629 **Bouché N. 2010.** New insights into miR398 functions in *Arabidopsis*. *Plant signaling &*
630 *behavior* **5**: 684–6.
- 631 **Cabrera J, Barcala M, García A, Rio-Machín A, Medina C, Jaubert-Possamai S, Favery**
632 **B, Maizel A, Ruiz-Ferrer V, Fenoll C, et al. 2016.** Differentially expressed small RNAs in
633 *Arabidopsis* galls formed by *Meloidogyne javanica*: A functional role for miR390 and its
634 TAS3-derived tasiRNAs. *New Phytologist* **209**: 1625–1640.
- 635 **Caillaud M-C, Favery B. 2016.** In Vivo Imaging of Microtubule Organization in Dividing
636 Giant Cell. 137–144.
- 637 **Caillaud M-C, Lecomte P, Jammes F, Quentin M, Pagnotta S, Andrio E, de Almeida**
638 **Engler J, Marfaing N, Gounon P, Abad P, et al. 2008.** MAP65-3 microtubule-associated
639 protein is essential for nematode-induced giant cell ontogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant cell*
640 **20**: 423–37.
- 641 **Carbonell A, Fahlgren N, Garcia-Ruiz H, Gilbert KB, Montgomery TA, Nguyen T,**
642 **Cuperus JT, Carrington JC. 2012.** Functional analysis of three *Arabidopsis*
643 ARGONAUTES using slicer-defective mutants. *The Plant cell* **24**: 3613–29.
- 644 **Chen X. 2009.** Small RNAs and Their Roles in Plant Development. *Annual Review of Cell*
645 *and Developmental Biology* **25**: 21–44.
- 646 **Chitwood DH, Sinha NR, Cushman JA, Cushman JA, Goebel K, Rubio-Somoza I, Zhou**
647 **C-M, Confraria A, Martinho C, Born P von, et al. 2014.** Plant development: small RNAs
648 and the metamorphosis of leaves. *Current biology : CB* **24**: R1087-9.
- 649 **Curaba J, Singh MB, Bhalla PL. 2014.** miRNAs in the crosstalk between phytohormone
650 signalling pathways. *Journal of experimental botany* **65**: 1425–38.
- 651 **Díaz-Manzano FE, Barcala M, Engler G, Fenoll C, de Almeida-Engler J, Escobar C.**
652 **2016.** A Reliable Protocol for In situ microRNAs Detection in Feeding Sites Induced by Root-
653 Knot Nematodes. *Frontiers in plant science* **7**: 966.

- 654 **Escobar C, Barcala M, Cabrera J, Fenoll C. 2015.** Overview of root-knot nematodes and
 655 giant cells. In: Escobar C, Fenoll C, eds. *Advances in Botanical Research: Plant Nematode*
 656 *Interactions*, Vol 73. Elsevier
- 657 **Favery B, Lecomte P, Gil N, Bechtold N, Bouchez D, Dalmaso A, Abad P. 1998.** RPE, a
 658 plant gene involved in early developmental steps of nematode feeding cells. *The EMBO*
 659 *journal* **17**: 6799–811.
- 660 **Favery B, Quentin M, Jaubert-Possamai S, Abad P. 2016.** Gall-forming root-knot
 661 nematodes hijack key plant cellular functions to induce multinucleate and hypertrophied
 662 feeding cells. *Journal of Insect Physiology* **84**: 60–69.
- 663 **Hewezi T, Howe P, Maier TR, Baum TJ. 2008.** Arabidopsis Small RNAs and Their Targets
 664 During Cyst Nematode Parasitism. **21**: 1622–1634.
- 665 **Hewezi T, Maier TR, Nettleton D, Baum TJ. 2012.** The Arabidopsis microRNA396-
 666 GRF1/GRF3 regulatory module acts as a developmental regulator in the reprogramming of
 667 root cells during cyst nematode infection. *Plant physiology* **159**: 321–35.
- 668 **Hewezi T, Piya S, Qi M, Balasubramaniam M, Rice JH, Baum TJ. 2016.** Arabidopsis
 669 miR827 mediates post-transcriptional gene silencing of its ubiquitin E3 ligase target gene in
 670 the syncytium of the cyst nematode *Heterodera schachtii* to enhance susceptibility. *Plant*
 671 *Journal*: 179–192.
- 672 **Ji H, Gheysen G, Denil S, Lindsey K, Topping JF, Nahar K, Haegeman A, De Vos WH,**
 673 **Trooskens G, Van Criekinge W, et al. 2013.** Transcriptional analysis through RNA
 674 sequencing of giant cells induced by *Meloidogyne graminicola* in rice roots. *Journal of*
 675 *Experimental Botany* **64**: 3885–3898.
- 676 **Katiyar-Agarwal S, Gao S, Vivian-Smith A, Jin H. 2007.** A novel class of bacteria-induced
 677 small RNAs in Arabidopsis. *Genes & development* **21**: 3123–34.
- 678 **Khraiwesh B, Zhu J-K, Zhu J. 2012.** Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic
 679 stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory*
 680 *Mechanisms* **1819**: 137–148.
- 681 **Knauer S, Holt AL, Rubio-Somoza I, Tucker EJ, Hinze A, Pisch M, Javelle M,**
 682 **Timmermans MC, Tucker MR, Laux T. 2013.** A Protodermal miR394 Signal Defines a
 683 Region of Stem Cell Competence in the Arabidopsis Shoot Meristem. *Developmental Cell* **24**:
 684 125–132.
- 685 **Kozomara A, Griffiths-Jones S. 2014.** miRBase: annotating high confidence microRNAs
 686 using deep sequencing data. *Nucleic acids research* **42**: D68-73.
- 687 **Kyndt T, Denil S, Haegeman A, Trooskens G, Bauters L, Van Criekinge W, De Meyer**

- 688 **T, Gheysen G. 2012.** Transcriptional reprogramming by root knot and migratory nematode
689 infection in rice. *The New phytologist* **196**: 887–900.
- 690 **Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. 2009.** Ultrafast and memory-efficient
691 alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology* **10**: R25.
- 692 **Lelandais-Brière C, Sorin C, Declerck M, Benslimane A, Crespi M, Hartmann C. 2010.**
693 Small RNA diversity in plants and its impact in development. *Current genomics* **11**: 14–23.
- 694 **Liang G, Ai Q, Yu D. 2015.** Uncovering miRNAs involved in crosstalk between nutrient
695 deficiencies in Arabidopsis. *Scientific reports* **5**: 11813.
- 696 **Li X, Wang X, Zhang S, Liu D, Duan Y, Dong W. 2012.** Identification of soybean
697 microRNAs involved in soybean cyst nematode infection by deep sequencing. *PloS one* **7**:
698 e39650.
- 699 **Matzke MA, Moshier RA. 2014.** RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of
700 increasing complexity. *Nature Reviews Genetics* **15**: 394–408.
- 701 **Millar AA, Gubler F. 2005.** The Arabidopsis GAMYB-Like Genes , MYB33 and MYB65 ,
702 Are MicroRNA-Regulated Genes That Redundantly Facilitate Anther Development. **17**: 705–
703 721.
- 704 **Morel J-B, Godon C, Mourrain P, Béclin C, Boutet S, Feuerbach F, Proux F, Vaucheret**
705 **H. 2002.** Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional
706 gene silencing and virus resistance. *The Plant cell* **14**: 629–39.
- 707 **Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones**
708 **JDG. 2006.** A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin
709 signaling. *Science (New York, N.Y.)* **312**: 436–9.
- 710 **Nawrocki EP, Burge SW, Bateman A, Daub J, Eberhardt RY, Eddy SR, Floden EW,**
711 **Gardner PP, Jones TA, Tate J, et al. 2015.** Rfam 12.0: updates to the RNA families
712 database. *Nucleic acids research* **43**: D130-7.
- 713 **Palatnik JF, Wollmann H, Schommer C, Schwab R, Boisbouvier J, Rodriguez R,**
714 **Warthmann N, Allen E, Dezulian T, Huson D, et al. 2007.** Sequence and Expression
715 Differences Underlie Functional Specialization of Arabidopsis MicroRNAs miR159 and
716 miR319. *Developmental Cell* **13**: 115–125.
- 717 **Paul S, Datta SK, Datta K. 2015.** miRNA regulation of nutrient homeostasis in plants.
718 *Frontiers in Plant Science* **6**: 232.
- 719 **Pumplin N, Voinnet O. 2013.** RNA silencing suppression by plant pathogens: defence,
720 counter-defence and counter-counter-defence. *Nature reviews. Microbiology* **11**: 745–60.
- 721 **Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2010.** edgeR: a Bioconductor package for

- 722 differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics (Oxford,*
 723 *England)* **26**: 139–40.
- 724 **Sieber P, Wellmer F, Gheyselinck J, Riechmann JL, Meyerowitz EM. 2007.** Redundancy
 725 and specialization among plant microRNAs: role of the MIR164 family in developmental
 726 robustness. *Development* **134**.
- 727 **Sobczak M, Golinowski W. 2008.** Structure of Cyst Nematode Feeding Sites. Springer
 728 Berlin Heidelberg, 1–35.
- 729 **Starr JL. 1993.** Dynamics of the Nuclear Complement of Giant Cells Induced by
 730 *Meloidogyne incognita*. *Journal of nematology* **25**: 416–421.
- 731 **Vaucheret H. 2006.** Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and
 732 regulations. *Genes & development* **20**: 759–71.
- 733 **Weiberg A, Jin H. 2015.** Small RNAs--the secret agents in the plant-pathogen interactions.
 734 *Current opinion in plant biology* **26**: 87–94.
- 735 **Weiberg A, Wang M, Lin F-M, Zhao H, Zhang Z, Kaloshian I, Huang H-D, Jin H. 2013.**
 736 Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways.
 737 *Science (New York, N.Y.)* **342**: 118–23.
- 738 **Wiggers RJ, Starr JL, Price HJ. 1990.** DNA Content and Variation in Chromosome
 739 Number in Plant Cells Affected by *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *Phytopathology*
 740 **Vol.80 No.:** pp.1391-1395.
- 741 **Wu M-F, Tian Q, Reed JW. 2006.** Arabidopsis microRNA167 controls patterns of ARF6
 742 and ARF8 expression, and regulates both female and male reproduction. *Development*
 743 *(Cambridge, England)* **133**: 4211–4218.
- 744 **Zhang X, Zhao H, Gao S, Wang W-C, Katiyar-Agarwal S, Huang H-D, Raikhel N, Jin**
 745 **H. 2011.** Arabidopsis Argonaute 2 regulates innate immunity via miRNA393(□)-mediated
 746 silencing of a Golgi-localized SNARE gene, MEMB12. *Molecular cell* **42**: 356–66.
- 747 **Zhao W, Li Z, Fan J, Hu C, Yang R, Qi X, Chen H, Zhao F, Wang S. 2015a.**
 748 Identification of jasmonic acid-associated microRNAs and characterization of the regulatory
 749 roles of the miR319/TCP4 module under root-knot nematode stress in tomato. *Journal of*
 750 *Experimental Botany* **66**: 4653–4667.
- 751 **Zhao W, Li Z, Fan J, Hu C, Yang R, Qi X, Chen H, Zhao F, Wang S. 2015b.**
 752 Identification of jasmonic acid-associated microRNAs and characterization of the regulatory
 753 roles of the miR319/TCP4 module under root-knot nematode stress in tomato. *Journal of*
 754 *experimental botany* **66**: 4653–67.
- 755

756

757

For Peer Review

758 **Table 1 miRNAs differentially expressed in galls at 7 or 14 dpi.**

759

miRNA	7 dpi				14 dpi				Conservation
	average of		logFC	P-value	average of		logFC	P-value	
	normalised reads				normalised reads				
gall	root	gall	root	gall	root	gall	root		
miR156h	3	0	3,94	3,813E-02	1	0	-	ns	Yes
miR157d	28	10	-	ns	144	21	2,12	2,552E-03	Yes
miR159a	327	75	-	ns	211	37	1,87	5,576E-03	Yes
miR159c	754	149	-	ns	653	99	2,21	8,196E-03	Yes
miR163	17	15	-	ns	0	6	-5,09	1,062E-05	No
miR164c	78	163	-2,09	1,637E-03	92	185	-1,61	1,378E-02	Yes
miR167d	17991	4753	-	ns	29188	4111	2,26	6,772E-05	Yes
miR319c	15	29	-2,06	2,152E-02	7	17	-2,02	3,130E-03	Yes
miR390a/b	12866	1185	2,50	1,637E-03	14336	1706	2,52	2,552E-03	Yes
miR394a/b	401	176	-	ns	341	79	1,55	2,093E-02	Yes
miR398a	578	61	2,26	4,136E-03	641	92	2,30	2,552E-03	Yes
miR398b/c	10267	1011	-	ns	19894	1491	3,29	6,772E-05	Yes
miR399b/c	90	168	-2,08	4,136E-03	223	211	-	ns	Yes
miR408	9029	1087	2,04	4,164E-02	9184	1220	2,41	1,022E-03	Yes
miR822	2385	1422	-	ns	397	1302	-2,17	1,181E-02	No
miR831	6	2	-	ns	6	0	2,97	3,130E-03	No
miR833b	106	26	-	ns	126	25	1,78	2,552E-03	No
miR861-5p	0	1	-5,79	1,410E-02	0	1	-	ns	No
miR2111a-3p	0	1	-	ns	4	0	3,85	1,533E-02	Yes
miR2934-5p	22	10	-	ns	30	6	1,77	5,369E-03	No

miRNAs differentially expressed between galls and uninfected roots are shown, with the mean numbers of reads for the three gall and root libraries at 7 or 14 dpi. Gall/root expression fold change (FC) and statistical significance (P-value) for the differentially expressed miRNAs are indicated. The presence of miRNA in others species than *Arabidopsis* is also mentioned. ns: no significant (pval>0,05). Conservation: 'yes' indicated that the miRNA is conserved in *Arabidopsis* and in at least one other plant species based on plant miRNAs repertoire available in miRbase version 21 (Kozomara & Griffiths-Jones, 2014).

760

761

762 **Figure legends**

763

764 **Fig. 1 Argonaute mutants infection assays.** Phenotype of *A. thaliana ago1-25*, *ago1-*
 765 *27/ago2-1* at 18 days after germination and *ago1-27* at 23 days after germination compared to
 766 the wild type ecotype Col0 (a). Susceptibility of mutants is indicated as relative susceptibility
 767 of the mutants compared to the wild type *A. thaliana* ecotype Col0, as shown by the average
 768 percentage of the number of females with egg masses per plant. Three independent tests were
 769 performed and are represented by three different colors. Solid symbols indicate test in which
 770 mutant lines are significantly different from the wild type based on Mann-Whitney ($P < 0.05$).
 771 Scale bars : 1cm.

772

773 **Fig. 2 Schematic representation of analysis pipeline.** Sampling (a) : galls (G) induced by
 774 *M. incognita* and uninfected roots (R) were sampled from *A. thaliana* plants at 7 and 14 dpi in
 775 three independent biological replicates (G or R, 7 or 14, .1 to .3). RNA sequencing (b) RNAs,
 776 including small RNAs, were extracted, sequenced and mapped on a concatenated *A. thaliana*
 777 and *M. incognita* genome. Size distribution of mapped reads on the *A. thaliana* genome (c),
 778 with three peaks, at 21, 23, and 24 nt. Standard deviations were calculated for the mean of the
 779 three biological replicates. Mapping and statistical analysis (d) : reads mapped on predicted *A.*
 780 *thaliana* miRNA sequences were counted and a statistical analysis (Edge R, $pval < 0.05$)
 781 identified miRNAs differentially expressed in galls.

782

783

784 **Fig. 3 Expression patterns for pMIR167a, pmIR167d and pMIR408 in galls and**
 785 **uninfected roots.** Activity of pMIR167a was observed in uninfected roots (a) and galls
 786 induced by *Meloidogyne incognita* 7 dpi (b) and 14 dpi (c). Activity of pmIR167d was
 787 observed in uninfected roots (d) and in galls 7 dpi (e) and 14 (f). Activity of pMIR167d (g)
 788 and pMIR167a (h) was observed within galls section of 10 μ m. Activity of pMIR408 was
 789 observed in uninfected roots (k) and in galls induced by *Meloidogyne incognita* 7 dpi (i) and
 790 14 dpi (j). Scale bars: 20 μ m

791

792 **Fig. 4 Expression pattern of pMIR394b::NLS:YFP in galls and uninfected roots.**
 793 Expression pattern of pMIR394b in uninfected primary roots (a and b) and in uninfected

794 secondary roots (c). We found that pMIR394b was also activated in galls induced by *M.*
 795 *incognita* 7 dpi (d), 14 dpi (e) and 21 dpi (f). Scale bars: 50 μ m.

796

797 **Fig. 5 Expression pattern of pMIR164c::VENUS:N7 in galls and uninfected roots.**

798 Activity of pMIR164c was observed in uninfected primary roots (a) and in uninfected
 799 secondary roots (b). General view of the pattern of expression of pMIR164c in uninfected
 800 roots (c). Activity of pMIR164c was also observed in galls induced by *M. incognita*, 7 dpi (d),
 801 14 dpi (e) and 21 dpi (f). Scale bars: 50 μ m.

802

803 **Fig. 6 Infection assays with miR159abc mutants.** Phenotype of the *miR159abc* mutant

804 compared to the wild type ecotype Col0 23 days after germination (a). The *miR159abc* triple
 805 mutant infected with *Meloidogyne incognita* J2 had a significant lower susceptibility to RKNs
 806 than the wild type Col0 as shown by the smaller mean number of egg masses and galls per
 807 root in the two infection assays (b). Box plots were realized with the results of infection
 808 assays. A decrease between 38 and 50% of egg masses and 44% and 50% of galls per root
 809 was observed in *miR159abc* mutant. Mann-Whitney tests were performed for statistical
 810 analysis in each experiment; significant differences relative to Col-0: *, $P < 0.05$. Number of
 811 plant per test: Test 1 (Col0 n=24 ; *miR159abc* n= 21); Test 2 (Col0 n=16 ; *miR159abc* n= 11)
 812 Scale bars : 1cm.

813

814 **Fig. 7 Localisation of mature miR159 by in situ hybridisation.** Mature *miR159* was

815 localised in giant and neighbouring cells in tomato 14 dpi gall sections (a) but no signal was
 816 detected in other parts of infected roots (b). A probe corresponding to the nematode
 817 microRNA *let-7*, that has no ortholog in tomato genome, was used as a control (c). Scale bars:
 818 μ m.

819

820

821 **Fig. 8 Expression pattern of pMYB33::MYB33::GUS in galls.** Expression pattern of

822 *pMYB33::MYB33::GUS* in galls. Expression of *MYB33* was followed in Arabidopsis lines
 823 expressing a *pMYB33::MYB33::GUS* translational fusion. *MYB33::GUS* expression was
 824 observed within galls at early stages of gall development, at 3 and 7 dpi (a-b), and *GUS*
 825 expression was observed seldom at 14dpi (c). Scale bars: 200 μ m.

826

827

828 **Supplementary Informations :**

829 **Table S1. *Arabidopsis* mutants used in this study**

830

831 **Table S2. Reads from the three gall libraries at 7 dpi (G7.1-3) and 14 dpi**
832 **(G14.1-3) mapped on *M. incognita* genome.**

833

834 **Table S3. Reads from the three gall libraries at 7 dpi (G7.1-3) and 14 dpi**
835 **(G14.1-3) mapped on *miRNA* genes predicted in *M. incognita* genome V1**
836 **(Mi_V1) and their homologs in miRBase**

837

838

839 **Table S4. List of biologically validated targets of miRNAs differentially**
840 **expressed in galls**

841

842 **Table S5. MiRNA and their biologically validated targets that showed**
843 **anticorrelated expression profiles in galls at 7 and/or 14 dpi.**

844

845

846 **Figure S1 : Infection assays with argonaute mutants**

847

848 **Fig. S2 Schematic representation of the sequencing, cleaning, mapping and**
849 **filtering of sRNA libraries.**

850

851 **Fig. S3 Size distribution of normalised cleaned reads of gall and uninfected**
852 **root libraries at 7 dpi (G7.1-3 and R 7.1-3) and 14 dpi (G14.1-3 and R 14.1-**
853 **3) mapped on *Arabidopsis* genome.**

854

855 **Fig. S4: : Expression pattern of pMIR167b (a-b) and pmIR167c (c-d) in**
856 **galls and uninfected roots.**

857

858 **Fig. S5 Differentially expressed miRNA families from *Arabidopsis thaliana***
859 **at various times during infection with *Meloidogyne incognita*: 7 dpi, 14 dpi**
860 **(this study) and 3 dpi (Cabrera *et al.* 2016).**

861

862 **Figure S6 : Infection assays with miR398 (a), miR319 (b) and miR399 (c)**
863 **OE mutants**

864

865 **Figure S7 : Infection assays with OE and KO miR408 mutants**

866

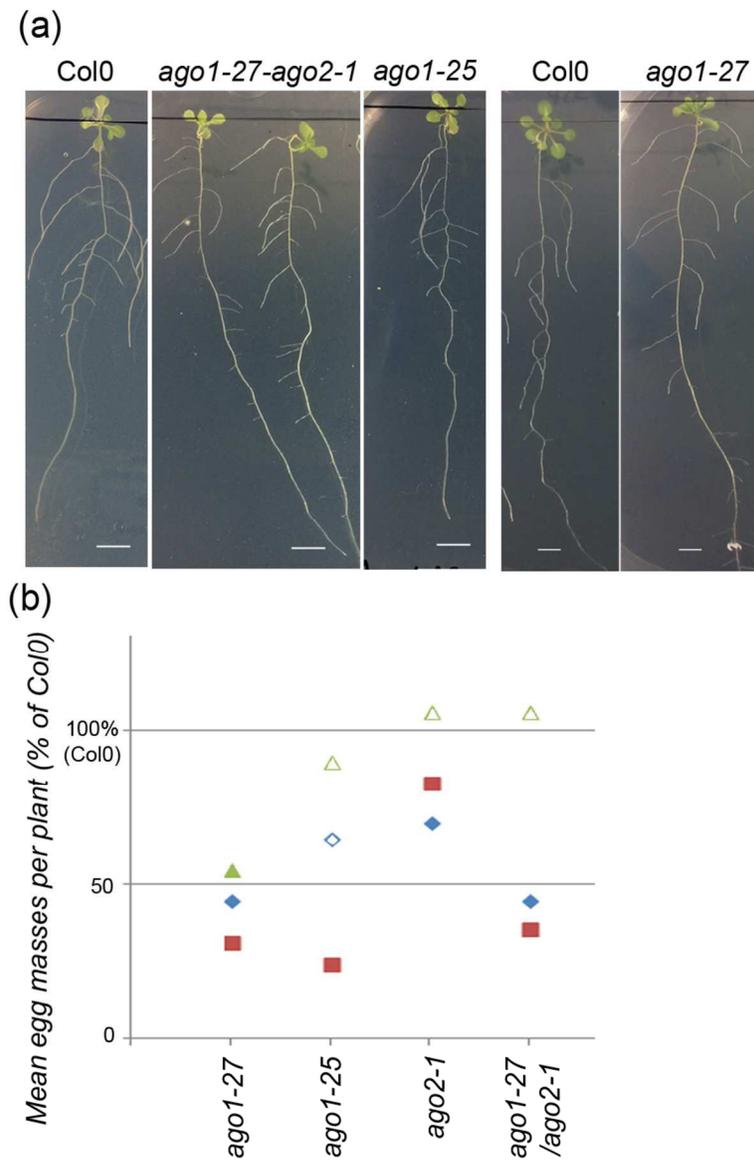


Fig. 1 Argonaute mutants infection assays. Phenotype of *A. thaliana* ago1-25, ago1-27/ago2-1 at 18 days after germination and ago1-27 at 23 days after germination compared to the wild type ecotype Col0 (a). Susceptibility of mutants is indicated as relative susceptibility of the mutants compared to the wild type *A. thaliana* ecotype Col0, as shown by the average percentage of the number of females with egg masses per plant. Three independent tests were performed and are represented by three different colors. Solid symbols indicate test in which mutant lines are significantly different from the wild type based on Mann-Whitney ($P < 0.05$).

Scale bars : 1cm.

80x119mm (300 x 300 DPI)

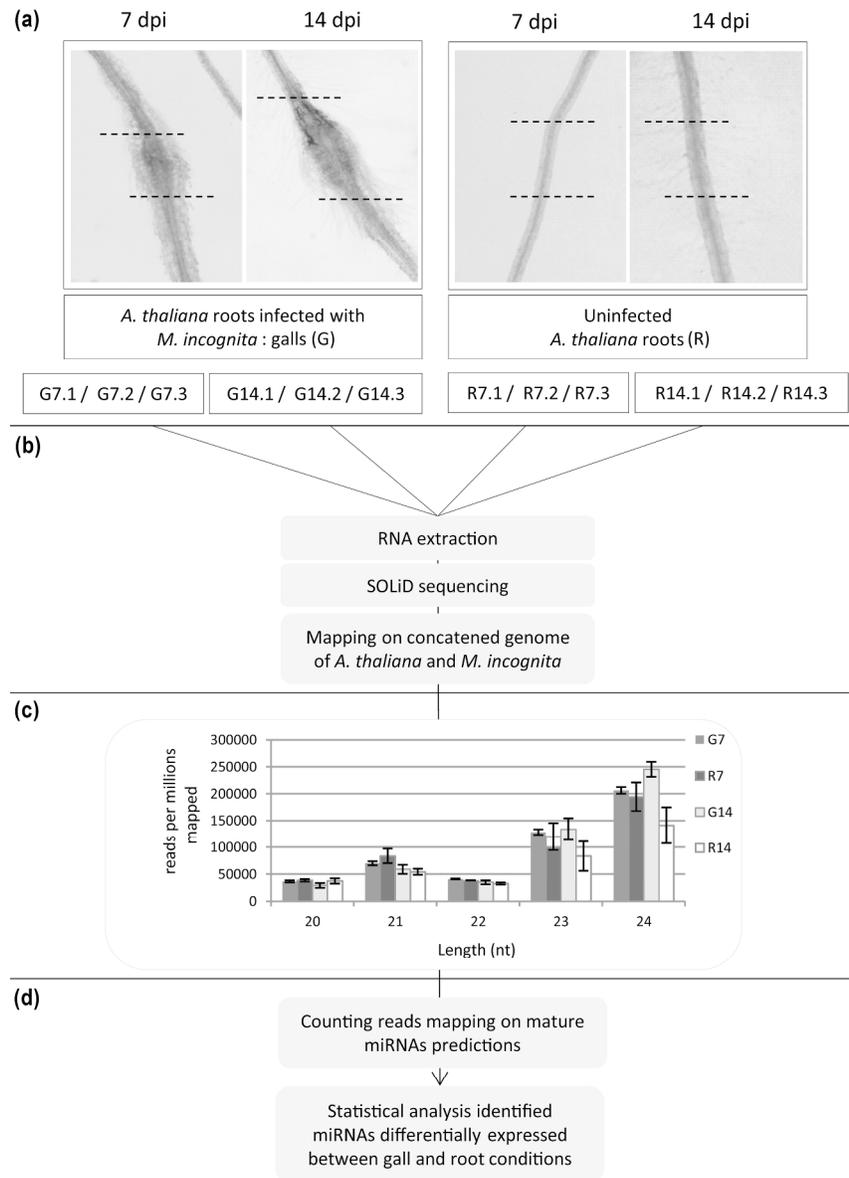


Fig. 2 Schematic representation of analysis pipeline. Sampling (a) : galls (G) induced by *M. incognita* and uninfected roots (R) were sampled from *A. thaliana* plants at 7 and 14 dpi in three independent biological replicates (G or R, 7 or 14, .1 to .3). RNA sequencing (b) RNAs, including small RNAs, were extracted, sequenced and mapped on a concatenated *A. thaliana* and *M. incognita* genome. Size distribution of mapped reads on the *A. thaliana* genome (c), with three peaks, at 21, 23, and 24 nt. Standard deviations were calculated for the mean of the three biological replicates. Mapping and statistical analysis (d) : reads mapped on predicted *A. thaliana* miRNA sequences were counted and a statistical analysis (Edge R, p val < 0.05) identified miRNAs differentially expressed in galls.

218x306mm (300 x 300 DPI)

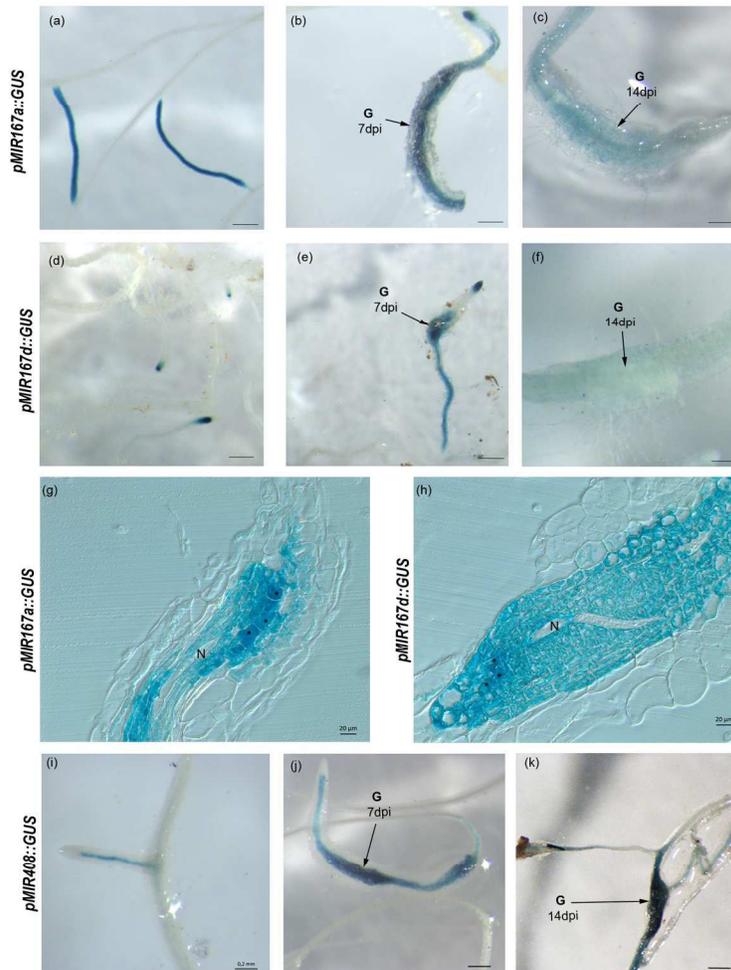


Fig. 3 Expression patterns for pMIR167a, pMIR167d and pMIR408 in galls and uninfected roots. Activity of pMIR167a was observed in uninfected roots (a) and galls induced by *Meloidogyne incognita* 7 dpi (b) and 14 dpi (c). Activity of pMIR167d was observed in uninfected roots (d) and in galls 7 dpi (e) and 14 (f). Activity of pMIR167d (g) and pMIR167a (h) was observed within galls section of 10 μ m. Activity of pMIR408 was observed in uninfected roots (i) and in galls induced by *Meloidogyne incognita* 7 dpi (j) and 14 dpi (k). Scale bars: 20 μ m

160x199mm (300 x 300 DPI)

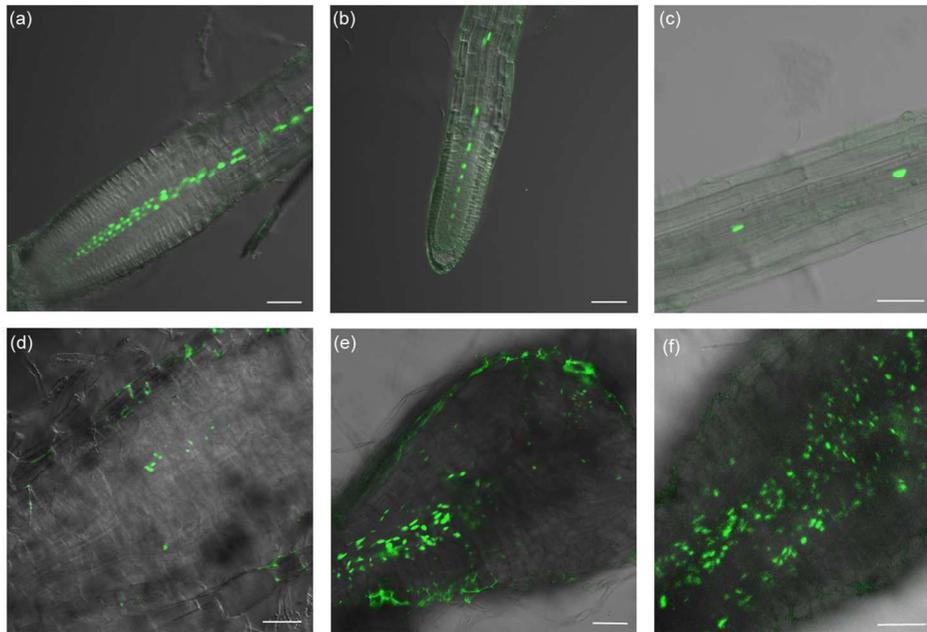


Fig. 4 Expression pattern of pMIR394b::NLS:YFP in galls and uninfected roots. Expression pattern of pMIR394b in uninfected primary roots (a and b) and in uninfected secondary roots (c). We found that pMIR394b was also activated in galls induced by *M. incognita* 7 dpi (d), 14 dpi (e) and 21 dpi (f). Scale bars: 50 μ m.

114x79mm (300 x 300 DPI)

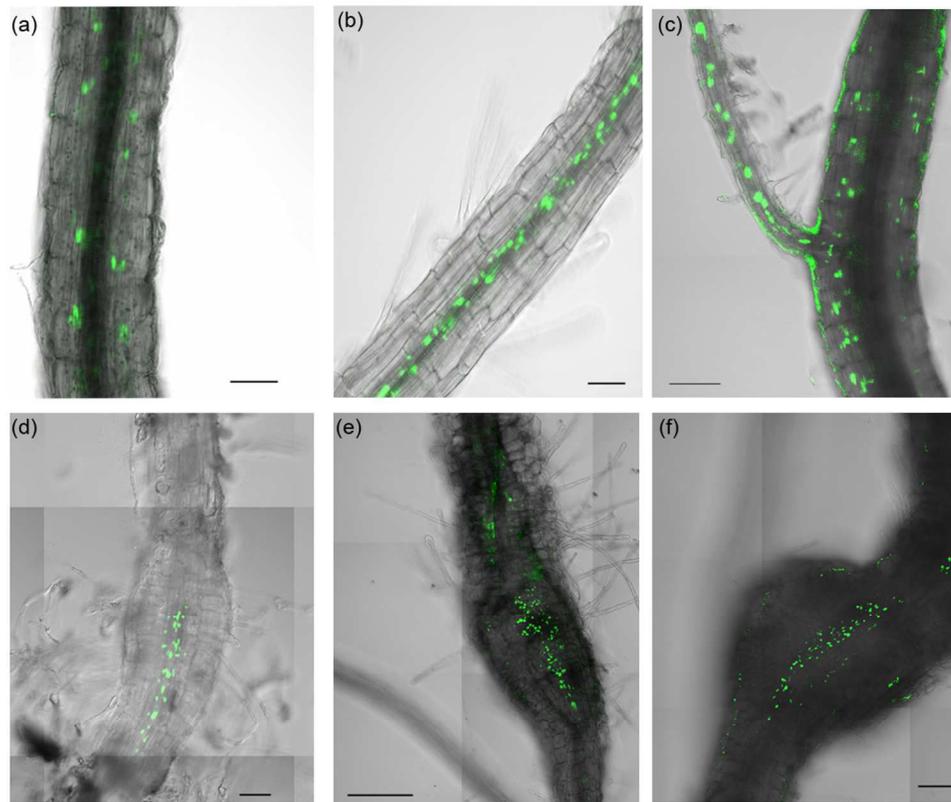


Fig. 5 Expression pattern of pMIR164c::VENUS:N7 in galls and uninfected roots. Activity of pMIR164c was observed in uninfected primary roots (a) and in uninfected secondary roots (b). General view of the pattern of expression of pMIR164c in uninfected roots (c). Activity of pMIR164c was also observed in galls induced by *M. incognita*, 7 dpi (d), 14 dpi (e) and 21 dpi (f). Scale bars: 50 μ m.

99x83mm (300 x 300 DPI)



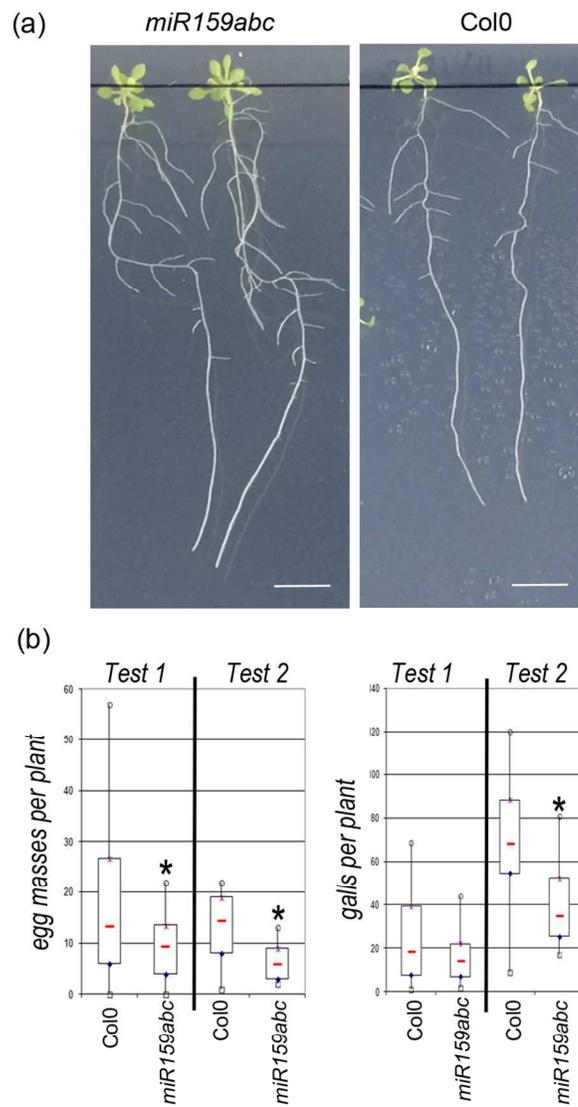


Fig. 6 Infection assays with *miR159abc* mutants. Phenotype of the *miR159abc* mutant compared to the wild type ecotype Col0 23 days after germination (a). The *miR159abc* triple mutant infected with *Meloidogyne incognita* J2 had a significant lower susceptibility to RKNs than the wild type Col0 as shown by the smaller mean number of egg masses and galls per root in the two infection assays (b). Box plots were realized with the results of infection assays. A decrease between 38 and 50% of egg masses and 44% and 50% of galls per root was observed in *miR159abc* mutant. Mann-Whitney tests were performed for statistical analysis in each experiment; significant differences relative to Col-0: *, $P < 0.05$. Number of plant per test: Test 1 (Col0 $n=24$; *miR159abc* $n= 21$); Test 2 (Col0 $n=16$; *miR159abc* $n= 11$)
Scale bars : 1cm.

80x150mm (300 x 300 DPI)

For Peer Review

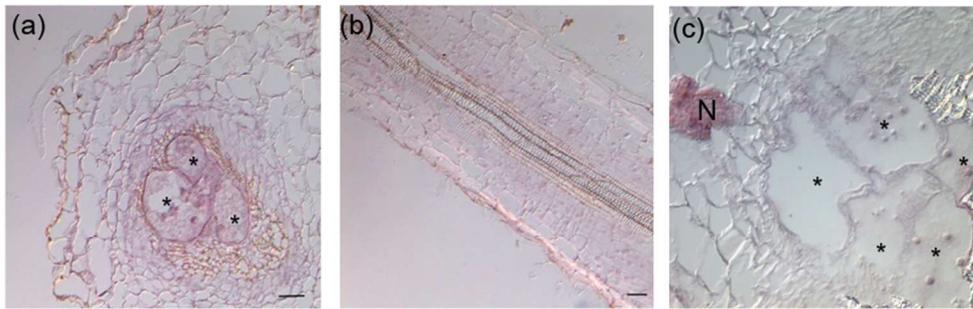


Fig. 7 Localisation of mature miR159 by in situ hybridisation. Mature miR159 was localised in giant and neighbouring cells in tomato 14 dpi gall sections (a) but no signal was detected in other parts of infected roots (b). A probe corresponding to the nematode microRNA let-7, that has no ortholog in tomato genome, was used as a control (c). Scale bars: μm .

75x24mm (300 x 300 DPI)

Peer Review



Fig. 8 Expression pattern of pMYB33::MYB33::GUS in galls. Expression pattern of pMYB33::MYB33::GUS in galls. Expression of MYB33 was followed in Arabidopsis lines expressing a pMYB33::MYB33::GUS translational fusion. MYB33::GUS expression was observed within galls at early stages of gall development, at 3 and 7 dpi (a-b), and GUS expression was observed seldom at 14dpi (c). Scale bars: 200 μ m.

80x20mm (300 x 300 DPI)

Résultats complémentaires du chapitre 1.

Table 2 : Expression profiles of genes targeted by differentially expressed miRNA and displaying a differential expression in transcriptomic data.

miRNA	miRNA Target	AGI	Gall 7dpi	Gall 14dpi	miRNA profile	anticorrelated profiles ?
miR319	TCP3	AT1G53230	No	-0,76	miR319	No
	TCP10	AT2G31070	1,22	0,80	miR319	Yes
miR164	NAC1	AT1G56010	No	-1,13	miR164	No
	NAC080	AT5G07680	No	-0,98	miR164	No
	NAC6	AT5G39610	No	-1,42	miR164	No
miR398	CSD1	AT1G08830	-0,79	No	miR398	Yes
	BCB	AT5G20230	-1,35	-1,20	miR398	Yes
miR408	PAC1	AT3G22110	No	-0,81	miR408	Yes

Table 3: Percentage of mapped reads of gall libraries on *A. thaliana* and *M. incognita* genomes at 7 and 14 dpi.

		Total reads mapped	Reads mapped on <i>Meloidogyne incognita</i> genome (%)	Reads mapped on <i>Arabidopsis thaliana</i> genome (%)
7 dpi	Gall 1	31400709	4,7	95,3
	Gall 2	36030415	9,2	90,8
	Gall 3	38487529	5,6	94,4
14 dpi	Gall 1	24527738	4,3	95,7
	Gall 2	45907679	3,3	96,7
	Gall 3	28595876	5,3	94,7

Table 4 : Reads of gall libraries mapping on *M. incognita* miRNA mature prediction at 7 and 14 dpi

Name	Reference Mi_V1	Sequence	Ortholog miRBase	7 dpi			14 dpi		
				Gall 1	Gall 2	Gall 3	Gall 1	Gall 2	Gall 3
Minc-miR-279	MIV1ctg644_r3	TGACTAGATCCACACTCAT	bmo-miR-279a	22,5	23,8	16,4	11,1	15,1	29,5
Minc-miRa	MIV1ctg221_r2	TGAAAGACATGGGTAGT	No	192,6	433,9	357,2	126,1	184,8	200,2
Minc-miRb	MIV1ctg1024_r1,MIV1ctg109_r3,MIV1ctg76_r3	TGGAATGTAAAGAAGTATG	No	0,0	155,7	100,4	9,5	7,8	2,4
Minc-miR-1	MIV1ctg1024_r1,MIV1ctg109_r3,MIV1ctg76_r3	TGGAATGTAAAGAAGTATG	cel-miR-1-3p	28,0	155,7	100,4	9,5	7,8	2,4
Minc-miR-50	MIV1ctg20_r2	TGATATGCTTGTATTCTGGGT	cel-miR50-5P	58,7	113,9	159,1	85,4	92,0	55,6
Minc-miR-79	MIV1ctg1678_r1,MIV1ctg221_r3	ATAAAGCTAGATTACCAGAGCT	cel-miR79	57,5	99,9	62,1	28,6	39,5	44,7
Minc-miRc	MIV1ctg1024_r1,MIV1ctg109_r3,MIV1ctg76_r3	GATGCAAAGAAGCACGTAG	No	2,0	5,2	4,9	2,2	2,2	0,8
Minc-miRd	MIV1ctg1024_r1,MIV1ctg109_r3,MIV1ctg76_r3	GATGCAAAGAAGCACGTAG	No	2,0	5,2	4,9	2,2	2,2	0,8

Résultats complémentaires à l'article 1 : Characterisation of microRNAs from Arabidopsis galls highlights a role for miR159 in the plant response to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*.

Suite à la soumission du papier « Characterisation of microRNAs from Arabidopsis galls highlights a role for miR159 in the plant response to the root-knot nematodes *Meloidogyne incognita* » dans le journal *New Phytologist*, l'éditeur a demandé trois points supplémentaires : 1/ fournir des informations sur l'expression des cibles des microARN différentiellement exprimés dans les galles à partir des analyses de transcriptome existantes, 2/ développer l'analyse des séquences de galles qui pourraient provenir du nématode et enfin 3/ compléter notre analyse de l'expression de *MYB33* par une analyse de PCR quantitative afin d'apporter des preuves d'une répression post-transcriptionnelle. J'ai répondu aux deux premiers points qui sont développés ci-dessous, le troisième est en cours d'analyse.

- **Quel est le profil d'expression des cibles des miARN différentiellement exprimés ?**

Chez *A. thaliana* les cibles des miARN ont été prédites bioinformatiquement et certaines cibles ont été validées biologiquement. Ainsi les profils d'expression dans les galles de 66 cibles des miARN différentiellement exprimés dans la galle, toutes validées biologiquement, ont été déterminés en se référant à l'analyse de transcriptome de galles à 7 et 14 dpi réalisée à l'aide de puces à ADN publiée par Jammes *et al.* (2005). Quatre cibles présentent des profils d'expression anticorrélés avec les miARN différentiellement exprimés dans les galles: (*TEOSINTE BRANCHED 1*, *CYCLOIDEA*, AND *PCF FAMILY*) *TCP10*, (*COPPER ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE 1*) *CSD1*, (*BLUE COPPER BINDING PROTEIN*) *BCBP* et (*PROTEASOME ALPHA SUBUNIT C1*) *PAC1* (Table 2). La régulation dans les galles de ces 4 gènes pourrait donc être due à une régulation post-transcriptionnelle due à l'action des miARN correspondant : miR398 et miR408 au cours de l'interaction *A. thaliana* – *M. incognita*.

- **Les lectures s'alignant sur le génome de *M. incognita*.**

La galle étant constituée d'un mélange de tissus de la plante et du nématode, le séquençage des petits ARN des galles a généré des séquences appartenant à la plante mais également au nématode. Le tableau 3 montre qu'entre 90% et 95% des lectures (ou « reads ») de la galle s'alignent sur le génome de la plante et qu'entre 3 et 10 % de ces « reads » de la galle s'alignent sur le génome de *M. incognita* (Table 3). Parmi les séquences s'alignant sur le génome de *M. incognita*, nous avons recherché les séquences s'alignant sur les positions correspondant aux miARN matures

précédemment prédits dans le génome de *M. incognita* (Abad *et al.* 2008). Nous avons ainsi pu mettre en évidence l'expression de huit miARN de *M. incognita* dans les nématodes aux stades parasites contenus dans les galles (Tableau 4).

Données complémentaires: “Differentially expressed small RNAs in Arabidopsis galls formed by *Meloidogyne javanica*: a functional role for miR390 and its TAS3-derived tasiRNAs”.

Au cours de ma thèse, une collaboration a été établie avec l'équipe de Carolina Escobar de l'Université de Tolède en Espagne. Ce groupe travaille sur les mécanismes moléculaires liés à la reprogrammation transcriptionnelle lors de l'interaction *A. thaliana* – *M. javanica*. Ils ont ainsi développé des travaux très similaires aux nôtres avec le séquençage de petits ARN de racines non infectées et de galles d'*A. thaliana* 3 jai par *M. javanica*. En ciblant une étape précoce d'initiation des cellules géantes, cette étude s'est révélée complémentaire à la nôtre et permet d'avoir une vue d'ensemble des miARN différentiellement régulés lors de la formation de la galle. Ils ont ainsi pu identifier 62 miARN différentiellement exprimés à 3 jai dont miR390 qui est surexprimé dans les galles. miR390 et ses cibles *ARF2*, *ARF3* et *ARF4* sont connus pour être impliqués dans la croissance des racines latérales (Hunter *et al.*, 2006; Marin *et al.*, 2010). Une étude approfondie de la fonction du module miR390/TAS3/ARF3 a été réalisée avec tout d'abord une analyse de type « gène rapporteur » qui montre que les profils d'expression des promoteurs des gènes *MIR390* et *TAS3* sont similaires dans les cellules géantes et les cellules voisines de la galle. La répression d'*ARF3* est médiée par les tasiARN car le signal GUS persiste à 3 dpi dans les galles de plantes portant la construction d'une cible *ARF3* résistante au clivage des tasiARN fusionnée au gène rapporteur GUS. Cette analyse gène rapporteur a été complétée par l'étude de la sensibilité des mutants KO *mir390* et *tas3* à l'infection par *M. incognita*. La diminution du nombre de galles de 23 et 40% respectivement par rapport aux plantes sauvages chez ces mutants indiquent un rôle important de ces gènes dans la réponse de la plante à l'infection (Cabrera *et al.*, 2016).

Afin de confirmer les données de séquençage que j'avais obtenu au cours de mon étude, j'ai réalisé l'analyse de l'activité du promoteur *pMIR390a* dans les galles et racines saines au cours d'une cinétique d'infection par *M. incognita*. J'ai pu montrer que, comme lors de l'interaction avec *M. javanica*, le promoteur de *MIR390a* est activé dans les galles induites par *M. incognita* 5 et 7 jai (Fig 38). Ce promoteur est également actif dans les apex racinaires des racines infectées et non infectées. J'ai également suivi l'expression du promoteur du gène *TAS*, ciblé par miR390, en montrant la présence de signal dans les galles d'*A. thaliana* induites par *M. incognita* à 5 et 7 jai (Fig 38). Mes résultats ont été intégrés à l'article de Cabrera *et al.* (2016) (présenté *in extenso* en annexe) et ont permis de montrer que le rôle de *MIR390a* dans l'interaction *A. thaliana* - *M. javanica* était conservé dans l'interaction avec d'autres espèces de *Meloidogyne*.

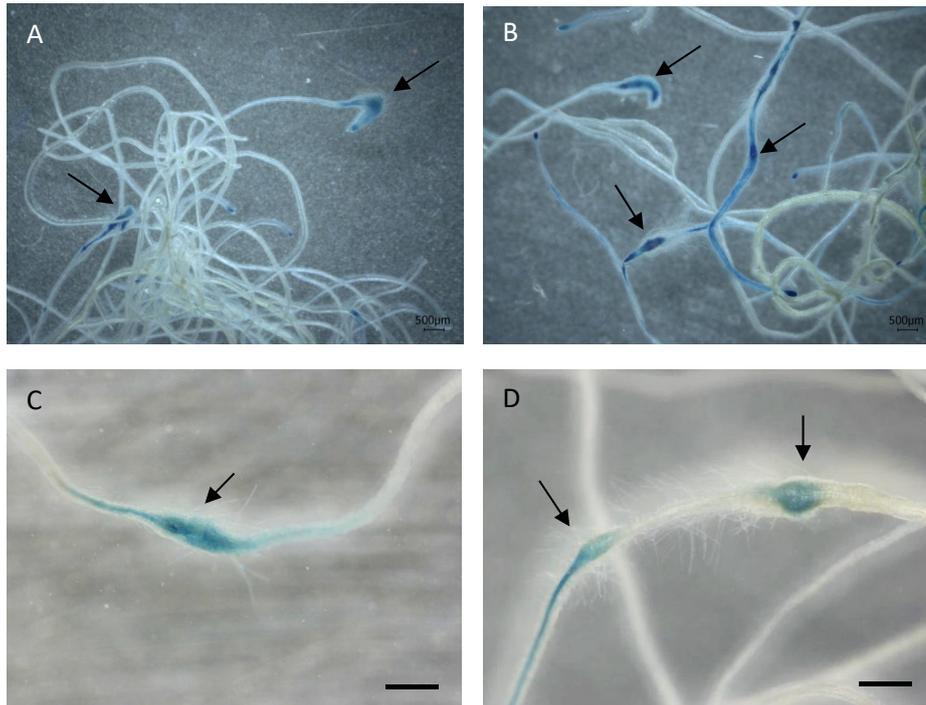


Figure 38: Profils d'expression de pMIR390::GUS et pTAS3a::GUS dans les galles d'*A. thaliana* induites par *M. incognita*.

- A. Galles pMIR390::GUS à 7 jai (Cabrera et al. 2016)
 - B. Galles pMIR390::GUS à 14 jai (Cabrera et al. 2016)
 - C. Galles pTAS3::GUS à 5 jai (non publié)
 - D. Galles pTAS3::GUS à 7 jai (non publié)
- Barre : 0,5 mm. Les flèches noires pointent les galles.

Article 2: “Differentially expressed small RNAs in Arabidopsis galls formed by *Meloidogyne javanica*: a functional role for miR390 and its TAS3-derived tasiRNAs”. *New Phytologist* (2016) 209: 1625–1640 doi: 10.1111/nph.13735.

Javier Cabrera, Marta Barcala, Alejandra Garcia, Ana Rio-Machin, Clémence Medina, Stéphanie Jaubert-Possamai, Bruno Favery, Alexis Maizel, Virginia Ruiz-Ferrer, Carmen Fenoll and Carolina Escobar.



Differentially expressed small RNAs in Arabidopsis galls formed by *Meloidogyne javanica*: a functional role for miR390 and its TAS3-derived tasiRNAs

Javier Cabrera¹, Marta Barcala¹, Alejandra García¹, Ana Rio-Machín², Clémence Medina³, Stéphanie Jaubert-Possamai³, Bruno Favery³, Alexis Maizel⁴, Virginia Ruiz-Ferrer⁵, Carmen Fenoll¹ and Carolina Escobar¹

¹Universidad de Castilla-La Mancha, Facultad de Ciencias Ambientales y Bioquímica, Avda. Carlos III, s/n 45071 Toledo, Spain; ²Molecular Cytogenetics Group, Human Cancer Genetics Programme, Centro Nacional Investigaciones Oncológicas (CNIO), C/Melchor Fernández Almagro, 3, 28029 Madrid, Spain; ³INRA, Université Nice Sophia Antipolis, CNRS, UMR 1355-7254 Institut Sophia Agrobiotech, 06900 Sophia Antipolis, France; ⁴Centre for Organismal Studies University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld, 230-69120 Heidelberg, Germany; ⁵Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Av. Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

Author for correspondence:
Carolina Escobar
Tel: +34925268800, ext. 5476
Email: carolina.escobar@uclm.es

Received: 10 August 2015
Accepted: 25 September 2015

New Phytologist (2016) 209: 1625–1640
doi: 10.1111/nph.13735

Key words: galls, giant cells, meloidogyne, miRNAs, rasiRNAs, silencing, small RNAs, tasiRNAs.

Summary

- Root-knot nematodes (RKNs) induce inside the vascular cylinder the giant cells (GCs) embedded in the galls. The distinctive gene repression in early-developing GCs could be facilitated by small RNAs (sRNA) such as miRNAs, and/or epigenetic mechanisms mediated by 24nt-sRNAs, rasiRNAs and 21–22nt-sRNAs. Therefore, the sRNA-population together with the role of the miR390/TAS3/ARF3 module were studied during early gall/GC formation.
- Three sRNA libraries from 3-d-post-inoculation (dpi) galls induced by *Meloidogyne javanica* in *Arabidopsis* and three from uninfected root segments were sequenced following Illumina-Solexa technology. *pMIR390a::GUS* and *pTAS3::GUS* lines were assayed for nematode-dependent promoter activation. A sensor line indicative of TAS3-derived tasiRNAs binding to the *ARF3* sequence (*pARF3:ARF3-GUS*) together with a tasiRNA-resistant *ARF3* line (*pARF3:ARF3m-GUS*) were used for functional analysis.
- The sRNA population showed significant differences between galls and controls, with high validation rate and correspondence with their target expression: 21-nt sRNAs corresponding mainly to miRNAs were downregulated, whilst 24-nt-sRNAs from the rasiRNA family were mostly upregulated in galls. The promoters of *MIR390a* and *TAS3*, active in galls, and the *pARF3:ARF3-GUS* line, indicated a role of TAS3-derived-tasiRNAs in galls.
- The regulatory module miR390/TAS3 is necessary for proper gall formation possibly through auxin-responsive factors, and the abundance of 24-nt sRNAs (mostly rasiRNAs) constitutes a gall hallmark.

Introduction

Regulatory small RNAs (sRNAs) are a group of short noncoding RNAs (20–24 nucleotides (nt) long) with diverse roles in gene silencing at the transcriptional and post-transcriptional levels. *Arabidopsis* sRNAs are dominated by short-interfering RNAs (siRNAs) and by microRNAs (miRNAs; Axtell, 2013; Bologna & Voinnet, 2014). Among the endogenous *Arabidopsis* siRNAs there are different sRNAs groups such as trans-acting short-interfering RNAs (ta-siRNAs) and repeat-associated small interfering RNAs (rasiRNAs). Ta-siRNAs are produced through miRNA-guided cleavage of noncoding primary transcripts that are then converted into dsRNA by RDR6, whereas rasiRNAs are generated mostly from transposon loci and DNA repeats. AGO1/7- ta-siRNA complexes mediate the cleavage of mRNA from coding genes, whereas AGO4/6- rasiRNA complexes guide

cytosine methylation in DNA, a landmark of RNA-directed DNA methylation (PolIV-RdDM). Recently, a genetic RdDM pathway was uncovered in *Arabidopsis*. It utilizes 21–22-nt siRNAs as well as 24-nt siRNAs, and methylates ta-siRNAs (Wu *et al.*, 2012; Kanno *et al.*, 2013) and active transposable elements (TEs) by the combined activities of RDR6, DCL2, DCL4 and AGO1 (Nuthikattu *et al.*, 2013). These 21–22-nt siRNAs guide AGO6 to its chromatin targets to establish TE expression-dependent DNA methylation (Wu *et al.*, 2012). Hence, a core of different Dicer-like proteins (DCLs), RNA-dependent RNA polymerases (RDRs) and Argonaute proteins (AGOs) participate in the biogenesis and action of miRNAs, tasiRNAs and rasiRNAs (Axtell, 2013; Bologna & Voinnet, 2014).

In recent years, next-generation sequencing has made clear the importance of sRNA regulation in different abiotic and biotic plant stresses (Sunkar *et al.*, 2012; Balmer & Mauch-

Chapitre 2 :
Caractérisation des siARN d'*A. thaliana*
dans les galles induites par *M. incognita*

Chapitre 2 : Caractérisation des siARN d'*A. thaliana* dans les galles induites par *M. incognita*.

Le premier chapitre a permis de caractériser la population de miARN variant lors de la formation des galles d'*A. thaliana* induites par *M. incognita*. Néanmoins la famille des petits ARN comprend une deuxième grande sous famille : les siARN. Ce deuxième chapitre s'articule donc autour de la caractérisation de ces siARN dans les galles d'*A. thaliana* induites par *M. incognita* à 7 et 14 jai. A la différence des miARN, il est impossible de prédire quels *loci* sont susceptibles de produire des siARN. Ainsi une approche à l'échelle du génome a été développée ici avec l'utilisation du programme Shortstack (Axtell, 2013b; Shahid & Axtell, 2014) et a permis l'identification de « clusters », définis ici comme des régions du génome qui correspondent à des zones d'accumulation des petits ARN, dans les banques de galles 7 et 14 jai et de racines non infectées correspondantes. Plusieurs filtres ont ensuite été appliqués afin de générer une liste robuste de ces régions dans les galles et les racines. A partir de cette liste, un comptage des lectures (« reads ») a été effectué ainsi qu'une analyse statistique identifiant les « clusters » accumulant différemment les petits ARN entre les conditions « galles » et « racines non infectées ». Au total entre 68 000 et 80 000 clusters environ ont été identifiés dans les galles à 7 et 14 jai respectivement et entre 26 000 et 40 000 clusters détectés dans les racines à 7 et 14 jai respectivement. Il est intéressant de noter que les séquences de 23-24 nt sont surreprésentées dans toutes les banques. Afin d'identifier les gènes dont l'expression pourrait être régulée par les siARN, j'ai étudié si ces clusters différemment exprimés étaient localisés sur des gènes ou dans la région promotrice de ces gènes. Les profils d'expression de ces gènes ont été analysés grâce aux données transcriptomiques de puces à ADN des galles d'*A. thaliana* à 7 et 14 jai obtenues antérieurement au laboratoire. Il a ainsi été possible d'identifier des gènes dont l'expression est anti-corrélée avec celle du cluster qui le « cible » ou qui « cible » sa région promotrice.

La régulation des éléments transposables par la méthylation de l'ADN induite par les petits ARN, ou RdDM, pouvant impacter l'expression des gènes en aval lors d'un stress (Yu *et al.*, 2013a; Matzke & Mosher, 2014), j'ai recherché et identifié les clusters localisées sur des éléments transposables situés en amont de gènes. Enfin une analyse détaillée de certaines familles, comme les nat-siARN, a été réalisée en recherchant des clusters localisés sur les gènes connus chez *A. thaliana* comme générateurs de nat-siARN.

Une étude comparative a également été réalisée avec celle de Yu *et al.* (2013) afin d'identifier des gènes communs de réponse de la PTI. Les gènes ciblés par des clusters différemment exprimés et

dont l'expression est anti-corrélée dans notre étude ont ainsi été comparés aux gènes induits en réponse à la flagelline flg22 et ciblés dans leur région promotrice par des petits ARN. De manière intéressante 11 gènes communs ont été identifiés comme surexprimés en réponse à la flg22 mais réprimés dans les galles. Ce résultat suggère que la réponse de type PTI qui entraîne la dé-répression de certains gènes via la régulation des petits ARN pourrait être altérée lors de l'infection par les nématodes.

Cette étude a ainsi permis d'avoir d'une part une vision globale des modifications de la population des petits ARN de type siARN dans les galles d'*A. thaliana* induites par *M. incognita* et d'autre part d'identifier une liste de gènes dont l'expression varie dans les galles induites par les nématodes à galles probablement suite à l'activité régulatrice des petits ARN. L'ensemble de ces résultats est présenté dans l'article suivant encore en préparation et qui sera soumis prochainement à une revue internationale à comité de lecture, après rédaction de la partie discussion.

Article 2: Characterisation of siRNAs from Arabidopsis galls induced by the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*.

Clémence Medina, Martine da Rocha, Marc Magliano, Alizée Ratpopoulo, Nathalie Marteu, Kevin Lebrigand, Pierre Abad, Bruno Favery & Stéphanie Jaubert-Possamai.

J'ai contribué à cet article en participant à la collecte du matériel nécessaire au séquençage et en réalisant les analyses bio-informatiques permettant l'identification des siARN exprimés dans les galles et les racines saines ainsi que l'identification des clusters de siARN différenciellement exprimés entre les deux conditions. J'ai également contribué à la rédaction de cet article.

Characterisation of siRNAs from *Arabidopsis* galls induced by the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*.

Clémence Medina¹, Martine da Rocha¹, Marc Magliano¹, Alizée Ratpopoulo¹, Nathalie Marteu¹, Kevin Lebrigand², Pierre Abad¹, Bruno Favery¹ & Stéphanie Jaubert-Possamai^{1*}

¹ INRA, Université Côte d'Azur, CNRS, ISA, France

² UCA Genomix, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR6097, Sophia Antipolis, France

* Corresponding author: stephanie.jaubert@inra.fr ; +33(0)492386504

Word Count. 5,689

Introduction: 1,900 words

Materials and Methods: 897 words

Results: 2,777 words

Discussion: under construction

Acknowledgements: 115 words

Number of Figures: 3

Number of Tables: 6

Supporting information: 4 figures and 6 tables.

INTRODUCTION

Small RNAs (sRNA) are 20 to 24 nucleotides non-coding RNA that regulate gene expression at the transcriptional and post transcriptional level in eukaryotes. Plant small RNAs are classified into two predominant classes, according to their biogenesis: microRNAs (miRNAs) and small interfering RNAs (siRNAs) (Axtell, 2013a; Borges & Martienssen, 2015). MiRNAs are 21-22 nt long that are produced from one strand RNA precursor folded in a hairpin structure. In plants, miRNAs are well characterized, they induce post-transcriptional gene silencing (PTGS) mainly by inducing degradation of messenger RNA (mRNA) but they can also induce translational repression (Rogers & Chen, 2013). SiRNA are 21-24 nt long that are produced from dsRNA precursors resulting from (i) hybridization of two distinct and complementary RNA strands or (ii) from the neosynthesis from a single stranded RNA of a new complementary strand by RNA-dependent RNA polymerases (RDR) (Brodersen & Voinnet, 2006; Bologna & Voinnet, 2014). siRNAs mediate gene repression either at the transcriptional or at the post-transcriptional level and can be subdivided into several categories with different predominant sizes (Borges & Martienssen, 2015). Transcriptional Gene Silencing (TGS) is composed of two phases with different specific actors. The pre-establishment phase involves DNA-dependent RNA polymerase (Pol) II aberrant transcripts, RDR6 to produce dsRNAs that are processed by Dicer-Like Protein 2 (DCL2) and DCL4 to produce 21-22 nt easiRNAs that induce DNA methylation by DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE (DRM) 2 and probably DRM1 through AGO6-RISC complex and PolIV transcripts (Matzke *et al.*, 2009; Deleris *et al.*, 2016). After establishment of RNA-directed DNA methylation (RdDM) the stabilization phase involves single strand RNA transcripts produced by PolIV from intergenic or repetitive regions of the genome that are double stranded by RDR2 and processed by DCL3 to produce 24 nt heterochromatic siRNAs (hc-siRNAs). Hc-siRNAs are loaded into AGO4-RISC to initiate RdDM through DRM2 and probably DRM1 proteins at the hc-siRNA-generating loci, using other transcripts produced by the DNA-dependent Pol V (Deleris *et al.*, 2016). One of the main functions of RdDM is to maintain genome integrity, by maintenance of suppressive levels and types of DNA methylation on transposable elements. RdDM may also affect expression of neighboring protein-coding genes through spreading of DNA methylation (Vaistij *et al.*, 2002; Daxinger *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2011; Downen *et al.*, 2012). SiRNAs are also involved in PTGS. They are loaded into AGO1 or AGO2-RISC and induce mainly either cleavage or translational suppression of target transcripts. PTGS inducing siRNAs are subdivided into several sub-families according to their precursor's origin. Natural anti-sense siRNAs (nat-siRNAs) are processed from dsRNA precursors derived from endogenous RNA that share complementary sequences, through the action of DCL4 or DCL2, producing respectively 21 and 22 nt siRNA. Phased, secondary, small interfering RNAs (phasiRNAs) are predominantly 21nt siRNAs that derived from an RNA converted to dsRNA by RDR6 and processed by DCL4, exemplified by the category of *Arabidopsis trans*-acting siRNAs (tasiRNAs) (Vazquez *et al.*, 2004; Fei *et al.*, 2013).

Production of phasiRNA double stranded precursors is stimulated by one or more upstream miRNAs, like the *TAS3*-derived tasiRNAs in *Arabidopsis thaliana* that are generated from non-coding *TAS3* transcripts by miR390 triggers (Peragine *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2005).

In plants, siRNAs were shown to regulate gene expression in various biological processes like growth, development (Peragine *et al.*, 2004; Rubio-Somoza & Weigel, 2011), cell differentiation (Knauer *et al.*, 2013), and in plant response to abiotic and biotic stress (Vaucheret, 2006; Padmanabhan *et al.*, 2009; Khraiwesh *et al.*, 2012; Matzke & Mosher, 2014). Various PTGS inducing siRNAs (21-22nt) are related to plant immunity such as the nat-siRNA nat-siRNAATGB2 from *Arabidopsis thaliana* that is induced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) DC3000 and play positive role in disease resistance by repressing the gene pentatricopeptide repeats protein-like (PPRL). Moreover, the largest gene family in plants known to be regulated by miRNAs that trigger secondary siRNAs, is the nucleotide-binding leucine-rich repeat (NB-LRR) gene family (Fei *et al.*, 2013, 2015), phasiRNAs produced from NBS-LRRs play a main role in regulating plant immunity. For example in *Arabidopsis*, miR472 and its RDR6-mediated gene silencing help to modulate both PTI and ETI (Boccaro *et al.*, 2014). TGS mediating hc-siRNAs emerged also as major regulators of plant immunity by guiding DNA methylation and/or histone modification. The function of hc-siRNA-mediated TGS in plant immunity has also come to light as fungal elicitors induce alterations in the accumulation of certain hc-siRNAs (Downen *et al.*, 2012). Moreover, RdDM machinery was shown as involved in plate response to several pathogen i.e. *B. cinerea*, *P. syringae*, *A. tumefaciens* (López *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2013a; Gohlke *et al.*, 2013).

Root-knot nematodes (RKN) *Meloidogyne* spp. are highly polyphagous sedentary plant parasites capable of infesting most crop species (Blok *et al.*, 2008; Abad & Williamson, 2010). After penetrating host roots, RKN larvae migrate toward the vascular cylinder and reprogram gene expression in several vascular root cells, to induce their development into hypertrophied multinucleate giant feeding cells (GCs) (Favery *et al.*, 2016). These GCs are metabolically overactive, and serve as the sole source of the nutrients required for RKN development. The growth of the GCs and divisions of the surrounding cells lead to a root deformation known as a knot or gall. The redifferentiation of vascular cells into GCs results from the extensive reprogramming of gene expression in root cells, in response to RKN signals (Escobar & Fenoll, 2015). The expression of genes encoding proteins involved in metabolism, the cytoskeleton, cell cycle, cell rescue, defence, hormones, cellular communication and cellular transport are modified in galls and giant cells from various plant species (Jammes *et al.*, 2005; Barcala *et al.*, 2010; Damiani *et al.*, 2012; Kyndt *et al.*, 2012; Favery *et al.*, 2016). We started to decipher the genetic pathways that are modified in infected roots, leading to the formation of GCs, but little is known about the regulators of this reprogramming of gene expression.

sRNAs open a new field of investigation in the study of molecular mechanisms involved in the plant response to parasitic nematode. Most of the studies about the role of sRNAs in plant-nematode interaction were focused on microRNAs that compose the best functionally characterized sRNAs category. The first studies about miRNAs and plant response to nematodes were developed in the frame of plant response to cyst nematodes (CN). Cyst nematodes are another subgroup of sedentary parasitic nematodes that induce a multinucleate feeding structure, the syncytium, in plant roots. GCs and syncytia differ in terms of their biogenesis, with the syncytium resulting from the induction of an initial syncytial cell within the root parenchyma that then integrates several hundred of the surrounding cells through cell wall dissolution (Sobczak & Golinowski, 2008). Sequencing approaches identified 30 miRNAs in *A. thaliana* and 40 miRNAs in soybean that are differentially expressed in response to CN infection (Hewezi *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012). Comparison of two soybean sister lines resistant and susceptible to SCN identified 7 miRNAs that are differentially expressed in response to SCN infection (Xu *et al.* 2014). Functional analyses then revealed key roles for two of these miRNAs, miR396 and miR827, in the reprogramming of root cells to form syncytial cells and the suppression of plant defences respectively, in *A. thaliana* (Hewezi *et al.* 2012; 2012; Hewezi *et al.*, 2016). Transcriptome analysis on tomato roots infected by CN revealed that 11 genes belonging to NB-LRR and receptor-like kinase families have opposite expressions patterns by miRNA (Świącicka *et al.*, 2017). The expression profile of miRNAs during RKN infection has been investigated more recently. Zhao *et al.*, 2015 described the expression profiles of five miRNA genes in tomato (*MIR156*, *MIR159*, *MIR172*, *MIR319* and *MIR396*) during the systemic response to RKN infection and provided evidence for very early regulation of miR319b and its target, TCP4, in the root, within the first 24 h. In *Arabidopsis*, two sequencing approaches identified 62 and 24 miRNAs as differentially expressed between the uninfected roots and root galls induced by *M. javanica* and *M. incognita* respectively at various keys step of galls formations (Cabrera *et al.*, 2016)(Medina *et al.* submitted). Furthermore, functional analyses highlighted a role for the miR390/TAS3 regulatory module (Cabrera *et al.*, 2016) and miR159 family (Medina *et al.* submitted) in plant responses to RKN.

So far, siRNAs were poorly investigated during the role of plant-nematode interaction. Function of siRNAs in plant-nematode interaction was first highlighted by a trend of reduced infection rate by CN *Heterodera schachtii* in *A thaliana* mutants: *rdr1*, *rdr6* and *dcl2*, *dcl3*, *dcl4* but they are not significant except for *dcl2-1* (Hewezi *et al.*, 2008). Several sequencing approaches were then developed in *Arabidopsis* and soybean to identify sRNAs expressed in plant during infection by CN (Hewezi *et al.* 2008; Li *et al.* 2012; Xu *et al.* 2014) however most of the analyses were focused on microRNAs. The unique analysis of plant siRNAs expressed in response to CN identified 125 putative *Arabidopsis* siRNAs expressed in roots after infection with the CN *Heterodera schachtii* although functional analyses are still needed to validate these siRNAs and their function plant CN interaction. A recent

study explored the *A. thaliana* syncytia methylome and population of 24 nt siRNA associated and showed that the abundance of 24-nt siRNAs was associated with hypermethylation of TEs and gene promoters (Hewezi *et al.*, 2017). A first global description of siRNA populations expressed in *Arabidopsis* early developing galls induced by the RKN *Meloidogyne javanica* was recently realised (Cabrera *et al.*, 2016). The length distribution overview showed a marked increase in the number of 24-nt reads in galls compared to control roots with most of these 24 nt sRNAs being gall-exclusive or upregulated in galls. Moreover, Cabrera *et al.* provided the only functional evidence of the involvement of a siRNAs in the plant response to nematodes. They established a role for miR390 and the secondary siRNA *TAS3* derived siRNA in gall formation. Altogether, these analyses suggest that plant parasitic nematodes use microRNA but also siRNA pathway to manipulate host gene expression at transcriptional and/or post – transcriptional level.

A sequencing small RNA strategy was previously developed to identify miRNAs DE in *Arabidopsis* galls induced by *M. incognita* (Medina *et al.* submitted to New Phytologist) to characterize siRNA populations expressed in galls at two key points during giant cell/gall development: 7 dpi, corresponding to the phase of successive nuclear divisions without cytokinesis; and 14 dpi, corresponding to an increase of DNA levels through endoreduplication without nuclear divisions (de Almeida Engler & Gheysen, 2013). In this study we focused our analysis on genomic regions, called clusters, corresponding to accumulations of siRNAs that are differentially expressed in gall versus root. This analysis offers an overview of loci targeted by siRNA during the plant-nematode interaction (coding gene, promoting regions, transposable elements). In a second time, genes differentially expressed in microarrays (Jammes *et al.*, 2005) and covered by differentially expressed clusters with anti-correlated expression profiles were identified. These anti-correlated expression profiles are biological support for a regulation of these genes by siRNA pathways. Thus, we identified genes that are potentially regulated by siRNAs in galls and may have a role in *A. thaliana* – *M. incognita* interactions. Among these genes, we identified 10 genes known to be associated to PTI defences and induced by flg22 treatment (Yu *et al.*, 2013a) that are all repressed in galls and targeted by siRNAs in their promoting regions. This result suggests that RKN may repress some genes related to PTI putatively by TGS pathway to complete its life cycle within the root.

MATERIAL AND METHODS

Biological material, growth conditions and nematode inoculation

Seeds of *A. thaliana* (ecotype Wassilewskija) were surface-sterilised and sown on Murashige & Skoog (Duchefa) medium agar plates (0.5 x MS, 1% sucrose, 0.8% agar, pH 6.4). Plates were kept at 4°C for two days, and then transferred to a growth chamber (20°C with 8 h light and 16 h darkness). *M. incognita* strain “Morelos” was multiplied on tomato plants in a growth chamber (25°C, 16 h light and 8 h darkness). For in vitro nematode infection, J2 larvae were surface-sterilised with HgCl₂ (0.01%) and streptomycin (0.7%) as described elsewhere (Caillaud & Favery, 2016). We inoculated 25-day-old seedlings grown in vitro individually with 200 sterilised J2s each, resuspended in Phytigel. Seven and 14 dpi, galls were dissected from the infected roots by hand. We also dissected internodes from uninfected roots (without apical and lateral root meristems) at the same time points than infected roots for use as a negative control. Samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Three independent biological replicates were established for each set of conditions.

Infection assays

Susceptibility to RKN of various mutants of the siRNA machinery *rdr6-15*, *rdr2-1*, *ago4-1T*, *dcl2-1/dcl3-1/dcl4-2*, *drm1drm2cmt3*, *drm1drm2* was estimated by infection assays in soil. For infection assays, 20 to 29 *A. thaliana* plants for each line (mutants and wild-type) were grown in a mixture of 50% sand and 50% soil, in a growth chamber. We inoculated each plant with 200 *M. incognita* J2s 21 days after germination. Six weeks after infection, the roots were collected. Stained roots were weighed and galls and egg masses were counted for each root under a binocular microscope. Mann and Whitney tests ($\alpha=5\%$) were performed to determine the significance of the differences in the numbers of egg masses and galls per root observed between mutants and the wild type. Origin of the different mutants of the siRNA machinery is listed in Table S1.

Construction and sequencing of small RNA libraries

Total RNA, including small RNAs (less than 200 nt long), was isolated from galls or uninfected roots at 7 and 14 dpi. Approximately 150 galls or internode fragments from uninfected roots were independently ground into powder in liquid nitrogen, with a mortar. Total RNA was extracted from these samples with the miRNeasy Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer’s instructions, with three additional washes in RPE buffer. The quality and integrity of the RNA were assessed with a Bioanalyzer (Agilent). Small RNA libraries were generated by ligation, reverse transcription and amplification (11 cycles) from total RNA (2 μ g), with the reagents of the NEBNext Small RNA Library Prep Set for SOLiD. Libraries were then quantified with the Bioanalyzer High Sensitivity DNA Kit (Agilent) and sequenced on a SOLiD 5500 wildfire sequencer (Life Technologies) at the

Nice-Sophia Antipolis functional genomics platform (France Génomique, IPMC, Sophia Antipolis, France).

Bioinformatic miRNA analysis

For each library, adapters were trimmed and reads matching ribosomal RNA, mitochondrial RNA and repeat sequences were removed by performing Blast analyses with the sequences listed in the Rfam database (Nawrocki *et al.*, 2015). The Bowtie aligner was then used to align the trimmed reads (Langmead *et al.*, 2009) on a virtual concatenated genome generated from the *A. thaliana* genome (TAIR10.21) and the *M. incognita* genome (Abad *et al.*, 2008). Each read was attributed to the *A. thaliana* and/or *M. incognita* genome on the basis of the best alignment obtained (2 colour mismatches allowed). Reads with identical best alignment hits for the two genomes were attributed to both the nematode and the plant. If one read aligned to multiple genomic locations, a single read was attributed to each locus.

Low-quality mapped reads were removed (more than four colour mismatches, zero sequence mismatches and zero unknown nucleotides “N”), and reads corresponding to molecules of between 20 and 24 nt in size were retained for further analysis. Reads mapping on sequences corresponding to snRNA, snoRNA, mitRNA, tRNA, miRNA and pre-miRNA were removed in order to keep only siRNAs. Genomic loci accumulating siRNAs were predicted by using the Shortstack version 3.3 algorithm (Axtell, 2013b; Shahid & Axtell, 2014). Shortstack was run on each library separately with default parameters except: nohp mode (no miRNA research) and zero mismatches allowed. Shortstack software version 3.3 mapped trimmed and cleaned reads on a virtual concatenated genome composed by *A. thaliana* genome completed with plastidial and mitochondrial genomes (TAIR10.21) and *M. incognita* genome (Abad *et al.*, 2008). From alignments, Shortstack identified a list of coordinates of loci accumulating siRNA. Bedtools (Quinlan and Hall, 2010) with Multi-intersectbed -i option was used to find shared clusters in the different libraries and then the output was filtered so that only regions that were present in at least 2 (out of 3) libraries for at least one condition either gall or uninfected root were used to serve as the final reference small RNA locus boundaries. Close clusters with a maximum distance of two nucleotides were merged with bedtools option Merge. ShortStack-count mode under default settings was then used to find relative small RNA abundance on this reference list of each library. Reads mapped on multiple loci were counted on each locus. Counts for siRNA accumulating loci from each replicate were used for differential expression analysis with the R package DESeq. Loci accumulating differentially siRNAs between galls and uninfected roots at a 5% false discovery rate (adjusted pvalue<0,05 ; Benjamini Hochberg adjustment) were retrieved.

Table 1: Characteristics of clusters predicted by Shortstack 3.3 in gall and root libraries at 7 and 14 dpi.

	7 dpi						14 dpi					
	G1	G2	G3	R1	R2	R3	G1	G2	G3	R1	R2	R3
1 Raw reads	41 702 172	52 143 654	52 216 997	45 954 079	53 003 739	41 007 548	31 939 768	70 707 739	40 165 093	34 439 251	49 242 596	53 911 657
2 Reads mapped	5 758 927	7 682 549	6 212 381	6 538 559	7 139 922	4 599 730	4 540 110	9 485 243	5 368 537	4 133 039	4 849 400	6 375 315
3 Reads mapped on clusters	5 239 834	7 031 508	5 675 945	6 270 013	6 846 909	4 322 500	4 037 416	8 971 387	4 811 839	3 897 685	4 548 226	6 018 480
4 Reads mapped on clusters with DicerCall	3 210 225	3 167 311	3 668 500	3 308 355	3 127 378	1 512 758	2 249 715	6 459 892	3 070 136	1 184 201	1 310 761	678 080
5 Total clusters numbers	68 009	77 509	101 511	38 076	40 049	35 470	74 244	123 147	73 552	26 222	31 682	33 070
6 Total clusters numbers with DicerCall	55 683	60 605	86 602	28 845	29 049	23 561	57 327	100 569	59 773	17 550	20 088	14 497
7 Percentage of clusters with DicerCall/total	82	78	85	76	73	66	77	82	81	67	63	44
8 Cluster mean size (nt)	368	345	351	257	267	216	313	390	317	199	216	192
9 Mean of reads abundance on clusters	58	52	43	115	108	64	39	64	51	67	65	47
10 Mean of ratio of reads abundance/total number clusters	1 035	862	492	3 976	3 706	2 725	685	639	859	3 845	3 248	3 226

Raw reads (1) have been mapped on concatenated genome of *A. thaliana* and *M. incognita* genome (1). Shorstack software has identified genomic regions associated with siRNA accumulation on *A.thaliana* genome called clusters, number of reads associated with clusters are presented in (3). Some of these reads are associated with clusters having a Dicer Call (a DicerCall is defined when more than 80% of reads on the cluster have a size between 20 and 24 nt) (4). The number of clusters identified by Shortstack is presented in (5) some of these clusters have a DicerCall (6 and 7). Cluster mean size (8), mean of reads abundance on clusters (9) and mean of ratio of reads abundance / total number clusters (10) have been calculated from the DicerCall clusters. All these informations have been calculated for each library at 7 and 14 dpi.

RESULTS

Identification of predicted siRNA clusters in galls and uninfected roots

We sequenced small RNAs expressed in uninfected root inter-nodes and in galls 7 and 14 days post-infection (dpi) by the RKN *M. incognita*. Twelve small RNA libraries corresponding to three independent replicates of galls at 7 and 14 dpi and the corresponding uninfected roots were sequenced. Between 31 and 70 millions of reads were obtained for gall and roots libraries at 7 and 14 dpi (Table 1). In order to build a reference set of small RNA clusters, we annotated potential small RNA clusters by using Shortstack (Axtell, 2013b) for each of the 12 library. More sRNA clusters were predicted in galls than in uninfected roots with between 68 000 to 80 000 clusters predicted in galls libraries at 7 and 14 dpi whereas between 26 000 to 40 000 clusters were detected in root libraries at 7 and 14 dpi (Table 1). The majority of these siRNA clusters aligned with the *A. thaliana* nuclear genome and only a weak number of clusters aligned to the mitochondrial genome (0,3 and 0,8%) and plastidial genomes (0,2 and 0,8%). siRNAs result of the processing by Dicer of a long dsRNA precursor (Meister & Tuschl, 2004). A DicerCall (DC) score is attributed by Shortstack to every cluster if the majority of the reads mapped to this cluster display a size between 20-24 nt that is typical of the Dicer processing. The DC value of 21, 22, 23 or 24 nt corresponds to the main size of the reads mapped on this cluster. As previously described (Coruh *et al.*, 2015) a DicerCall cutoff of 0.8 (meaning that at least 80% of the reads are between 20 and 24 nt) was used to discriminate between non-DCL derived and DCL-derived loci to exclude all the small RNAs that correspond to degradation products of long RNAs (mRNAs, rRNAs, tRNAs). In galls at 7 and 14 dpi, between 77 and 85 % of the clusters have DC at 7 and 14 dpi while in root between 44 and 76% of the clusters display a DC (Table 1). Only the clusters with a DC, named DC-cluster, were considered as predicted siRNA clusters and were kept for further analysis. In all libraries, a large majority (between 94 and 97%) of these DC-clusters display a DC of 23 or 24 nt (Fig.1). As previously described by Coruh *et al.* 2015, we split the predicted siRNA DC-clusters into two categories: the 20-21-22 nt DC-clusters and the 23-24 nt DC-clusters. Comparison of the number of predicted siRNA DC-clusters from galls and roots highlight an over-representation of these clusters in galls at with an average number of DC-clusters of 67 630 and 72 556 in galls at 7 and 14 dpi respectively while the average number of DC-cluster in roots was 27 151 and 17 378 (Table 1). The clear difference in the number of predicted DC-clusters between galls and roots is not due to fragmentation in galls since predicted DC-clusters in roots are a bit smaller with an average size of 247 and 202 nt in roots at 7 and 14 dpi respectively while the average size of predicted DC-clusters in galls is 355 and 340 nt in galls at 7 and 14 dpi respectively (Table 1). Coverage of these clusters in galls and roots was highly different at 7 dpi with an average coverage of 51 and 96 reads per cluster in galls and roots respectively, while at 14 dpi no such strong difference is observed with an average coverage of 52 and 60 reads per cluster in galls and roots respectively. Moreover, comparison of the normalized number of reads on DC-clusters within galls and uninfected roots (Fig.2) showed that galls display

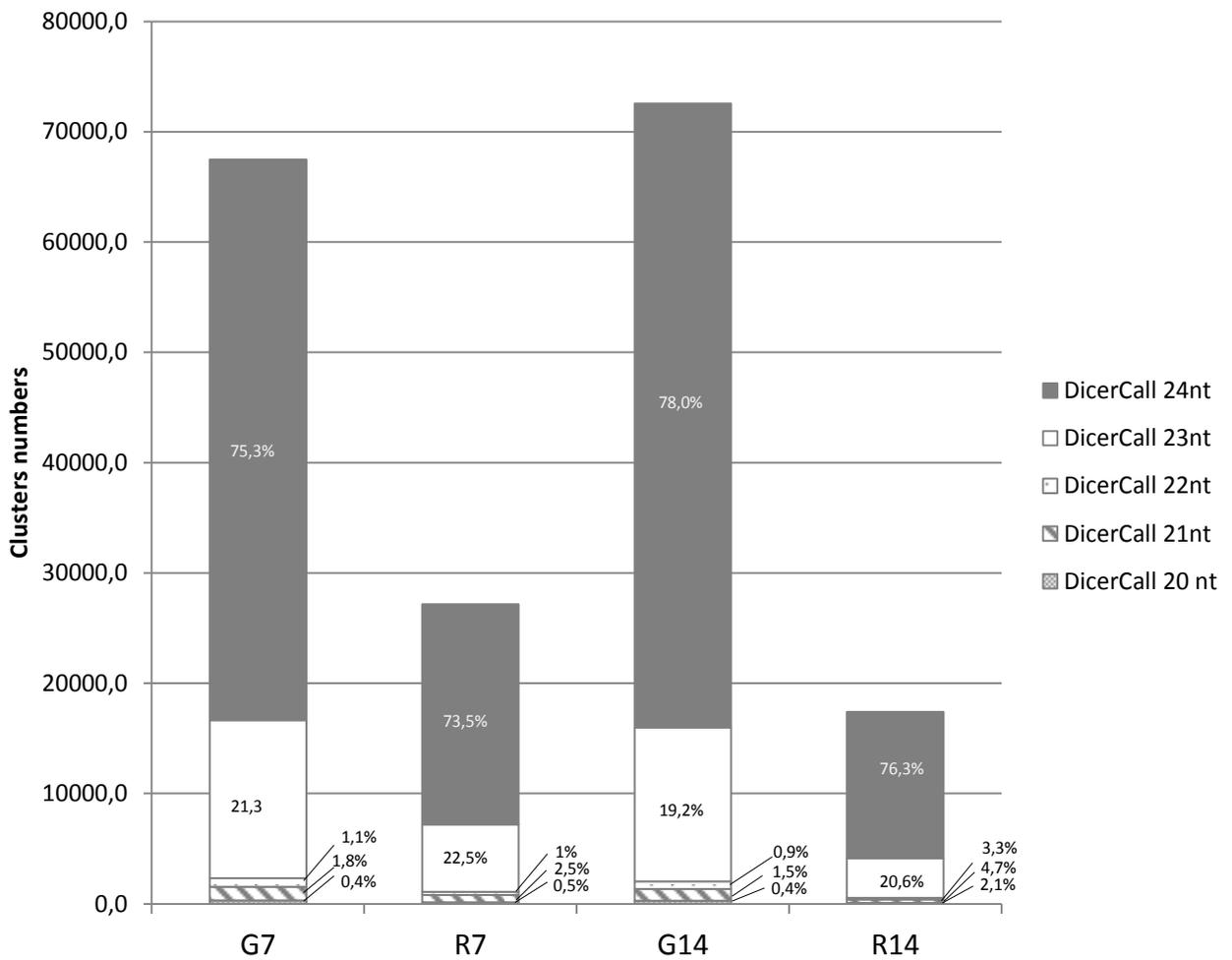


Fig. 1: Number of clusters having a predominant size (Dicer call) of 20,21,22,23,24 nt in gall (G7, G14) and uninfected root (R7, R14) at 7 and 14 dpi. Percentages represent proportions of clusters with a predominant size in one sRNA libraries.

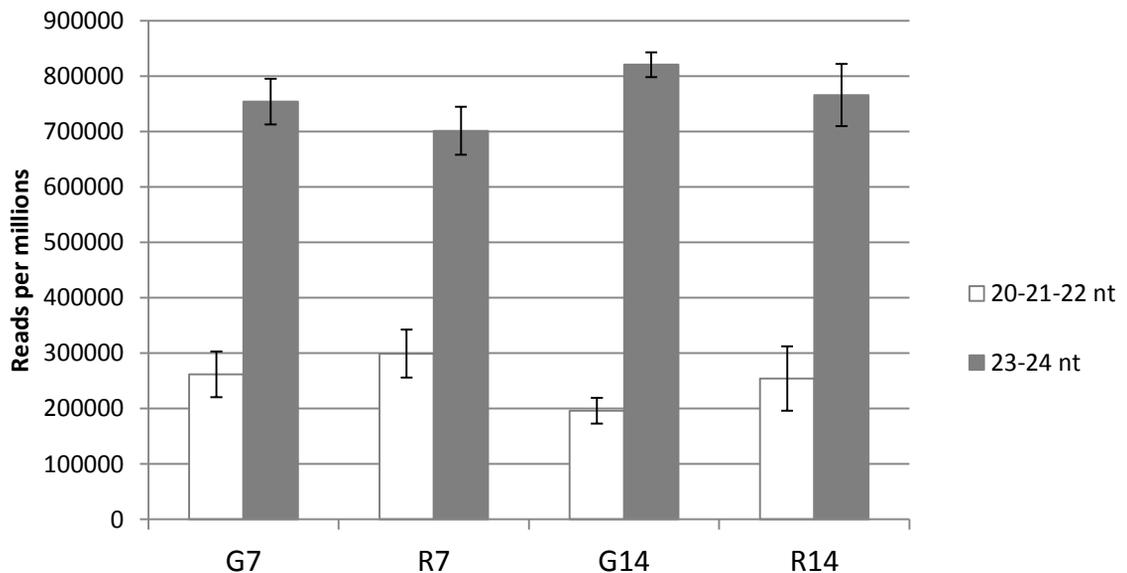


Fig. 2: Number of reads per millions of 20, 21, 22 nt and 23, 24 nt on clusters with DicerCall in gall and root libraries at 7 and 14 dpi.

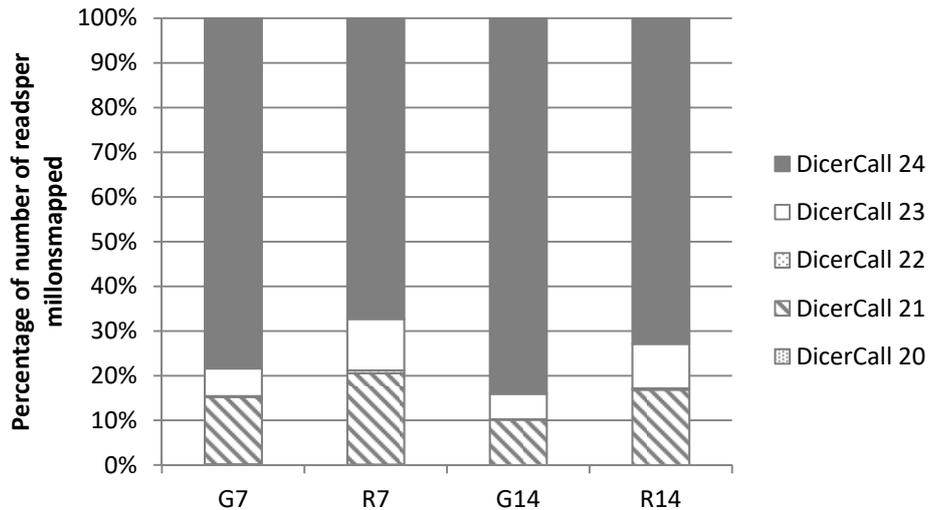


Fig. 3: Average normalized number of reads (in reads per millions mapped) within DicerCall clusters in gall and root at 7 and 14 dpi.

The percentage of number of reads corresponding to DicerCall clusters has been calculated from the average of the three replicates

Table 2: Number of clusters from reference list accumulating siRNAs in each library

Clusters with DicerCall	7 dpi	% cluster total	14 dpi	% cluster total
All libraries	86264	100	92578	100
G1	63642	80,3	65719	77,2
G2	63705	78,8	73948	81,6
G3	68609	82,9	66747	78,3
R1	32024	67,5	24022	57,0
R2	32623	66,6	25671	55,5
R3	28087	62,8	21025	46,5

Table 3: Cluster localization

	7 dpi	14 dpi
In gene		
clusters	34 809	39 593
genes	20 595	22 602
Out gene		
clusters	23563	23 354
In TE		
clusters	10 588	10 050
TE	2785	2731
In TE upstream gene		
clusters	681	711

Number of clusters from reference list were located within protein coding genes, out of genes, within transposable elements (TE) and within TE and located in the 2kb upstream protein coding genes genes at 7 and 14 jai in gall or/and root libraries.

Table 4: Clusters numbers from reference list localized in gene or in promoter regions at 7 and 14 dpi according to different filters application (blue case) in gall and/or root libraries.

rpmm: reads per millions mapped

	DE Clusters	adjpval>0,05	DicerCall 3/3	2 RPMM (3/3)	covering genes present in microarrays	anticorrelated expression profile with genes in microarrays	7 dpi		14 dpi	
							In gene	In promoter regions	In gene	In promoter regions
Clusters numbers							34809	31507	39593	34399
							7312	7478	3273	3151
							5626	6316	2225	2568
							2871	3157	2029	2295
							72	157	61	150
							38	100	43	90

Table 5 : Number of DE clusters from reference lists localized in putative promoter regions (upstream genes) or within genes and differentially expressed in galls.

		7 dpi				14 dpi			
		Upstream gene	%	in gene	%	Upstream gene	%	in gene	%
Number of DE clusters	Upregulated in Galls	2001	69,4	2246	88,3	1470	98,9	1369	99,5
	Downregulated in Galls	882	30,6	297	11,7	16	1,1	7	0,5
	Total	2883	100	2543	100	1486	100,0	1376	100

more 23-24 nt reads than roots and this difference was particularly striking at 14 dpi. This over-representation of reads in galls was previously described at 3 dpi (Cabrera et al. 2016). No such disparity between galls and roots is observed for the 20-21-22nt clusters.

Based on the normalized average read counts on each DC-cluster in galls and roots, the two main DC classes are 21 and 24 nucleotides (Fig.3). 24 nt is the major DC class within galls and roots with between 73,5% to 78% of the whole clusters with a DC but 21 nt class represents only between 1,5% 4,7% of the clusters (Fig. 1). This highlights that a relatively small number of siRNA clusters with DC of 21nt produce large amounts of 21-nucleotide siRNAs, while a much larger number of clusters with DC of 24nt, mostly hc-siRNA, produce lower amounts of 24-nucleotide siRNAs. SiRNA clusters produce often a mix of different sized RNAs and DC score does not always reflect the diversity of reads within the cluster (Fig. S1). For siRNA DC-clusters with a DC of 20 and 21 nt, DC generally reflects the major size of the of reads within the cluster but reads within predicted siRNA clusters with a DC of 23 and 24 nt are more heterogeneous with mixtures of 23 and 24 nucleotide RNAs.

Predicted siRNA clusters that are differentially expressed in galls

Since prediction of siRNA clusters were realized independently for each sample, the three libraries of each condition (gall or root) did not have exactly the same list of predicted siRNA clusters. To run statistical analysis with our data, we build a reference set of predicted siRNA clusters by using similar strategy than Coruh *et al* (2015) for identification of siRNA clusters in *Physcomitrella patens*. For each time point, *A. thaliana* predicted siRNA clusters that were shared by at least two of the three libraries in at least one condition (gall or root) were pooled in a reference set of predicted siRNA clusters (Fig. S2). This reference set includes 86 264 and 92578 sRNA clusters present in gall and/or in root libraries at 7 and 14 dpi respectively (Table 2). 10 588 clusters (12%) and 10 050 (11%) of these clusters mapped within 2 785 and 2731 unique TE at 7 and 14 dpi respectively meaning that a single TE can be targeted by several clusters (Table 3). Expression level of these predicted siRNA clusters between galls and roots was compared for each time point by DeSeq2 (Anders & Huber, 2010) statistical analysis with an adjusted pvalue threshold of $p_{adj} < 0.05$. Moreover, we used two additional filters to increase stringency of our analysis: for each time point, only clusters that were supported by a DC score and by a significant expression level (superior or equal to 2 RPMM) in the three libraries in at least one condition (gall or root) were considered as robust predicted siRNA clusters and kept for further analyses (Table 4). Since hc-siRNA target TE within promoter or introns (Yu *et al.*, 2013a; Deleris *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016) and nat-siRNA target gene body, we focused our analysis on predicted siRNA clusters that were located within a putative promoter region and within gene body. We defined the 2kb upstream coding DNA sequence as putative gene promoter region. Analysis of genomic position of DE predicted siRNA clusters showed that at 7 dpi, 2 871 and 3 157 predicted siRNA clusters are DE in galls within gene sequence and putative promoter region

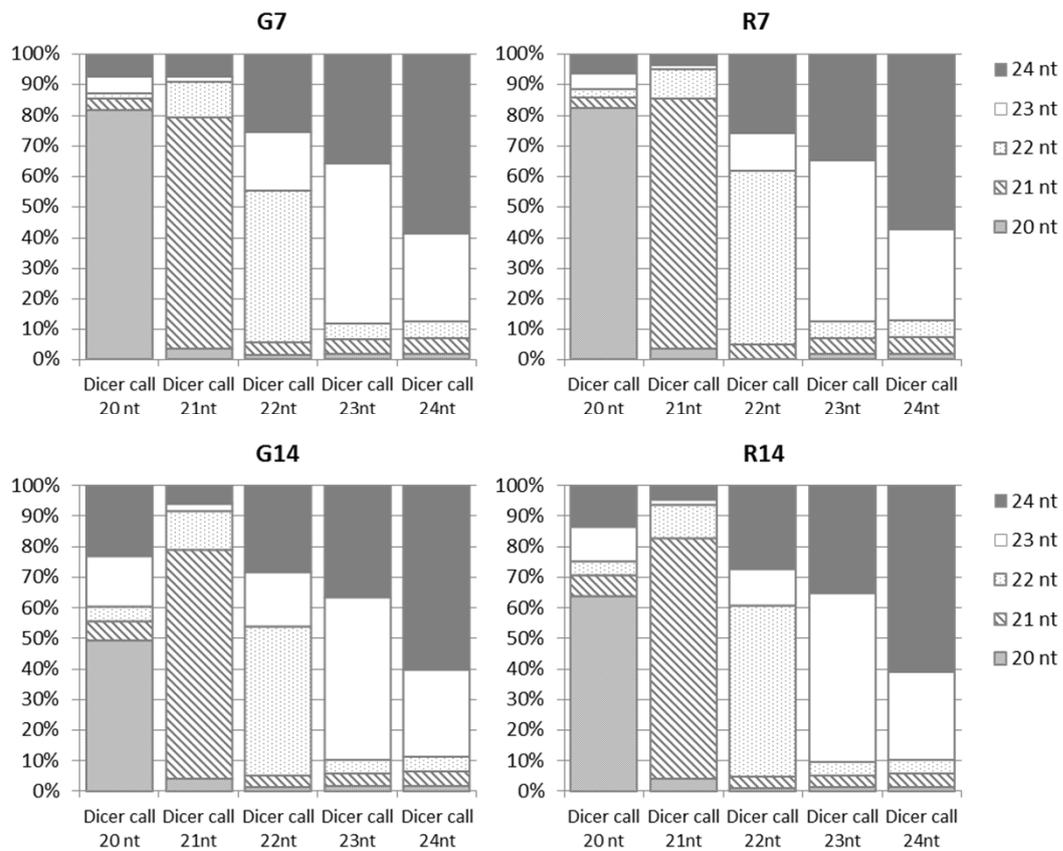


Fig. S1: Percentage of 20, 21, 22, 23, 24 nt reads within each class of DicerCall clusters in gall (G7, G14) and root (R7, R14) libraries at 7 and 14 dai.

respectively (Table 4). At 14 dpi 2 029 and 2 295 predicted siRNA clusters are DE in galls within gene sequence and putative promoter region respectively (Table 4 and Table S1). The number of DE predicted clusters in putative promoter regions and within gene is therefore similar. Most of these clusters were covered by reads in both gall and root samples. 275 and 809 predicted clusters upstream of gene at 7 and 14 dpi respectively and 328 and 653 predicted clusters within gene at 7 and 14 dpi respectively were exclusively covered by reads in a single condition galls or roots (Table S2). Within DE clusters shared by galls and roots, most of these DC-clusters belong to the 23-24 nt category (Table S2) but the importance of the various DC categories is clearly different between galls and roots. In all libraries, DE predicted clusters with a DC of 20-22 nt are in minority (Table S3). However, the proportion of 20-22 nt DC-clusters is clearly superior in roots (between 2 and 6%) than in galls (between 0.2 and 1.2%). DE predicted clusters with a DC of 23-24 are preponderant in all libraries with an over-representation in galls comparing to roots while the opposite pattern is observed for the 20-22 nt DC-clusters that are overrepresented in roots (Table S3).

Most of the DE predicted clusters are upregulated in galls (Table 5 and Table S4). At 7 dpi predicted siRNA clusters that are upregulated in galls represent 69.4% of the DE clusters and located in promoter region and 88.3% of the DE clusters and located in gene. At 14 dpi, predicted siRNA clusters that are upregulated in galls represent 98.9% of the DE clusters and located in promoter region and 99.5% of the DE clusters and located in within gene. Consequently, the twenty DE clusters with the highest FC in promoter region and within gene sequence at 7 and 14 dpi are all upregulated in galls (Table S5). One predicted DE cluster is among the twenty highest DE clusters at 7 and 14 dpi. This cluster is located at a loci corresponding to a gene encoding a Lecithin (cholesterol acyltransferase).

siRNAs repress activity of transposons by inducing RNA directed DNA Methylation (RdDM). At 7 dpi, 48 DE predicted siRNA producing clusters located upstream gene sequence and 19 DE predicted siRNA producing clusters located within gene sequence were identified as targeting transposons. At 14 dpi, 118 DE predicted siRNA producing clusters located upstream gene sequence and 36 DE predicted siRNA producing clusters located within gene sequence were identified as targeting transposons.

GO analysis of genes or putative promoter regions covered by differentially expressed siRNA DC-clusters

From the list of siRNA DC-clusters that are differentially expressed in galls and that target gene body or putative gene promoters, we identified those corresponding to plant protein coding genes and realized a Gene Ontology (GO) analysis to identify biological process related to these genes. Thus, 2 326 and 1 821 genes are covered in their putative promoter regions by one or several differentially

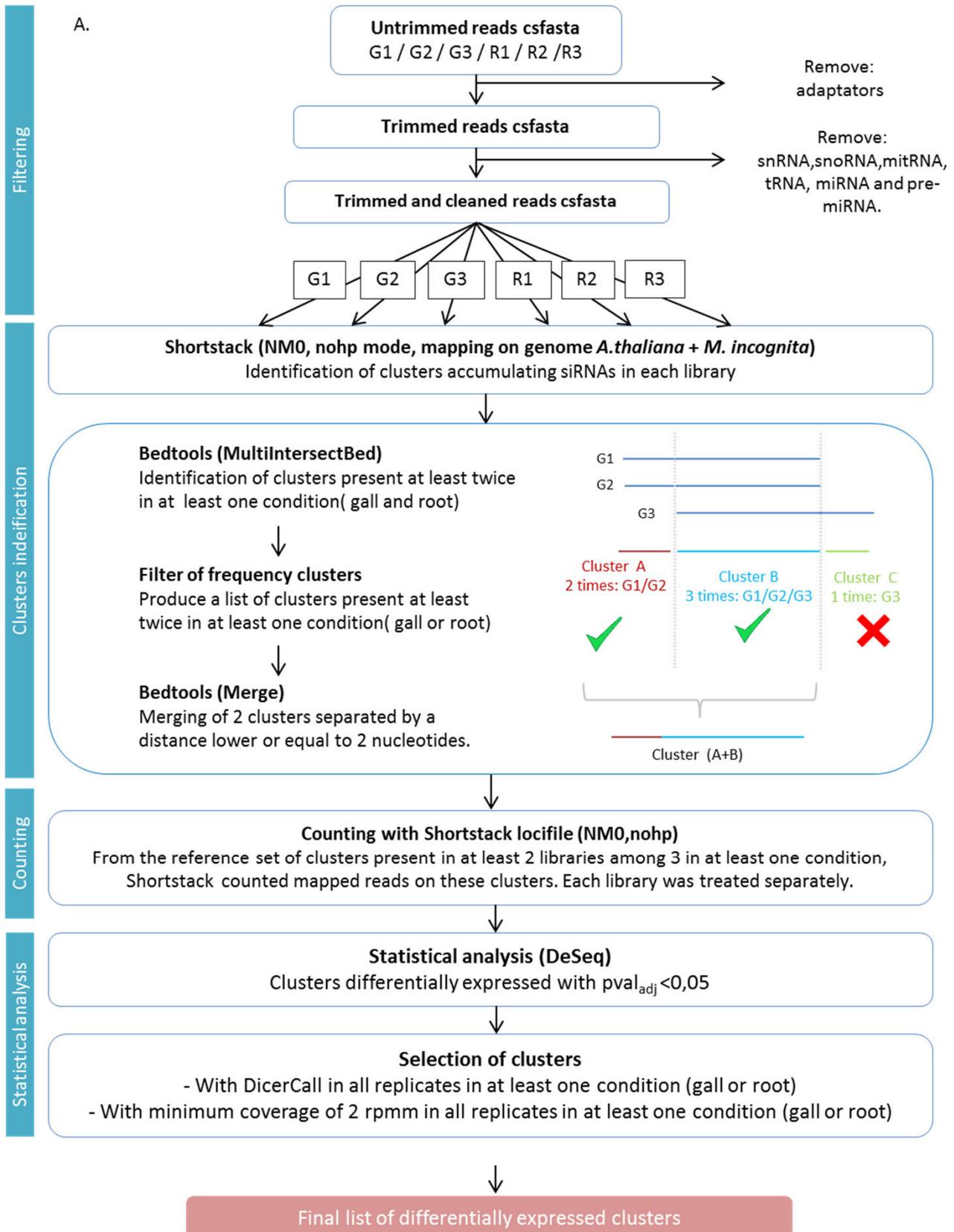


Fig. S2, Part 1.

B.

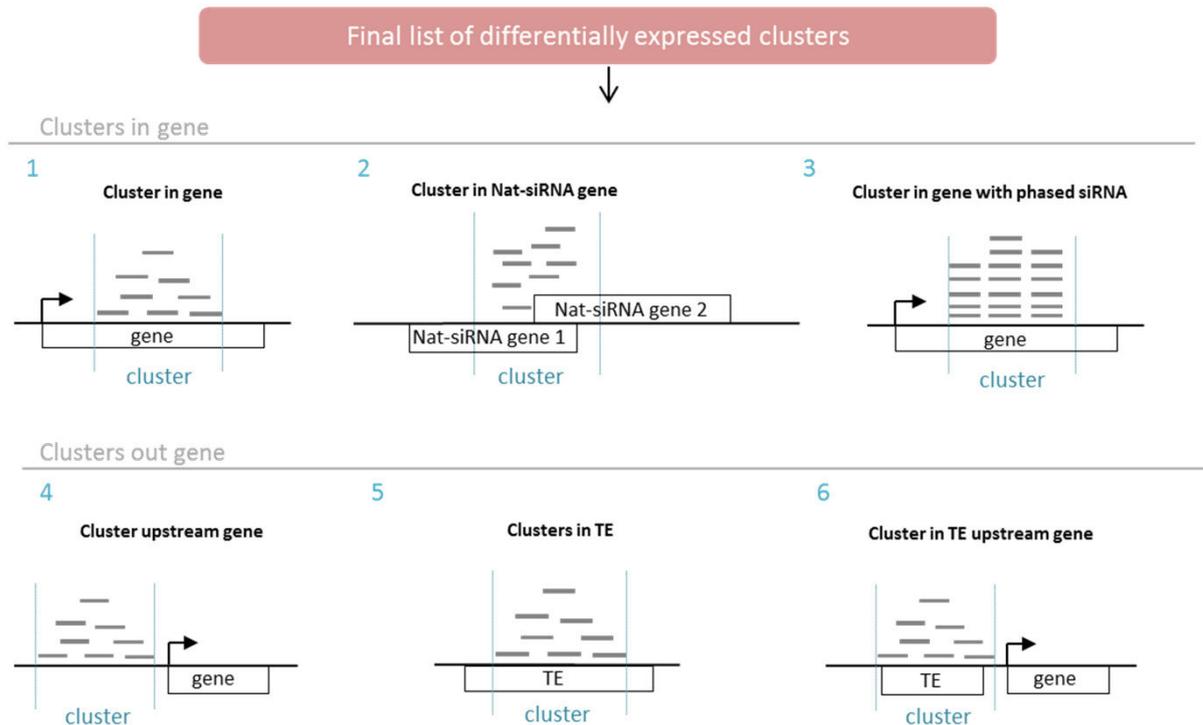


Fig. S2, Part2.

Fig. S2 : Pipeline of siRNA analysis.

Part 1: From prediction to statistical analysis

Data obtained from the SOLiD sequencing are cleaned of adaptors and special sequences (snRNA, snoRNA, miRNA, tRNA, miRNA and pre-miRNA). The Shortstack software mapped and segmented the genome into clusters corresponding to genomic regions that accumulate siRNAs. Each bank was treated separately. (Note: parameters that define the minimum number of reads for a cluster to be considered as such have been left by default, and the parameter that determines). Bedtools were used to identify clusters that were present in at least 2 out of 3 libraries in at least one conditions (gall or root). If these clusters were separated by a distance of less than 2 nucleotides, they were then merged (default parameter). This reference set of clusters was provided to Shortstack which counted the number of reads mapped on these clusters in the different libraries. From these counting data, a statistical analysis (Deseq) was performed to identify clusters that were differentially expressed between gall and root conditions. To improve robustness of clusters identified, only clusters with a DicerCall and a minimum coverage of 2 rpmm in all replicates in at least one condition (gall or root) were considered.

Part 2. Analyses of predicted siRNA DC-clusters

From the list of differentially expressed clusters, several analyses were realized. First clusters colocalized with genes (1), or nat-siRNA genes (2) were identified. Then among clusters in genes, phasing score of these clusters was analyzed (3).

Clusters located in putative promoter regions within 2kb upstream (4) of protein coding genes or in transposable element (TE) (5) or in TE located in putative promoter regions were identified (6). The analyses were performed at 7 dpi and 14 dai.

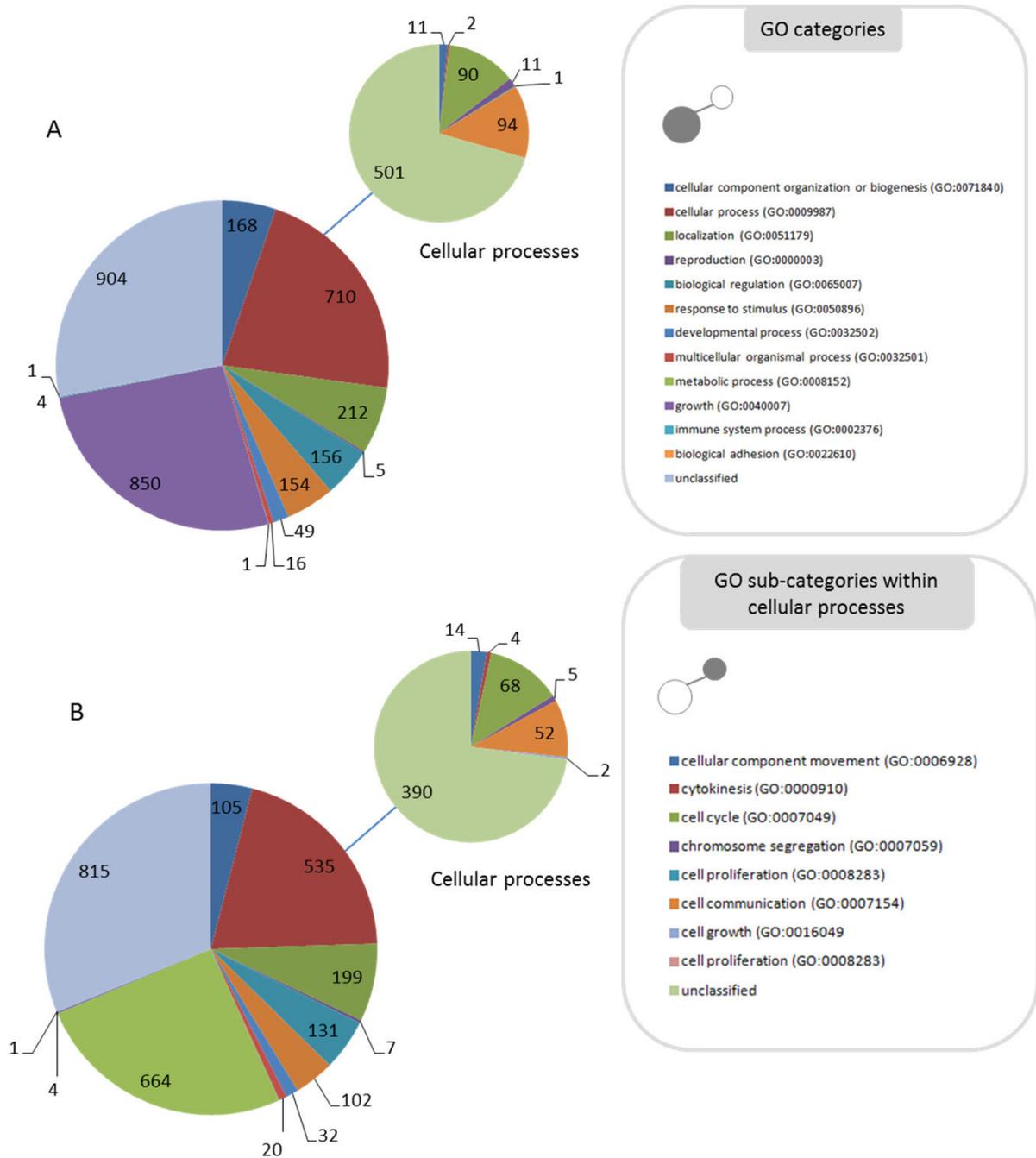


Fig. S3: GO categories of genes covered by DE DC-clusters at 7 dpi.

DC-clusters located upstream gene (A) or within gene (B). Cellular processes category is detailed in the smaller pie chart.

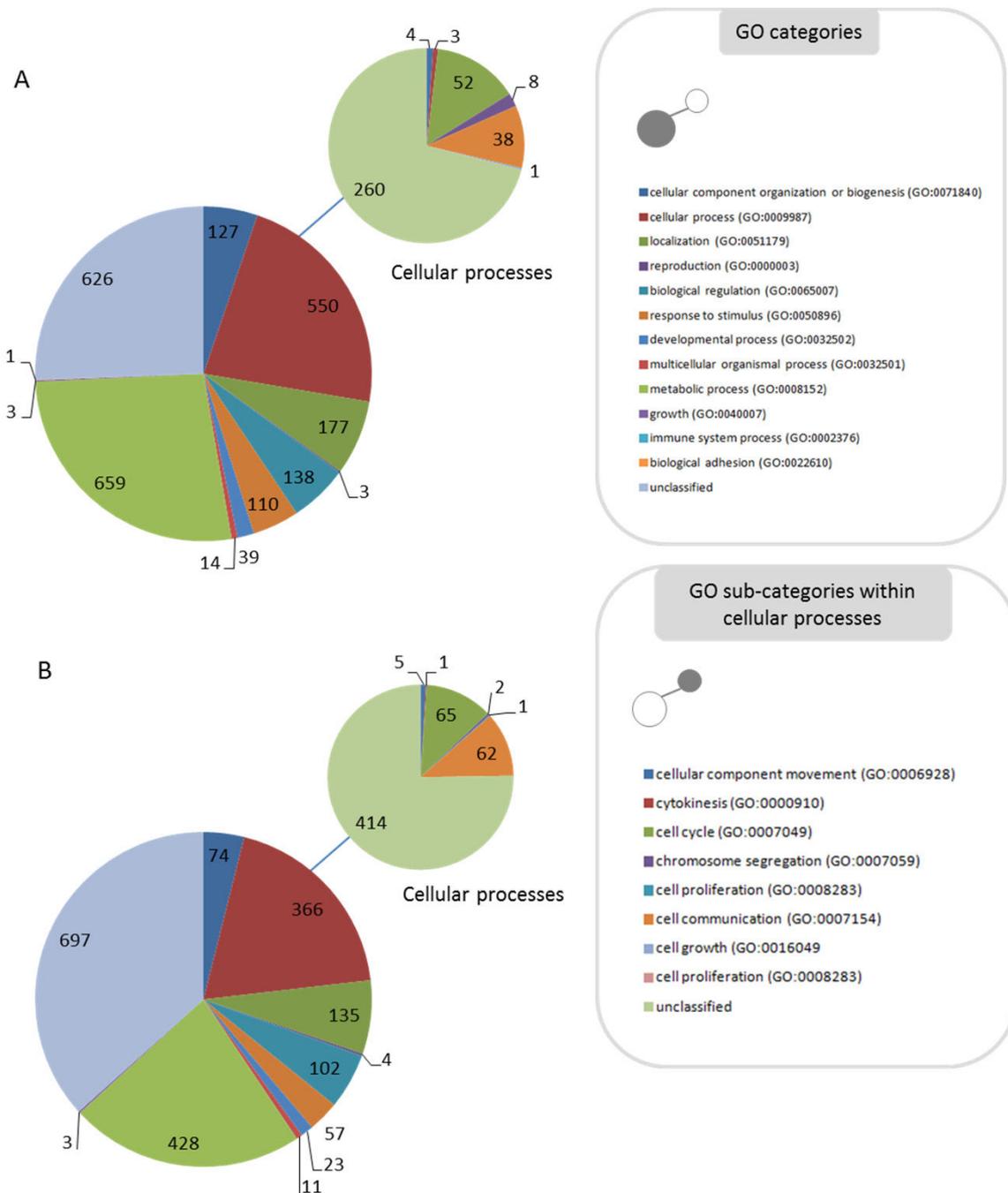


Fig. S4: GO categories of genes covered by DE DC-clusters at 14 dpi.

DE DC-clusters located upstream gene (A) or within gene (B). Cellular processes category is detailed in the smaller pie chart.

Table S6: GO enrichment of DE clusters localized in genes at 7 dpi (A) and 14 dpi (B)

A.	GO biological process complete	Arabidopsis thaliana - REFLIST (27352)	upload_1 (2617)	upload_1 (expected)	upload_1 (over/under)	upload_1 (fold Enrichment)	upload_1 (P-value)
	UNCLASSIFIED	8213	719	785.81	-	.91	0,00E+00
	response to abiotic stimulus (GO:0009628)	1491	87	142.66	-	.61	3,96E-04
	peptide metabolic process (GO:0006518)	507	19	48.51	-	.39	2,20E-03
	cellular amide metabolic process (GO:0043603)	564	23	53.96	-	.43	2,96E-03
	peptide biosynthetic process (GO:0043043)	486	18	46.50	-	.39	3,02E-03
	response to metal ion (GO:0010038)	368	11	35.21	-	.31	3,62E-03
	translation (GO:0006412)	482	18	46.12	-	.39	3,85E-03
	response to inorganic substance (GO:0010035)	690	32	66.02	-	.48	4,43E-03
	amide biosynthetic process (GO:0043604)	523	21	50.04	-	.42	5,39E-03
	response to chemical (GO:0042221)	2084	141	199.39	-	.71	8,33E-03
	cellular nitrogen compound metabolic process (GO:0034641)	3215	238	307.61	-	.77	1,55E-02
	cellular nitrogen compound biosynthetic process (GO:0044271)	2310	163	221.02	-	.74	2,71E-02
	regulation of response to stimulus (GO:0048583)	402	15	38.46	-	.39	2,78E-02
	protein localization (GO:0008104)	494	21	47.27	-	.44	2,79E-02
	organonitrogen compound biosynthetic process (GO:1901566)	1031	60	98.64	-	.61	2,98E-02
	cellular macromolecule localization (GO:0070727)	330	11	31.57	-	.35	4,48E-02
	response to cadmium ion (GO:0046686)	261	7	24.97	-	.28	4,72E-02

B.	GO biological process complete	Arabidopsis thaliana - REFLIST (27352)	upload_1 (1899)	upload_1 (expected)	upload_1 (over/under)	upload_1 (fold Enrichment)	upload_1 (P-value)
	UNCLASSIFIED	8213	518	570.21	-	.91	0,00E+00
	organonitrogen compound biosynthetic process (GO:1901566)	1031	36	71.58	-	.50	3,86E-03
	response to abiotic stimulus (GO:0009628)	1491	61	103.52	-	.59	5,44E-03
	MAPK cascade (GO:0000165)	55	16	3.82	+	4.19	5,71E-03
	signal transduction by protein phosphorylation (GO:0023014)	55	16	3.82	+	4.19	5,71E-03
	response to inorganic substance (GO:0010035)	690	22	47.91	-	.46	4,16E-02

Note: unique genes covered by one or several DE clusters were analyzed on www.geneontology.org with PANTHER Classification System to identify « biology process » categories enrichment. Analyses were run for each time point independantly with default parameters. The "A. thaliana REFLIST" represent the number of genes in A. thaliana genome associated with a GO category. The "upload_1(2617)" corresponds to the genes associated with a GO category in our datas. The "upload_1(expected)" corresponds to genes expected in a "random" enrichment. The "upload_1 (over/under)" displays a "+" or "-" if an enrichment or an under-representation is detected respectively. The "upload_1(fold Enrichment)" is the ratio of "genes/genes expected". The "upload_1 (P-value) " display the p-value of all the categories that have an enrichment or a an under representation statistically relevant (p<0,05)

expressed clusters and are associated with a GO category at 7 and 14 dpi respectively. In the same way, 1 800 and 1 203 genes associated with a GO category are covered in genes by one or several differentially expressed clusters at 7 and 14 dpi respectively. Most of the genes covered within gene body or in their putative promoter region by differentially expressed clusters were not assigned to a GO category. Among genes assigned to a GO category and covered in within gene body or in putative promoter regions by differentially expressed clusters, two major categories can be observed: metabolic process and cellular process at 7 and 14 dpi. However, this is not the case for genes targeted within their putative promoter regions by DE clusters for which the two major GO categories are “growth” and “cellular process” category (Fig. S3 and S4). In all analysis we performed “cellular process” is always the second major GO category. Cellular process includes a majority of genes assigned to a GO category that are related to cell cycle and cell communication. Only genes covered by DE clusters in their gene body have significant GO category enrichment at 14 dai (Table S6). At 14 dpi, “organonitrogen compound biosynthetic process”, “response to abiotic stimulus”, “MAPK cascade” and “signal transduction by protein phosphorylation” are the three significantly enriched categories.

Analysis of nat-siRNAs

We screened differentially expressed predicted DC-siRNA clusters for nat-siRNAs. In order to identify nat-siRNAs within clusters differentially expressed in galls, we compared the genes that are covered by one or several predicted differentially expressed DC-siRNA clusters at 7 and 14 dpi located within genes defined as natural antisense genes (TAIR 10) (Berardini *et al.*, 2015). 495 and 165 genes covered by a siRNA DC-clusters correspond to cis-natural antisense genes at 7 and 14 dpi respectively. 34 and 27 genes covered by one or several siRNA DC-clusters correspond to trans-natural antisense genes at 7 and 14 dpi respectively (Table S7). These clusters putatively generate nat-siRNAs, however they all belong to the 24 nt DC category that is not canonical size for nat-siRNAs. Within a NAT pair of genes cis-nat-siRNAs derived from gene 1 target the post-transcriptional repression of the gene 2 and expression profile of these two genes is anti-correlated when these nat-siRNA target a regulation loop (Yu *et al.*, 2013b). For each cis-NAT pairs corresponding to DE putative cis-nat-siRNA clusters, we compare the expression profile of the NAT gene targeted by DE predicted cis-nat-siRNA cluster with the expression of the second gene of the NAT pair by using NEMATICS, a database of transcriptomics studies on galls induced by RKN (Cabrera *et al.*, 2014). Expression data were available only for a very low number of the cis-NAT genes: 22 genes were DE at 7 dpi and 3 genes were DE at 14 dpi. None of these cis-NAT pairs showed anti-correlated expression pattern for the two genes of the cis-NAT pairs (Table S7).

Analysis of DE clusters in galls and their putative targeted genes in galls

Prediction of siRNA clusters may generate multiple false positives. To restrict our work to biologically relevant genes, we focused our further analyses on hc-siRNAs to the DE predicted siRNA

Table 6 : DE clusters covering upstream regions of genes DE galls based with anticorrelated profiles and identified by Yu et al (2013) as induced by fig22 and targeted in their promoting regions by RdDm in unchallenged plants.

Upstream gene 7dpi	cluster	gene ID	Description	log2 FC R/G SO:ID	Pval _{adj}	gene	Log2FC G/R CATMA	Pval _{adj}
Upstream gene 14dpi	chr2:13580279-13581415 chr4:525788-525991	AT2G31945.1 AT4G01245.1;AT4G01250.1	unknown protein ATWRKY22 is a member of WRKY Transcription Factor	-2.40 #NOM?	2.27E-04 1.05E-02	AT2G31945 AT4G01250	-0.93 -1.21	1.73E-06 0.00E+00
	chr1:10910205-10910603	AT1G30755.1	PSI2, PSK SIMULATOR 2, Protein of unknown function (DUF668)	#NOM?	3.52E-02	AT1G30755	-0.90	3.55E-06
	chr1:21886592-21886961	AT1G59590.1	ZCF37 mRNA. The mRNA is cell-to-cell mobile.	#NOM?	1.45E-02	AT1G59590	-0.93	8.23E-07
	chr2:10139020-10139268	AT2G23810.1;AT2G23820.1;AT2G23820.2	TETRASPANIN family tetraspanin8 (TET8), FUNCTIONS IN: molecular function unknown; INVOLVED IN: aging; LOCATED IN: plasma membrane, membrane; EXPRESSED IN: 25 plant structures; EXPRESSED DURING: 14 growth stages; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Tetraspanin (InterPro:IPR018499), Tetraspanin, conserved site (InterPro:IPR018503), Tetraspanin, subgroup (InterPro:IPR000301), BEST Arabidopsis thaliana protein match is: tetraspanin9 (TAIR:AT4G30430.1); Has 603 Blast hits to 600 proteins in 63 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 159; Fungi - 0; Plants - 433; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 11 (source: NCBI BLINK);	-3.17	3.63E-02	AT2G23810	-0.94	5.82E-07
	chr2:15108637-15108989	AT2G35970.1;AT2G35980.1	ARABIDOPSIS NDR1/HIN1-LIKE 10 (Encodes a protein whose sequence is similar to tobacco hairpin-induced gene (HIN1) and Arabidopsis non-face specific disease resistance gene (NDR1). Expression of this gene is induced by cucumber mosaic virus, spermine and during senescence. The gene product is localized to the chloroplast. The mRNA is cell-to-cell mobile.)	#NOM?	4.66E-02	AT2G35980	-1.18	0.00E+00
	chr2:18083599-18083939	AT2G43590.1	Chitinase family protein. Chitinase family protein; FUNCTIONS IN: chitin binding, chitinase activity; INVOLVED IN: carbohydrate metabolic process, cell wall macromolecule catabolic process; LOCATED IN: endomembrane system; EXPRESSED IN: 7 plant structures; EXPRESSED DURING: LP.04 four leaves visible, 4 anthesis, C globular stage, LP.02 two leaves visible; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Chitin-binding, type 1, conserved site (InterPro:IPR018371), Glycoside hydrolase, family 19 (InterPro:IPR016283), Chitin-binding, type 1 (InterPro:IPR01002), Glycoside hydrolase, family 19, catalytic (InterPro:IPR000726); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: Chitinase family protein (TAIR:AT2G43580.1); Has 2744 Blast hits to 2502 proteins in 524 species: Archae - 0; Bacteria - 615; Metazoa - 34; Fungi - 202; Plants - 1760; Viruses - 20; Other Eukaryotes - 113 (source: NCBI BLINK).	#NOM?	1.54E-02	AT2G43590	-1.05	1.49E-09
	chr3:110310230-11031528	AT3G29034.1	unknown protein	-3.54	3.49E-02	AT3G29034	-1.59	0.00E+00
	chr3:11030736-11031214	AT3G29034.1	unknown protein	#NOM?	4.06E-03	AT3G29034	-1.59	0.00E+00
	chr3:17722355-17722693	AT3G48020.1	unknown protein; FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown; LOCATED IN: chloroplast.	-5.61	4.94E-03	AT3G48020	-0.83	9.18E-05
	chr5:20978912-20979206	AT5G51640.1;AT5G51660.1	TBL17, TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 17, YELLOW-LEAF-SPECIFIC GENE 7, YLS7	-3.87	3.88E-03	AT5G51640	-0.70	1.62E-02

Note: #NOM? is indicated when the number of reads in equal to 0 in root libraries

clusters that target genes or promoter of genes that are DE in galls with an anti-correlated expression profile with their corresponding predicted siRNA clusters. Expression of targeted genes of predicted siRNA clusters were investigated by using NEMATICS. Only a small fraction of the predicted siRNAs targeted genes display differential expression in galls (Table 4). At 7 dpi, 157 genes that are covered by DE predicted siRNA clusters within their promoter region are DE in galls and expression profile of 100 is anti-correlated to the DE siRNA clusters and 72 genes that are covered by DE predicted siRNA clusters are DE in galls and expression profile of 38 is anti-correlated to the DE siRNA clusters (Table S8). At 14 dpi, 150 genes that are covered by DE predicted siRNA clusters within their promoter region are DE in galls and expression profile of 90 is anti-correlated to the DE siRNA clusters and 61 genes that are covered by DE predicted siRNA clusters are DE in galls and expression profile of 43 is anti-correlated (Table S8). Nine and four anti-correlated DE genes are targeted by siRNA clusters both within promoter regions and within gene sequence at 7 and 14 dpi respectively (Table S9).

Moreover, some DE genes and their corresponding anti-correlated DE predicted siRNA clusters were identified in the two time points of gall development. For the predicted siRNA clusters targeting putative promoter regions, 22 anti-correlated pairs DE genes/predicted siRNA clusters are commonly regulated at 7 and 14 dpi. For the predicted siRNA clusters targeting gene sequence, six anti-correlated pairs DE genes/predicted siRNA clusters are commonly regulated at 7 and 14 dpi (Table S10).

Analysis of hc-siRNAs

Genes targeted by hc-siRNA and RdDM possess TE or repeats derived from TE within their promoter sequences. These sequences are targeted by hc-siRNA to induce TGS of this region by inducing DNA methylation. Annotation of transposable elements was retrieved from the TAIR 10 and compared to the list of DE genes in galls that display predicted siRNA DC-clusters within their promoter region. Based on this annotation TE were identified in promoter region of two DE genes encoding a methionine sulfoxide reductase B5 and an unknown protein (AGI) at 7 dpi and one gene encoding a glycosyl hydrolase 9B14 at 14 dpi. These genes are the best candidates to be targeted by hc-siRNAs and RdDM during formation of galls.

PTI induced genes putatively silenced by RdDM during plant-nematode interaction.

In a previous analysis, Yu et al (2013) identified 356 genes that are flg22-induced and targeted by siRNAs in their promoter regions and therefore are putative targets of RdDM in uninfected plants. Using this approach the authors identified the transcription factor *WRKY22* that accumulates siRNA and carries DNA methylation in its promoter. We compared the putative targets of RdDM identified by Yu et al, to the list of DE predicted siRNA clusters located in putative promoter regions/DE genes anti-correlated pairs in our data (Table 6). We identified 10 genes that were described as putative

RdDM targets by Yu et al (2013) and are targeted by predicted siRNA DC-clusters within their promoter regions with an anticorrelated expression profile siRNA clusters/DE genes in galls. Interestingly, these 11 genes that were described as induced by flg22 are all repressed in galls.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Christine Lelandais (IPS2, Paris-Saclay, France), Nicolas Bouché (IJPB, Versailles, France), Carolina Escobar and Javier Cabrera (University of Toledo, Spain) for helpful discussions and Lionel Navarro (ENS, Paris, France) for providing us the *ros1* and *ddm1* mutants lines. C.M. was supported by “Santé des Plantes et Environnement” INRA department and Provence Alpes Côte d’Azur fellowship. This work was funded by INRA and by the French Government (National Research Agency, ANR) through the ‘Investments for the Future’ LabEx SIGNALIFE: program reference #ANR-11LABX-0028-01 and by the Plant-KBBE program NESTOR (ANR-13-KBBE-0003-06). This Work was supported by France Génomique National infrastructure, funded as part of “Investissement d’avenir” program managed by Agence Nationale pour la Recherche (contrat ANR-10-INBS-09).

SUPPLEMENTARY DATA (Tables S1 to S10 except S6 are provided online)

Table S1: List of differentially expressed clusters (pval<0.05) with DicerCall (3/3) and >2 rpmm (3/3).

Table S2: List of Differentially expressed clusters (pval<0.05) with DicerCall (3/3) and >2 rpmm (3/3) and exclusive expression in root or gall.

Table S3: Number of differentially expressed clusters (pval<0.05) with DicerCall (3/3) and >2 rpmm (3/3) localized upstream gene or in gene presented by DicerCall categories.

Table S4: Differentially expressed clusters with DicerCall (3/3) and >2 rpmm (3/3) upstream gene and in gene at 7 & 14 dpi.

Table S5: The 20DE clusters with expression data in galls and roots that present the higher FC at 7 and 14 dpi categorized by genomic location upstream of gene or within gene.

Fig S6: GO enrichment of DE clusters localized in genes at 7 dpi and 14 dpi.

Table S7: List of CisNAT and TransNAT genes that accumulates DE clusters at 7 and 14 dpi.

Table S8: List of differentially expressed clusters localized in genes or upstream genes for each timepoint (7 and 14 dpi) that target genes differentially expressed in galls with anti-correlated expression.

Table S9: List of DE clusters located both upstream and within gene that target genes DE in galls with an anticorrelated profile at each timepoint (7 and 14 dpi).

Table S10: List of cluster/gene pairs differentially expressed in galls both at 7 & 14 dpi with an anticorrelated expression profile.

BIBLIOGRAPHY

- Abad P, Gouzy J, Aury J-M, Castagnone-Sereno P, Danchin EGJ, Deleury E, Perfus-Barbeoch L, Anthouard V, Artiguenave F, Blok VC, et al. 2008.** Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature biotechnology* **26**: 909–15.
- Abad P, Williamson VM. 2010.** Plant Nematode Interaction: A Sophisticated Dialogue. *Advances in Botanical Research*. 147–192.
- Ahmed I, Sarazin A, Bowler C, Colot V, Quesneville H. 2011.** Genome-wide evidence for local DNA methylation spreading from small RNA-targeted sequences in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* **39**: 6919–6931.
- Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Carrington JC, Yang M, Padgett RW, Steward R, Chen X, Crete P, Picault N, et al. 2005.** microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* **121**: 207–21.
- de Almeida Engler J, Gheysen G. 2013.** Nematode-induced endoreduplication in plant host cells: why and how? *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **26**: 17–24.
- Anders S, Huber W. 2010.** Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology* **11**: R106.
- Axtell MJ. 2013a.** Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annual review of plant biology* **64**: 137–59.
- Axtell MJ. 2013b.** ShortStack: comprehensive annotation and quantification of small RNA genes. *RNA (New York, N.Y.)* **19**: 740–51.
- Barcala M, García A, Cabrera J, Casson S, Lindsey K, Favery B, García-Casado G, Solano R, Fenoll C, Escobar C. 2010.** Early transcriptomic events in microdissected *Arabidopsis* nematode-induced giant cells. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **61**: 698–712.
- Berardini TZ, Reiser L, Li D, Mezheritsky Y, Muller R, Strait E, Huala E. 2015.** The *Arabidopsis* information resource: Making and mining the ‘gold standard’ annotated reference plant genome. *genesis* **53**: 474–485.
- Blok VC, Jones JT, Phillips MS, Trudgill DL. 2008.** Parasitism genes and host range disparities in biotrophic nematodes: The conundrum of polyphagy versus specialisation. *BioEssays* **30**: 249–259.

- Boccaro M, Sarazin A, Thiébeauld O, Jay F, Voinnet O, Navarro L, Colot V. 2014.** The Arabidopsis miR472-RDR6 Silencing Pathway Modulates PAMP- and Effector-Triggered Immunity through the Post-transcriptional Control of Disease Resistance Genes (J-M Zhou, Ed.). *PLoS Pathogens* **10**: e1003883.
- Bologna NG, Voinnet O. 2014.** The Diversity, Biogenesis, and Activities of Endogenous Silencing Small RNAs in *Arabidopsis*. *Annual Review of Plant Biology* **65**: 473–503.
- Borges F, Martienssen RA. 2015.** The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Publishing Group* **16**: 1–15.
- Brodersen P, Voinnet O. 2006.** The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics* **22**: 268–280.
- Cabrera J, Barcala M, García A, Rio-Machín A, Medina C, Jaubert-Possamai S, Favery B, Maizel A, Ruiz-Ferrer V, Fenoll C, et al. 2016.** Differentially expressed small RNAs in Arabidopsis galls formed by *Meloidogyne javanica*: A functional role for miR390 and its TAS3-derived tasiRNAs. *New Phytologist* **209**: 1625–1640.
- Cabrera J, Bustos R, Favery B, Fenoll C, Escobar C. 2014.** NEMATIC: A simple and versatile tool for the insilico analysis of plant-nematode interactions. *Molecular Plant Pathology* **15**: 627–636.
- Caillaud M-C, Favery B. 2016.** In Vivo Imaging of Microtubule Organization in Dividing Giant Cell. 137–144.
- Coruh C, Cho SH, Shahid S, Liu Q, Wierzbicki A, Axtell MJ. 2015.** Comprehensive Annotation of *Physcomitrella patens* Small RNA Loci Reveals That the Heterochromatic Short Interfering RNA Pathway Is Largely Conserved in Land Plants. *The Plant cell* **27**: tpc.15.00228-.
- Damiani I, Baldacci-Cresp F, Hopkins J, Andrio E, Balzergue S, Lecomte P, Puppo A, Abad P, Favery B, Hérouart D. 2012.** Plant genes involved in harbouring symbiotic rhizobia or pathogenic nematodes. *The New phytologist* **194**: 511–22.
- Daxinger L, Kanno T, Bucher E, van der Winden J, Naumann U, Matzke AJM, Matzke M. 2009.** A stepwise pathway for biogenesis of 24-nt secondary siRNAs and spreading of DNA methylation. *The EMBO Journal* **28**: 48–57.
- Deleris A, Halter T, Navarro L. 2016.** DNA Methylation and Demethylation in Plant Immunity. *Annual Review of Phytopathology* **54**: 579–603.
- Downen RH, Pelizzola M, Schmitz RJ, Lister R, Downen JM, Nery JR, Dixon JE, Ecker JR. 2012.** Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America **109**: E2183-91.

Escobar C, Fenoll C. 2015. *Plant Nematode Interactions: A View on Compatible Interrelationships.*

Favery B, Quentin M, Jaubert-Possamai S, Abad P. 2016. Gall-forming root-knot nematodes hijack key plant cellular functions to induce multinucleate and hypertrophied feeding cells. *Journal of Insect Physiology* **84**: 60–69.

Fei Q, Li P, Teng C, Meyers B. 2015. Secondary siRNAs from Medicago NB-LRRs modulated via miRNA–target interactions and their abundances. *The Plant Journal*.

Fei Q, Xia R, Meyers BC. 2013. Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. *The Plant cell* **25**: 2400–15.

Gohlke J, Scholz C-J, Kneitz S, Weber D, Fuchs J, Hedrich R, Deeken R. 2013. DNA Methylation Mediated Control of Gene Expression Is Critical for Development of Crown Gall Tumors (JM McDowell, Ed.). *PLoS Genetics* **9**: e1003267.

Hewezi T, Howe P, Maier TR, Baum TJ. 2008. Arabidopsis Small RNAs and Their Targets During Cyst Nematode Parasitism. **21**: 1622–1634.

Hewezi T, Lane T, Piya S, Rambani A, Rice JH, Staton M. 2017. Cyst nematode parasitism induces dynamic changes in the root epigenome. *Plant Physiology*: pp.01948.2016.

Hewezi T, Maier TR, Nettleton D, Baum TJ. 2012. The Arabidopsis microRNA396-GRF1/GRF3 regulatory module acts as a developmental regulator in the reprogramming of root cells during cyst nematode infection. *Plant physiology* **159**: 321–35.

Hewezi T, Piya S, Qi M, Balasubramaniam M, Rice JH, Baum TJ. 2016. Arabidopsis miR827 mediates post-transcriptional gene silencing of its ubiquitin E3 ligase target gene in the syncytium of the cyst nematode *Heterodera schachtii* to enhance susceptibility. *Plant Journal*: 179–192.

Jammes F, Lecomte P, de Almeida-Engler J, Bitton F, Martin-Magniette M-L, Renou JP, Abad P, Favery B. 2005. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **44**: 447–58.

Khraiwesh B, Zhu J-K, Zhu J. 2012. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1819**: 137–148.

Knauer S, Holt AL, Rubio-Somoza I, Tucker EJ, Hinze A, Pisch M, Javelle M, Timmermans MC, Tucker MR, Laux T. 2013. A Protodermal miR394 Signal Defines a Region of Stem Cell

Competence in the Arabidopsis Shoot Meristem. *Developmental Cell* **24**: 125–132.

Kyndt T, Denil S, Haegeman A, Trooskens G, Bauters L, Van Criekinge W, De Meyer T, Gheysen G. 2012. Transcriptional reprogramming by root knot and migratory nematode infection in rice. *The New phytologist* **196**: 887–900.

Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology* **10**: R25.

Li X, Wang X, Zhang S, Liu D, Duan Y, Dong W. 2012. Identification of soybean microRNAs involved in soybean cyst nematode infection by deep sequencing. *PloS one* **7**: e39650.

López A, Ramírez V, García-Andrade J, Flors V, Vera P. 2011. The RNA Silencing Enzyme RNA Polymerase V Is Required for Plant Immunity (CS Pikaard, Ed.). *PLoS Genetics* **7**: e1002434.

Matzke M, Kanno T, Daxinger L, Huettel B, Matzke AJ. 2009. RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Current Opinion in Cell Biology* **21**: 367–376.

Matzke MA, Mosher RA. 2014. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Reviews Genetics* **15**: 394–408.

Meister G, Tuschl T. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**: 343–349.

Nawrocki EP, Burge SW, Bateman A, Daub J, Eberhardt RY, Eddy SR, Floden EW, Gardner PP, Jones TA, Tate J, et al. 2015. Rfam 12.0: updates to the RNA families database. *Nucleic acids research* **43**: D130-7.

Padmanabhan C, Zhang X, Jin H. 2009. Host small RNAs are big contributors to plant innate immunity. *Current opinion in plant biology* **12**: 465–72.

Peragine A, Yoshikawa M, Wu G, Albrecht HL, Poethig RS. 2004. SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes & Development* **18**: 2368–2379.

Rogers K, Chen X. 2013. Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant cell* **25**: 2383–99.

Rubio-Somoza I, Weigel D. 2011. MicroRNA networks and developmental plasticity in plants. *Trends in plant science* **16**: 258–64.

Shahid S, Axtell MJ. 2014. Identification and annotation of small RNA genes using ShortStack. *Methods (San Diego, Calif.)* **67**: 20–7.

- Sobczak M, Golinowski W. 2008.** Structure of Cyst Nematode Feeding Sites. Springer Berlin Heidelberg, 1–35.
- Świącicka M, Skowron W, Cieszyński P, Dąbrowska-Bronk J, Matuszkiewicz M, Filipecki M, Koter MD. 2017.** The suppression of tomato defence response genes upon potato cyst nematode infection indicates a key regulatory role of miRNAs. *Plant Physiology and Biochemistry* **113**: 51–55.
- Vaistij FE, Jones L, Baulcombe DC. 2002.** Spreading of RNA Targeting and DNA Methylation in RNA Silencing Requires Transcription of the Target Gene and a Putative RNA-Dependent RNA Polymerase. **14**: 857–867.
- Vaucheret H. 2006.** Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes & development* **20**: 759–71.
- Vazquez F, Vaucheret H, Rajagopalan R, Lepers C, Gascioli V, Mallory AC, Hilbert J-L, Bartel DP, Crété P. 2004.** Endogenous trans-Acting siRNAs Regulate the Accumulation of Arabidopsis mRNAs. *Molecular Cell* **16**: 69–79.
- Yu A, Lepere G, Jay F, Wang J, Bapaume L, Wang Y, Abraham A-L, Penterman J, Fischer RL, Voinnet O, et al. 2013a.** Dynamics and biological relevance of DNA demethylation in Arabidopsis antibacterial defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 2389–2394.
- Yu X, Yang J, Li X, Liu X, Sun C, Wu F, He Y. 2013b.** Global analysis of cis-natural antisense transcripts and their heat-responsive nat-siRNAs in Brassica rapa. *BMC plant biology* **13**: 208.
- Zhang H, Tao Z, Hong H, Chen Z, Wu C, Li X, Xiao J, Wang S. 2016.** Transposon-derived small RNA is responsible for modified function of WRKY45 locus. *Nature Plants* **2**: 16016.
- Zhao W, Li Z, Fan J, Hu C, Yang R, Qi X, Chen H, Zhao F, Wang S. 2015.** Identification of jasmonic acid-associated microRNAs and characterization of the regulatory roles of the miR319/TCP4 module under root-knot nematode stress in tomato. *Journal of Experimental Botany* **66**: 4653–4667.

Résultats complémentaires du chapitre 2.

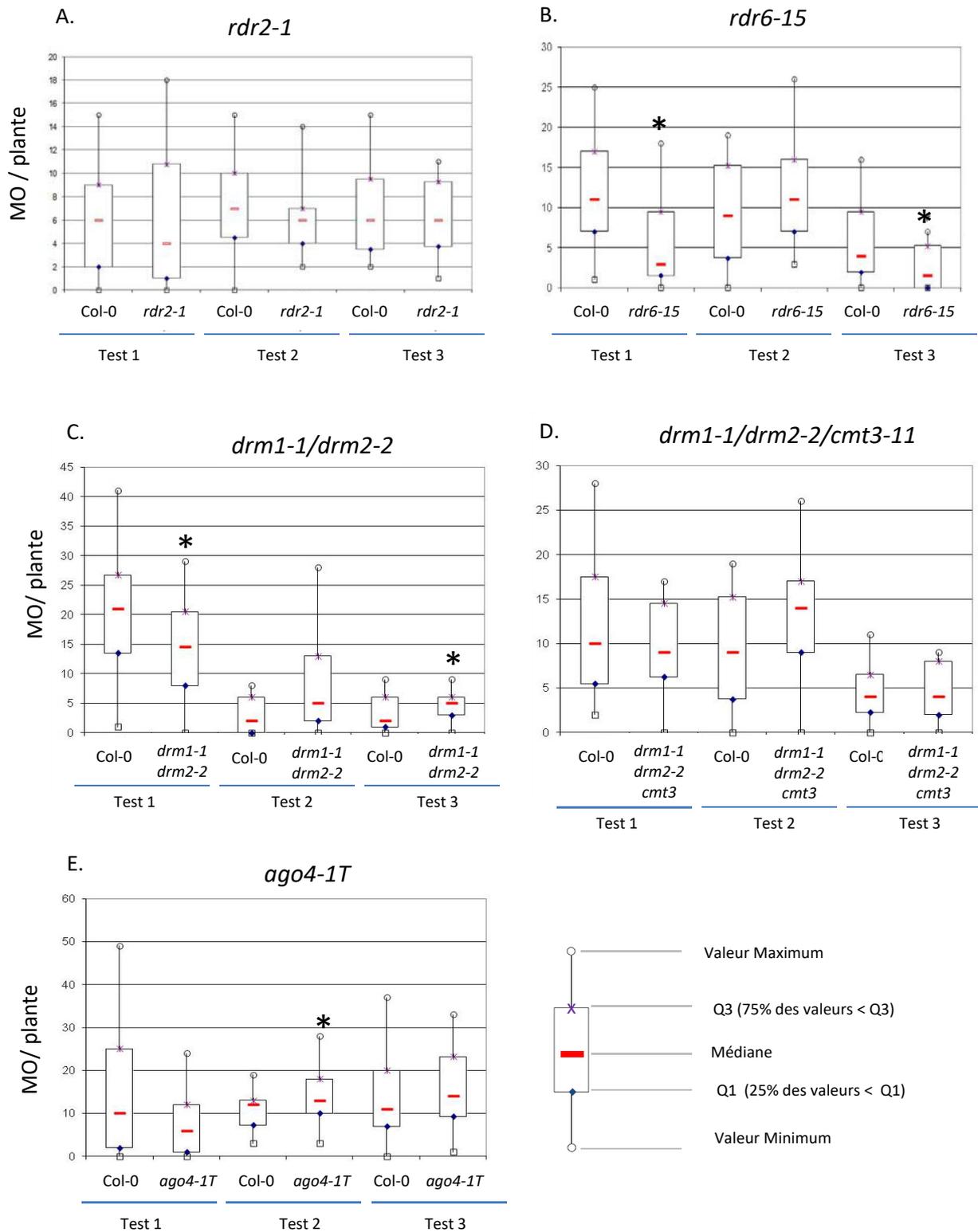


Figure 39: Tests d'infection des mutants TGS.

Les mutants d'*A. thaliana* *rdr2-1* (A), *rdr6-15* (B), *drm1-1/drm2-2* (C), *drm1-1/drm2-2/cmt3-11* (D) *ago4-1T* (E) et les plantes sauvages Col-0 ont été infectés avec *M. incognita*. Les masses d'oeuf (MO) ont été comptés. Les tests statistiques unidirectionnels de Mann-Whitney ont été réalisés pour chaque expérimentation; trois réplicats biologiques ont été réalisés.

*: différence significative par rapport à Col-0; $P < 0.05$.

Résultats complémentaires à l'article 2 : Caractérisation des siARN d'*A. thaliana* dans les galles induites par *M. incognita*.

Afin d'évaluer l'importance de la régulation TGS et PTGS dans l'interaction plante-nématode à galles la susceptibilité aux nématodes à galles de différents mutants d'*A. thaliana* affectés dans la biogénèse ou dans l'activité des siARN a été évaluée par des tests d'infestation.

- **Les mutants des voies des siARN sont-ils plus sensibles ou plus résistants aux infections par les nématodes à galles ?**

Les mutants TGS d'*A. thaliana* (*rdr2-1*, *drm1-1/drm2-2*, *drm1-1/drm2-2/cmt3*) et le mutant TGS et PTGS *rdr6-15* ont été infectés avec des larves de *M. incognita* ainsi que des plantes sauvages d'écotype Col-0. La sensibilité de ces mutants a été évaluée en comparant le nombre de masses d'œufs avec celui des plantes sauvages (Fig. 39 et 40). Une résistance accrue et statistiquement significative est observée pour le mutant *rdr6-15* avec une diminution du nombre de masses d'œufs d'un facteur 2. Pour les autres mutants, on observe une tendance générale à l'hyper-susceptibilité des mutants de la voie TGS à l'infection par *M. incognita*. Cette tendance n'est cependant pas supportée par les tests statistiques. De plus des résultats encore préliminaires (un seul test réalisé) obtenus pour les mutants TGS/PTGS: *dcl2-1/dcl3-1/dcl4-2* et TGS *nrpe1-12* et *nrpd1-a4* ne révèlent pas de différences significatives avec les plantes sauvages à l'exception des mutant *nrpe1-12* qui présentent une faible résistance à *M. incognita*. Ces résultats montrent donc l'importance des siARN associés à l'activité de RDR6 dans l'interaction plantes-nématodes. RDR6 est impliquée dans la biosynthèse de siARN impliqués dans les voies PTGS et TGS. Les résultats que nous avons obtenus pour les autres mutants de la voie TGS suggèrent que les régulations de type TGS ne sont pas essentielles dans l'interaction plante- nématodes à galles. La résistance observée chez le mutant *rdr6-15* semble donc associée aux siARN de la voie PTGS. Néanmoins les tests d'infestation aux nématodes à galles présentent une importante variabilité du nombre de masses œufs par plante au sein d'un même génotype. Il est probable que cette variabilité permette de voir uniquement les effets drastiques des mutations. Il est donc possible que les mutations des gènes impliqués dans la voie TGS ne provoquent pas d'effet suffisamment drastique pour être statistiquement validés.

Toutefois, il est important de souligner que les résultats préliminaires des tests de résistance à *M. incognita* des mutants d'*A. thaliana* affectés dans la méthylation de l'ADN montrent que *ddm1* et *ser1* présentent une résistance accrue alors que *ros1-4* présente une sensibilité accrue par rapport à la plante sauvage. Bien que ces résultats nécessitent d'être complétés par d'autres réplicats, il semblerait que la méthylation de l'ADN soit impliquée dans l'interaction plante – nématode à galles.

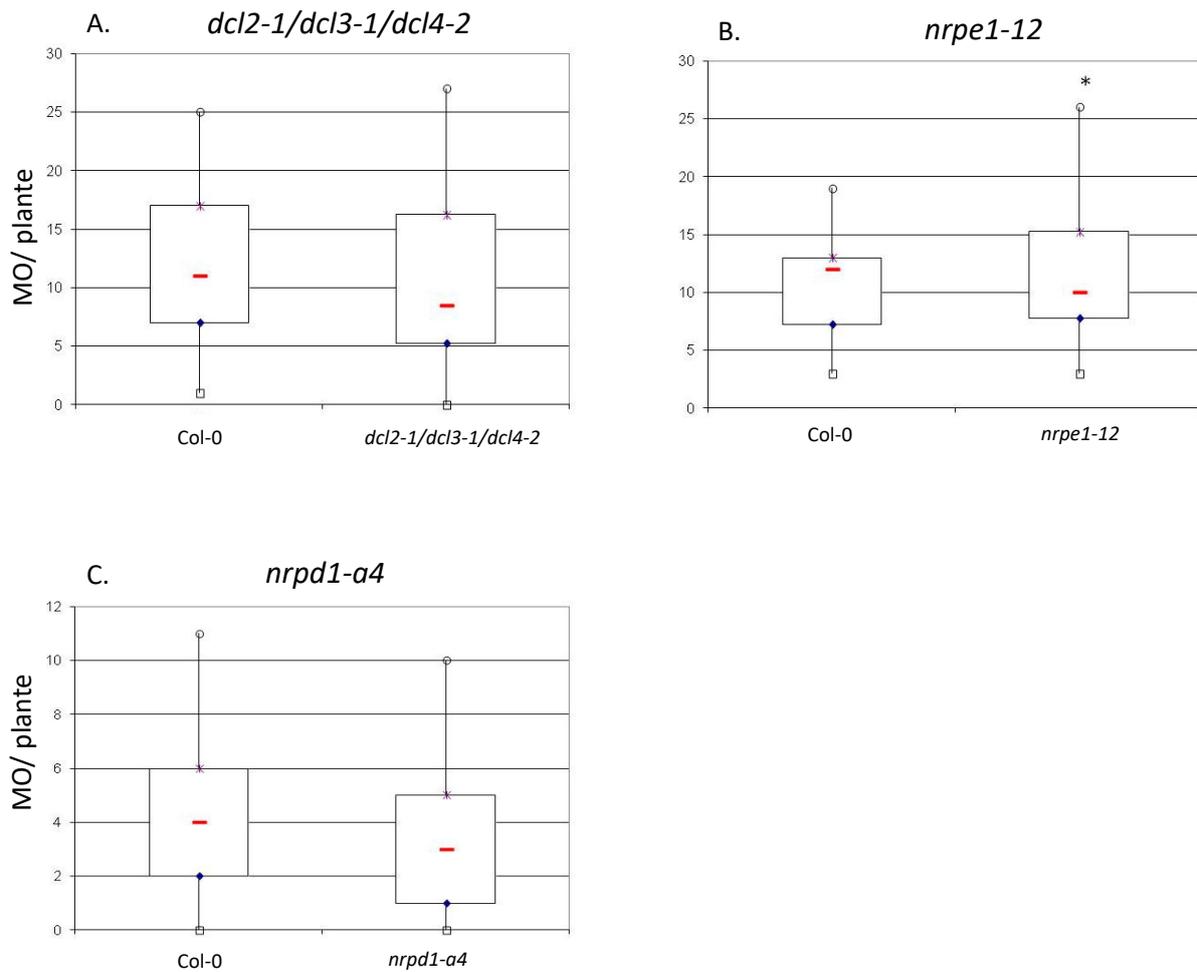


Figure 40: Résultats préliminaires d'analyse des mutants PTGS et TGS.

Les mutants PTGS/TGS d'*A. thaliana* : *dcl2-1/dcl3-1/dcl4-2* (A), mutants TGS : *nrpe1-12* (B), *nrpd1-a4* (C) et plantes sauvages Col-0 ont été infectés avec *M. incognita*. Les masses d'oeuf (MO) ont été comptés. Les tests statistiques unidirectionnels de Mann-Whitney ont été réalisés pour chaque expérimentation. *: différence significative par rapport à Col-0; $P < 0.05$.

Discussion et Perspectives

Discussion générale

L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse a permis de commencer à décrypter les régulations de l'expression génique dues aux petits ARN intervenant dans la formation et le maintien des galles d'*A. thaliana* induites par *M. incognita* (7 et 14 jai).

1. La régulation de la reprogrammation transcriptomique dans les galles induites par les nématodes à galles : choix de la problématique.

Le développement des études transcriptomiques a permis de commencer à décrypter les mécanismes moléculaires intervenant chez de nombreuses espèces de plantes lors de l'interaction plantes-nématodes phytoparasites (tomate, vigne, luzerne, soja, riz, arachide, tabac, bananier, *Cucumis metuliferus*) (Favery *et al.*, 2016). Ces analyses ont clairement montré que la formation des galles et des cellules géantes induites par les nématodes à galles était le résultat d'une vaste reprogrammation de l'expression génique des cellules de la racine. Des catalogues de gènes dont l'expression est modifiée lors de l'infection par les nématodes à galles ont été établis pour différentes espèces végétales. Bien que les fonctions biologiques commencent à être décryptées, très peu d'informations sont à ce jour connues sur les mécanismes régulant cette reprogrammation de l'expression génique. Chez les eucaryotes, l'expression génique est régulée par différents mécanismes : les facteurs de transcription, les modifications de la chromatine et les petits ARN régulateurs. Plusieurs analyses de transcriptomes ont identifié des facteurs de transcription comme différentiellement exprimés au cours de l'interaction plantes-nématodes à galles (Jammes *et al.*, 2005; Damiani *et al.*, 2012; de Sá *et al.*, 2012; Kyndt *et al.*, 2012; Guimaraes *et al.*, 2015). Ainsi 23 gènes codant pour des facteurs de transcription sont différentiellement exprimés à 7 jai chez *A. thaliana* (Jammes *et al.*, 2005). Toutefois, le nombre de gènes différentiellement exprimés correspondant aux facteurs de transcription est limité et probablement sous-évalué. Une explication serait qu'ils présentent souvent un faible niveau d'expression en dessous du seuil de sensibilité des puces à ADN. Un des facteurs de transcription étudié est *LBD16*, il est impliqué dans la formation des racines latérales et joue un rôle important dans la formation de la galle (Cabrera *et al.*, 2014b). Dans les racines infestées par *M. incognita*, le promoteur de *LBD16* est activé dans les primordia racinaires et dans les galles. La surexpression ou la répression de *LBD16* chez *A. thaliana* provoque une résistance de la plante qui présente une diminution du nombre de galles démontrant ainsi un rôle important dans la formation de la galle.

La régulation de l'expression génique par les petits ARN est un processus particulièrement important pour la compréhension des mécanismes moléculaires aboutissant à la formation de la galle car ils régulent l'expression de nombreux facteurs de transcription ainsi que certaines modifications de l'état de la chromatine. Néanmoins le rôle des petits ARN régulateurs et des modifications de la chromatine dans la formation de la galle restent peu explorés et en 2013, au début de ce projet de thèse, aucune étude n'avait été publiée sur ce sujet.

2. La machinerie petits ARN et l'interaction plantes nématodes

Nous avons vu dans l'introduction que les miARN, les hairpin siARN, les nat-siARN et les siARN secondaires (phasiARN et tasiARN) exercent des régulations de type PTGS alors que les hc-siARN et les easiARN exercent des régulations de type TGS (Borges & Martienssen, 2015). Les voies de ces catégories de petits ARN font intervenir des protéines différentes que ce soit pour la bioynthèse, la maturation ou l'activité du petit ARN (Bologna & Voinnet, 2014). Une approche permettant de déterminer quelles catégories de petits ARN sont impliquées dans un mécanisme donné est de tester les lignées d'*A. thaliana* présentant des mutations dans les gènes codant pour les acteurs clefs des voies des différentes catégories de petits ARN. Nous avons donc testé la réponse de 14 mutants à l'infection par les nématodes à galles couvrant toutes les différentes catégories de petits ARN (Fig. 41 et Annexe 2). Afin d'évaluer la réponse de ces plantes aux nématodes à galles nous avons compté les masses d'œufs produites à la surface des galles qui reflètent le bon développement du nématode et donc la fonctionnalité du site nourricier.

Une réduction significative du nombre de galles et de masse d'œufs i.e. une résistance accrue, a été constatée pour les mutants hypomorphes des gènes *ago1-27*, *ago1-25* et *rdr6-15*. Les gènes *AGO1* et *AGO2* codent pour les protéines ARGONAUTE 1 et 2 impliquées dans la régulation PTGS exercée par les miARN et certains siARN (Fig. 41). Par ailleurs, *RDR6* code pour une protéine impliquée dans la biosynthèse de siARN secondaires impliqués à la fois dans la PTGS et la TGS. Ces résultats montrent donc l'importance des régulations de type PTGS dans l'interaction plante - *M. incognita*. En revanche, les résultats des tests d'infestation des mutants de gènes clefs de la voie TGS : *RDR2*, *AGO4*, *DRM1* *DRM2* et les résultats préliminaires pour les mutants *nrpd1a*, *nrpe1* montrent que l'ensemble de ces mutants ne présentent pas de modifications statistiquement significatives de la susceptibilité aux nématodes à galles. Les résultats obtenus pour les mutants des gènes situés en aval de *RDR6* dans la voie TGS comme *AGO4*, *DRM1* et *DRM2* suggèrent donc que la résistance accrue observée pour le mutant *rdr6-15* serait liée aux siARN associés aux régulations de type PTGS plutôt qu'à ceux associés aux régulations de type TGS.

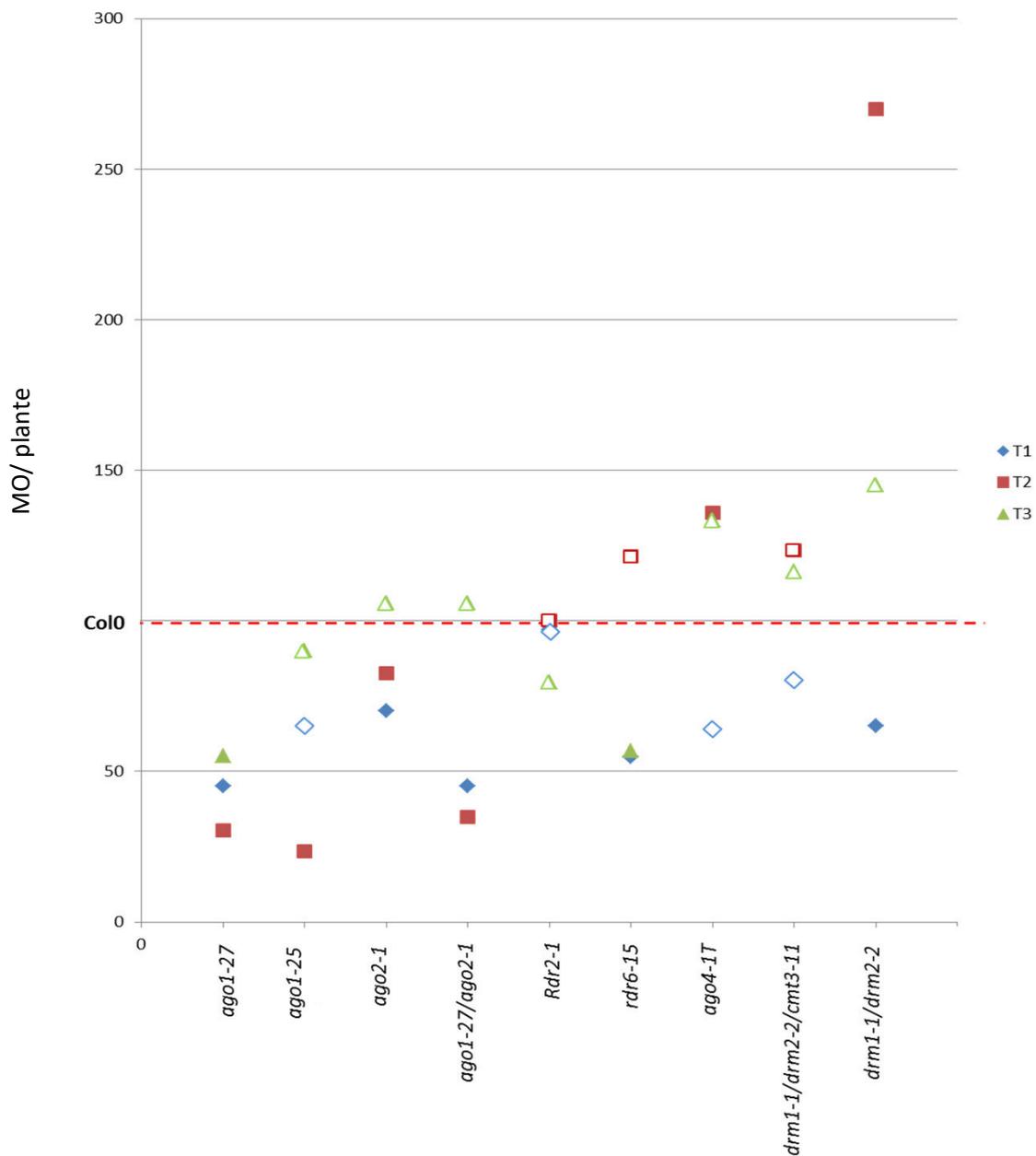


Fig. 41. Sensibilité des mutants PTGS et TGS à *Meloidogyne incognita* par rapport à la plante sauvage *Arabidopsis thaliana* écotype Col-0.

Les mutants PTGS (*ago1-27*, *ago1-25*, *ago2-1*, *ago1-27/ago2-1*), les mutants TGS (*rdr2-1*, *ago4-1T*, *drm1-1/drm2-2/cmt3-11*, *drm1-1/drm2-2*), les mutants PTGS/TGS (*rdr6-15*) et l'écotype sauvage Col-0 ont été inoculés avec des larves de *M. incognita*. La sensibilité relative a été déterminée par le comptage des masses d'œufs (MO) chez les mutants par rapport aux plantes sauvages. Trois test de résistance indépendants sont représentés par les différents symboles. Les symboles pleins indiquent les lignées mutantes qui sont significativement différentes des lignées sauvages selon le test unidirectionnel de Mann-Whitney ($P < 0.05$).

Ces résultats rejoignent ceux obtenus par Hewezi et al. (2008) dans le cadre de l'interaction *A. thaliana* – nématode à kystes. Différents mutants affectés dans les gènes de la biosynthèse des petits ARN: *RDR* et *DCL* ont été infectés par *H. schachtii*. Seul *rdr2-1* ne présente aucune modification du nombre de masses d'œufs n'a été constatée. Néanmoins les autres mutants présentent une tendance générale à la résistance mais cette tendance n'est pas statistiquement significative à l'exception du simple mutant *dcl2-1*, du double mutant *dcl2-1/dcl3-1* et du triple mutant *dcl2-1/dcl3-1/dcl4-2* qui présentent une réduction significative du nombre de nématodes femelles. Nous avons réalisé un premier test d'infestation avec le triple mutant *dcl2-1/dcl3-1/dcl4-2* qui n'a pas montré de différences significatives avec les plantes sauvages (Fig. 41). Toutefois, d'autres tests sont nécessaires pour étayer ce résultat.

L'absence de rôle majeur de la voie TGS dans la formation du site nourricier est surprenante. Toutefois, il est également surprenant que ces mutants de la voie TGS d'*A. thaliana* ne présentent pas de phénotypes développementaux drastiques comme c'est le cas des mutants perte de fonction des gènes clef de la voie PTGS dont le développement est souvent très altéré (Vaucheret *et al.*, 2004). La redondance fonctionnelle des acteurs des différentes voies des petits ARN pourrait expliquer cette absence de phénotype pour certains mutants de la voie TGS. En effet il a été montré que la régulation PTGS RDR6-dépendente des transgènes est exacerbée chez les mutants d'*A. thaliana* présentant une mutation dans le gène *RDR2* qui est normalement impliqué dans la voie TGS suggérant que ces deux enzymes sont en compétition pour convertir un même « pool » d'ARN simple brin en double brin (Jauvion *et al.*, 2012). Par ailleurs, il est également possible que les siARN associés à la voie TGS ne jouent pas un rôle majeur dans l'interaction *A. thaliana* – *M. incognita* mais apportent une contribution dont la part ne peut être évaluée statistiquement en raison de la forte variabilité des tests de résistance aux nématodes à galles. En effet la forte variabilité du nombre de galles et de masses d'œufs par plante constatée au sein d'un même test pour les plantes d'un même écotype pourrait masquer des effets modérés du point de vue statistique. Cette hypothèse est supportée par la tendance à l'hyper sensibilité à l'infection par les nématodes à galles observée pour la plupart des mutants de la voie TGS mais qui n'est pas confirmée par les analyses statistiques. Il est intéressant de noter que cette tendance globale non supportée statistiquement est observée dans les tests d'infestations de mutants de la TGS d'*A. thaliana* avec les nématodes à kystes (Hewezi *et al.* 2008). Toutefois les tendances observées sont opposées dans le cadre de l'interaction plantes-nématodes à galles et plantes-nématodes à kystes.

L'ensemble de nos résultats suggèrent donc que les régulations de type PTGS sont importantes dans l'interaction *A. thaliana* - *M. incognita* alors que les régulations de type TGS ne semblent pas avoir un rôle prépondérant. Parmi les régulations de type PTGS, la voie des miARN semble particulièrement

importante pour le développement des sites nourricier. Ce résultat est supporté par des résultats préliminaires montrant une très forte résistance du mutant du gène clef de la voie des miARN *SERRATE* (Annexe 2).

3. Caractérisation des miARN et des siARN : problématique et choix des outils d'analyses.

L'objectif de ce travail de thèse était donc de caractériser les petits ARN impliqués dans la formation des galles d'*A. thaliana* induites par *M. incognita*. Au cours de ce projet, trois études ont été publiées décrivant l'analyse des miARN lors de l'interaction plantes-nématodes à galles. La première étude parue en 2015 a permis d'identifier chez la tomate 263 miARN associés à la voie de l'acide jasmonique, une hormone impliquée dans la défense contre les nématodes, et différentiellement régulés dans les plantes entières lors de l'infection par *M. incognita* (Zhao *et al.*, 2015). L'analyse fonctionnelle de miR319 a montré que la régulation post-transcriptionnelle du gène codant pour le facteur de transcription TCP4 par ce miARN est impliquée dans la réponse systémique de la plante aux nématodes à galles. Une seconde étude à laquelle nous avons participé, a identifié 62 miARN différentiellement régulés dans les galles d'*A. thaliana* induites par *M. javanica* à 3 jai. De plus, cette étude a établi que la régulation du gène codant pour un facteur de transcription de réponse à l'auxine *ARF3* par les tasiRNA résultant de l'action de miR390 est nécessaire pour la formation de la galle (Cabrera *et al.*, 2016). Enfin une étude très récente, parue en avril 2017 relate des miARN différentiellement exprimés dans les galles de tomate sensible ou résistante infectés par *M. incognita* à cinq stades différents de développement (Kaur *et al.*, 2017). Au total, 281 nouveaux miARN ont été identifiés et 52 miARN conservés. Une corrélation négative des profils d'expressions a été établie entre des miARN conservés (miR156, miR159, miR164 et miR396) et leurs cibles (SBFP, GAMYB-like, NAC et GRF1).

Au démarrage de ce projet, plusieurs choix de techniques ont été faits concernant le matériel biologique, les techniques de séquençage utilisées et les paramètres d'analyse. Dans un premier temps, nous avons choisi le type de tissus à analyser. Comme présenté dans l'introduction, les études de la réponse de la plante aux nématodes à galles ont été réalisées à plusieurs échelles : la plante entière (Zhao *et al.*, 2015), la galle entière (Jammes *et al.*, 2005) et les cellules géantes (Barcala *et al.*, 2010). Des différences entre les analyses de transcriptomes des cellules géantes et des galles d'*A. thaliana* ont été mises en évidence avec 120 gènes différentiellement régulés dans les deux types de tissus (10%) et 1041 gènes spécifiquement régulés dans les galles ou les cellules géantes (90%) (Barcala *et al.*, 2010). En particulier, les gènes faiblement exprimés dans les cellules géantes ne sont pas détectés dans l'analyse du transcriptome des galles probablement dû à un effet de dilution des

transcrits des cellules géantes dans la galle (Portillo *et al.*, 2013). De plus, des processus biologiques fortement perturbés dans les cellules géantes, ne sont pas identifiés parmi les gènes régulés dans les galles. Par exemple dans les transcriptomes des cellules géantes de tomate, la catégorie de « Gene Ontology » « stress » contient une forte proportion de gènes réprimés alors que cette catégorie ne présente aucun gène différentiellement régulé dans les transcriptome de galles à 3 jai (Barcala *et al.*, 2010). Ce résultat montre que l'étude des cellules géantes et de la galle apportent des informations distinctes. Bien que les cellules géantes constituent l'élément central de la galle, les modifications induites par les nématodes s'étendent au-delà des cellules géantes puisque les cellules voisines situées autour des cellules géantes entrent également en division et certaines deviennent hypertrophiés (Berg *et al.*, 2008). La division des cellules voisines participe probablement à la croissance des cellules géantes en évitant que le tissu autour ne se rompe mais également en initiant un processus de différenciation vasculaire important pour le développement des cellules géantes (Bartlem *et al.*, 2014). Les cellules adjacentes ont un transcriptome qui est également modifié lors de l'interaction avec les nématodes à galles comme on peut le voir chez *M. truncatula* où 740 gènes sont différentiellement régulés à 7 jai dont 498 sont communs avec les cellules géantes (Damiani *et al.*, 2012). Nous avons donc fait le choix d'analyser la galle entière afin d'avoir une vue plus complète des changements moléculaires induits par le nématode et de pouvoir les comparer avec des données transcriptomiques obtenues à partir d'échantillons de galles aux même points de cinétiques. Les limites techniques ont également orienté ce choix car la micro-dissection de cellules est une technique coûteuse et lourde à mettre en place. Toutefois l'étude de galle entière implique un mélange de tissus appartenant au nématode et à la plante.

Par la suite, la technologie de séquençage haut débit SOLiD (Life Technologies) a été choisie pour le séquençage des petits ARN des galles et des racines. Cette technologie était présentée comme particulièrement adaptée à l'étude des petits ARN car chaque base de chaque séquence est vérifiée deux fois garantissant une meilleure qualité des séquences obtenues avec moins d'erreurs de séquençages que les technologies Illumina (Metzker, 2010). Toutefois ce choix implique une plus grande complexité pour l'analyse bioinformatique des séquences obtenues car les séquences sont encodées en couleurs et ne sont retranscrites en séquences nucléotidiques qu'après le positionnement sur un génome lui-même traduit en espace couleur.

J'ai donc caractérisé les populations de miARN et siARN exprimés dans les galles d'*A. thaliana* induites par *M. incognita* et dans les entre-nœuds de racines saines (tronçon racinaire compris entre l'émergence de deux racines) à 7 et 14 jai, deux étapes importantes de la formation de la galle : une phase active de mise en place des cellules géantes avec des divisions nucléaires sans cytokinèse (7 jai) et une phase de croissance et de maintien du site nourricier avec des phénomènes

était d'identifier les petits ARN de plantes dont l'expression varie significativement dans les galles. Le choix de ces deux points de cinétiques a également permis de comparer les résultats de l'analyse du séquençage de petits ARN aux données transcriptomiques de galles et de racines non inoculées d'*A. thaliana* précédemment obtenues au laboratoire ainsi (Jammes *et al.*, 2005).

3.1. Les miARN : des acteurs de la régulation plante – nématodes à galles.

3.1.1. Identification des miARN différentiellement exprimés dans les galles

Notre étude a permis d'établir un catalogue des miARN exprimés dans les galles et dans les racines saines et d'identifier les miARN différentiellement exprimés dans les galles à 7 et 14 jai. En complément de ce projet, la collaboration avec l'équipe de Carolina Escobar (Université Castilla-La Mancha, Tolède, Espagne) a permis de réaliser un travail similaire pour les miARN exprimés dans les galles induites par *M. javanica* à 3 jai (Cabrera *et al.*, 2016). L'ensemble de ces travaux a permis de construire une vision claire de l'expression des miARN lors de la formation des galles chez *Arabidopsis*. Au total, 62, 10 et 20 miARN ont été identifiés comme différentiellement exprimés dans les galles à 3, 7 et 14 jai respectivement. La différence importante du nombre de miARN différentiellement exprimés entre ces deux analyses à 3 jai et 7-14 jai est probablement due à la différence de méthodes statistiques employées: t-test pour les analyses à 3 jai et De-seq pour les analyses à 7 et 14 jai. A 3 jai, plus des trois-quarts des miARN sont réprimés dans les galles. Parmi les miARN différentiellement exprimés, la proportion de miARN surexprimés augmente de 18% à 50% et à 80% à 3, 7 et 14 jai respectivement. Ces résultats suggèrent qu'au cours du développement de la galle, il y aurait une induction progressive de l'expression des miARN. L'augmentation du nombre de miARN différentiellement régulés a également été observée lors de l'interaction entre *A. thaliana* et les nématodes à kystes avec 8 et 22 miARN différentiellement exprimés à 4 et 7 jai (Hewezi *et al.*, 2008).

Il est également intéressant de souligner que chez *A. thaliana* 6 familles de miARN (MIR163, miR167, miR319, miR390, miR399 et miR2111) sont différentiellement régulées à la fois à 3, 7 et 14 jai. Toutefois, seules les familles miR390 et miR399 ont les mêmes profils d'expression au cours du développement de la galle. La famille miR390 est surexprimée dans les galles à ces trois points et ceux de la famille MIR399 sont réprimés à 3, 7 et 14 jai.

L'expression des cibles prédites et validées *in vitro* pour les 24 miARN différentiellement régulés à 7 et 14 jai a été étudiée à partir des données de puces à ADN grâce à l'outil NEMATICS qui regroupent

les profils d'expression de plusieurs études transcriptomiques des interactions *A. thaliana* – nématodes phytoparasites (Cabrera *et al.*, 2014a). Du fait du mode d'action des miARN, était attendu un profil d'expression des miARN anti-corrélé avec celui de leurs cibles. Cette approche a montré des profils anti-corrélés uniquement pour 2 cibles à 7 jai et 3 cibles à 14 jai. Toutefois, l'analyse de transcriptome par hybridation de puces à ADN n'est pas la meilleure approche pour analyser l'action des miARN car i) en fonction de la localisation des sondes de la puce par rapport au site de clivage les produits issus du clivage des transcrits par les miARN peuvent s'hybrider aux sondes et être détectés comme les transcrits intacts et ii) de nombreuses cibles des miARN sont des facteurs de transcription dont la faible expression est difficilement détectable par ce types d'analyses comme le montre le faible nombre de cibles des miARN DE qui sont différentiellement exprimées dans les données NEMATICS (8 cibles à 7 et/ou 14 jai). Afin d'identifier les cibles de ces miARN dans les galles, la meilleure approche est de générer un dégradome à partir des galles d'*A. thaliana*. Cette approche repose dans un premier temps sur la sélection des ARNm grâce des billes sur lesquelles sont greffées des séquences d'oligo(dT) qui vont se lier aux queues polyA des ARNm à l'extrémité 3'. Des adaptateurs universels vont ensuite être utilisés pour se lier à l'extrémité 5' des ARNm. L'utilisation d'amorces complémentaires à l'adaptateur universel et des amorces oligo(dT) permettront d'amplifier les différentes séquences d'ARNm. Suite à l'amplification, le séquençage des amplicons permettra de déterminer si la séquence de l'ARNm est complète ou si elle a été clivée. Le séquençage du dégradome qui contient non seulement les transcrits mais également les produits de dégradation des transcrits permet d'identifier les produits de clivage résultant de l'action des miARN et donc la cible de ces miARN dans les galles (German *et al.*, 2008) ; (Addo-Quaye *et al.*, 2008). La génération d'un dégradome n'est cependant pas nécessaire lorsque l'on veut vérifier le clivage d'un petit nombre de cibles de miARN, dans ce cas là il est possible de réaliser une 5'RACE PCR qui repose sur le même principe que le dégradome mais avec des amorces spécifiques à l'extrémité 5' de la séquence que l'on cherche à détecter. Le séquençage de cette séquence permettra de démontrer si elle a été clivée ou non.

3.1.2. L'analyse de l'activité des promoteurs

Dans nos résultats, six miARN apparaissaient comme particulièrement intéressants en raison de leur conservation chez les plantes hôtes des nématodes à galles et leurs rôles décrits dans la bibliographie. En effet plusieurs miARN se distinguent comme miR167, miR164 et miR390 impliqués dans la réponse à l'auxine (Marin *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014), miR164 et miR319 impliqués dans la prolifération cellulaire (Palatnik *et al.*, 2003; Schommer *et al.*, 2014), miR167 et miR160 impliqués dans l'architecture racinaire (Gutierrez *et al.*, 2009; Bustos-Sanmamed *et al.*, 2013) et miR394

impliqué dans la différenciation cellulaire (Knauer *et al.*, 2013). Les profils d'activité des promoteurs de *MIR167a/b/c/d*, *MIR394b*, *MIR390a* et *MIR164c* et *MIR408* ont été analysés afin de confirmer ou infirmer les résultats obtenus en séquençage. Alors que les résultats obtenus suggèrent l'importance de miR394, miR167 et miR390 pour la formation de la galle, les résultats obtenus pour *pMIR164* ont révélé l'existence d'un potentiel biais dans notre dispositif expérimental.

L'utilisation de gène rapporteur a confirmé les résultats de séquençage en montrant que les promoteurs de *MIR167a* et *MIR167d* sont actifs dans les galles et les cellules géantes mais que seul le promoteur de *MIR167d* est surexprimé dans les galles par rapport aux racines saines. La famille des MiR167 a pour cible les transcrits de gènes codant pour les facteurs de transcription répondant à l'auxine *ARF6* et *ARF8* qui sont des inducteurs de l'expression des gènes de réponse à l'auxine (Liu *et al.*, 2014). L'auxine joue un rôle majeur dans la formation des racines et dans la formation des galles. La concentration en auxine augmente dans les galles induites par les nématodes à galles (Balasubramanian & Rangaswami, 1962) et des analyses de spectrométrie de masse ont également permis de détecter la présence d'auxine dans les sécrétions d'*H. schachtii* et de *M. incognita* (De Meutter *et al.*, 2005). L'activation de DR5, un senseur de l'auxine, est visible très tôt dans le développement des cellules géantes et dans les cellules voisines (Cabrera *et al.*, 2014b). De plus, le mutant de tomate insensible à l'auxine *diaegotropica* présente une résistance à *M. incognita* (Goverse *et al.*, 2000). Un des exemples qui illustre le mieux le lien entre le développement de galles et le développement racinaire est le facteur de transcription LBD16, essentiel pour le développement des galles et des racines latérales et dont l'expression est régulée par l'auxine (Cabrera *et al.*, 2014b). Par ailleurs, un second miARN impliqué dans la voie auxinique, miR390 est impliqué dans la formation de la galle via les siARN secondaires issus du gène *TAS3*. Ces siARN secondaires induisent la répression post-transcriptionnelle du facteur de transcription de réponse à l'auxine *ARF3* (Cabrera *et al.*, 2016). L'analyse de l'activité des promoteurs de *MIR390a* et *TAS3* que j'ai réalisée montre un signal dans les galles à 5 et 7 jai ainsi que dans les apex et primordia racinaires des racines infectées et non infectées pour *pMIR390* et un pattern similaire à 7 et 14 jai pour *pTAS3*. Il est intéressant de signaler que miR167 présente des similarités avec miR390 puisque ces deux miARN ciblent des transcrits de gènes de la famille des ARF. Ces deux miARN sont également impliqués dans l'architecture racinaire : miR390 intervenant dans la formation des racines latérales (Marin *et al.*, 2010) et miR167 dans la formation de racines adventives (Gutierrez *et al.*, 2009, 2012). Les résultats de l'analyse de promoteurs et du séquençage suggèrent donc que miR167d et miR390 pourraient être impliqués dans la formation de la galle. Ce rôle pour miR390 a été confirmé dans l'étude de Cabrera *et al.* 2016 où le mutant *miR390a-2* présente une résistance accrue aux nématodes à galles.

L'analyse de l'activité du promoteur de *MIR394b* confirme la surexpression dans les galles observée en séquençage et montre que ce gène est exprimé fortement dans les galles à 14 jai. Comme nous l'avons présenté en introduction, les miARN de la famille miR394 sont impliqués dans le maintien de l'état indifférencié des cellules méristématiques du méristème apical foliaire. Ces miARN ciblent les transcrits du gène LEAF CURLING RESPONSIVENESS (*LCR*) et cette répression permet au facteur de transcription WUSCHEL de réguler l'identité méristématique en activant l'expression du gène *CLAVATA3*. Le peptide CLAVATA 3 réprime à son tour WUSCHEL générant ainsi une boucle de contrôle négative qui serait à l'origine du maintien d'un petit groupe de cellules à l'état indifférencié (Knauer *et al.*, 2013). Il a été montré que le nématode à kyste *H. glycines* sécrète une protéine Hg-SYV46 qui présente des motifs structuraux communs avec le peptide de plante CLAVATA3. Les nématodes à kystes dont les transcrits de Hg-SYV46 ont été réprimés par ARNi présentent une diminution du nombre de femelles (Bakhetia *et al.*, 2007). La surexpression de Hg-SYV46 chez les mutants *clv3* complète le phénotype alors que la surexpression de Hg-SYV46 chez une plante sauvage induit une forte répression de l'expression de *WUSCHEL* comme c'est le cas pour la surexpression de *CLAVATA3* (Wang *et al.*, 2005b). De même chez les nématodes à galles, le gène 16D10 présent chez *M. incognita* code pour un peptide de sécrétion de type CLAVATA3/ESR-related (CLE) (Huang *et al.*, 2006b). L'expression *in planta* d'un ARN double brin correspondant à 16D10 chez *A. thaliana* provoque une augmentation de la résistance aux nématodes à galles. De plus, la surexpression de 16D10, qui interagit directement avec deux facteurs de transcription SCARECROW-like ne complète pas le phénotype du mutant *clv3* mais stimule la croissance des racines chez *A. thaliana* et le tabac (Huang *et al.*, 2006b). Ces résultats montrent que les miARN de la famille miR394 sont des candidats particulièrement intéressants pour intervenir lors de la formation de la galle en raison de i) leur fonction de contrôle de l'état de différenciation des cellules et ii) du rôle établi du gène de la plante *CLAVATA3* dans l'interaction plantes-nématodes. La surexpression de *MIR394b* observée dans les galles pourrait entraîner la répression de *LCR* comme c'est le cas dans les méristèmes apicaux et contraindre la cellule végétale à quitter l'identité cellulaire à laquelle elle appartient et de se rapprocher de celui des cellules méristématiques dans lesquelles la division et l'élongation cellulaire est particulièrement active. La surexpression de *MIR394* pourrait donc participer au mécanisme de dédifférenciation des cellules racinaires lors de l'induction des cellules géantes.

MiR408 est un miARN régulant l'expression de gènes codant pour des « copper binding proteins », des plantacyanines et des laccases. Il est impliqué dans la réponse des plantes à de très nombreux stress abiotiques (Ma *et al.*, 2015). L'analyse de l'activité du promoteur de *MIR408* a confirmé la surexpression dans les galles observée dans les données de séquençage suggérant que ce miARN

pourrait intervenir dans l'interaction plante-nématode à galles. Toutefois, les tests d'infection réalisés avec les mutants d'*A. thaliana* surexprimant ou perte de fonction de *MIR408* n'ont pas montré de modifications de la réponse de la plante à l'infection par les nématodes à galles. Bien que les données d'expression suggèrent que ce miARN pourrait être impliqué dans la formation de la galle, les résultats des tests d'infestation ne confirment pas cette hypothèse et montrent que ce miARN n'a pas de rôle majeur dans la formation des galles ou aurait une redondance fonctionnelle de ses cibles.

A l'inverse des résultats obtenus pour les promoteurs de *miR167* et *miR394*, l'analyse de l'activité du promoteur de *MIR164* n'a pas confirmé les résultats du séquençage et a révélé un possible biais dans notre analyse. Ce miARN semblait un candidat intéressant pour la formation des galles puisque *miR164* est impliqué dans la prolifération cellulaire de la feuille et participe à la régulation de la production de racines latérales en ciblant les facteurs de transcriptions *NAC* (Guo *et al.*, 2005). L'analyse de *pMIR164c* montre une très forte activité dans les galles à 7 et 14 jai alors que le séquençage montre que la forme mûre de *miR164c* est moins abondante dans les galles que dans les racines non inoculées à 7 et 14 jai. Dans les racines non inoculées, l'analyse de l'activité de *pMIR164* montre un signal modéré dans les racines primaires et un très fort signal dans les racines secondaires. Lors de l'échantillonnage du matériel biologique pour le séquençage, les entrenœuds racinaires ont été prélevés à partir des racines primaires mais aussi beaucoup à partir des racines secondaires. Cet échantillonnage peut donc introduire un biais dans nos analyses.

L'analyse de l'activité des promoteurs de miARN identifiés comme différentiellement exprimés lors du séquençage constitue donc une validation importante des données de séquençage.

L'ensemble de nos résultats et des données bibliographiques suggèrent donc que les familles *miR167* et *miR394* sont des candidats particulièrement intéressants pour intervenir dans la formation des galles. Les analyses de transcriptomes de galles par puces à ADN n'ont pas permis de mettre en évidence de répression dans les galles à 7 et 14 jai des transcrit du gène *LCR* ciblé par *miR394* ou des transcrits des gènes *ARF6* et *ARF8* ciblé par *miR167*. Toutefois comme nous l'avons vu précédemment, les analyses par puces à ADN ne sont pas optimales pour analyser l'expression des cibles des miARN. De plus il est important de souligner que l'analyse du promoteur d'un gène *MIR* peut ne pas refléter la localisation du miARN mature, car certains miARN sont décrits comme mobiles (Furuta *et al.*, 2012). Ainsi, dans le méristème apical caulinaire, le gène *MIR394* est exprimé dans la couche L1 du méristème foliaire et la forme *miR394* mature agit dans la couche L2 (Knauer *et al.* 2013). Les résultats obtenus par analyse d'activité de promoteurs nécessitent donc d'être confirmés par une technique comme l'hybridation *in situ* permettant la localisation des formes mûres des

miARN. Par ailleurs, comme nous l'avons vu avec miR408, ces résultats de localisation nécessitent d'être confirmés par des analyses fonctionnelles de mutants pour démontrer le rôle de ces miARN dans l'interaction plante- nématodes à galles.

3.2. Analyse fonctionnelle des miARN régulés

Afin de déterminer la fonction des miARN différentiellement exprimés dans les galles nous avons réalisés des tests d'infestation avec les mutants de ces miARN décrits dans la bibliographie lorsque nous avons pu les obtenir. Afin d'être le plus exhaustif possible nous avons testés tous les mutants disponibles pour les miARN conservés et DE dans les galles sans nous restreindre à ceux qui avaient été confirmés par l'analyse de promoteurs. La plupart des miARN différentiellement exprimés appartenant à des familles multigéniques et les différents membres d'une même famille partageant souvent les mêmes cibles, nous avons privilégié l'utilisation de mutants KO ou « target mimicry » pour l'ensemble des membres d'une famille de miARN et des surexprimeurs afin d'étudier l'ensemble de la famille et éviter les problèmes de redondance fonctionnelle. Comme on a pu le voir pour miR408, la majorité des mutants testés ne présentent pas de modification statistiquement significative de la réponse à l'infection. C'est le cas des mutants surexprimeurs de *MIR398c*, *MIR319a* et *MIR399b* et c. Ces résultats suggèrent donc que ces miARN n'ont pas de rôle majeur dans l'interaction plantes-nématodes. MiR319 constitue une famille de miARN très conservée que l'on retrouve dans de très nombreuses espèces végétales. Il est particulièrement étonnant que le mutant surexporteur de *MIR319a* ne présente pas de réponse modifiée à l'infestation par *M. incognita* car la surexpression d'*At-MIR319a* chez la tomate entraîne une augmentation du nombre de galles reflétant une augmentation de la sensibilité (Zhao *et al.*, 2015). La grande polyphagie des nématodes suggère que les mécanismes moléculaires de la plante aboutissant à la formation de la galle sont conservés dans le règne végétal. On pourrait donc s'attendre que la surexpression d'un miARN conservé engendre les mêmes effets sur la réponse aux nématodes à galles chez la tomate et *A thaliana*.

4. miR159 un nouvel élément de l'interaction plante - nématodes à galles.

Les tests d'infestation réalisés avec le triple mutant *mir159abc* présentant une perte de fonction pour l'ensemble de la famille miR159 montrent une résistance accrue de ce mutant à l'infestation par les nématodes à galles. Néanmoins, ce résultat reflète les conséquences de la mutation de *MIR159* dans l'interaction plante-nématodes à galles mais ne donnent pas d'informations supplémentaires relatives aux conséquences de la mutation sur la formation de la galle ou la mise en place des défenses. Il serait donc intéressant dans un premier temps de phénotyper les galles en réalisant des coupes afin de mesurer leurs tailles et d'observer le développement des cellules géantes. Le phénotypage 3D de la galle est une stratégie qui permet d'analyser une augmentation ou réduction du volume des cellules géantes (Cabrera *et al.*, 2015). Enfin l'analyse du niveau d'expression des gènes impliqués dans différentes voies défenses aux stress biotiques permettrait de relier le phénotype à l'expression spécifique de gènes de défense

De plus, la localisation des formes mûres de miR159 par hybridation *in situ* a confirmé l'expression de ces miARN dans les galles. Les données de séquençage ont identifié *mir159a* et *mir159c* comme étant surexprimés dans les galles à 14 jai. Les miARN de la famille miR159 ciblent les facteurs de transcription de la famille GAMYB impliqués dans la floraison et dans la fertilité mâle (Palatnik *et al.*, 2003; Achard *et al.*, 2004; Millar & Gubler, 2005). Les trois gènes de la famille miR159 partagent de nombreuses cibles communes. En dépit de leur grande similarité de séquences, ils possèdent également des cibles spécifiques. Ainsi les facteurs de transcriptions *TCP* dont deux des cinq gènes de cette famille sont clivés spécifiquement par miR159c (Palatnik *et al.*, 2007). Les résultats de séquençage montrent que les deux formes de miR159 (a et c) sont surexprimés dans les galles mais que miR159c est la forme majoritaire dans les galles et les racines. Ce résultat est particulièrement intéressant car chez *A. thaliana*, les études de la famille miR159 réalisées jusqu'à ce jour indiquent que *MIR159c* est très faiblement exprimée comparée à *MIR159a* et *MIR159b* dans le méristème apical (Rajagopalan *et al.*, 2006; Allen *et al.*, 2010). De plus, l'analyse des mutants perte de fonction *mir159abc*, *mir159ab* et *mir159c* a montré *mir159a* et *mir159b* ont des redondances fonctionnelles alors qu'aucun rôle n'avait pu être établi pour *mir159c* (Allen *et al.*, 2007; Alonso-Peral *et al.*, 2010). La forte expression de miR159c détectée dans les racines et les galles en séquençage indique donc que le gène *MIR159c* pourrait donc jouer un rôle spécifique dans les racines. D'autre part *MIR159a* et *c* sont surexprimés à 14 jai dans la galle alors que *mir159c* est réprimé à 7 et 14 jai. Les miARN de la famille miR159 sont très proches de la famille miR319 avec laquelle ils partagent 17 nucléotides communs et certaines cibles de la famille des *MYB* et *TCP* peuvent être régulés par ces deux familles (Palatnik *et al.*, 2007).

Différents gènes *MYB* ont été montrés comme réprimés à 3 jai dans les galles de tomates et de riz mais surexprimés dans les galles d'*A. thaliana* à 7 jai (Jammes *et al.*, 2005; Barcala *et al.*, 2010; Kyndt *et al.*, 2012). Nos résultats d'analyse de la fusion traductionnelle pMYB33::MYB33::GUS montrent que dans les galles, l'expression de *MYB33* est inversement corrélée à l'expression de *MIR159a* et *MIR159c* observée en séquençage. *MYB33* est un gène impliqué notamment dans la signalisation de l'acide gibbérellique dans l'aleurone de la graine (Skriver *et al.*, 1991; Lanahan *et al.*, 1992; Gubler & Jacobsen, 1992), dans le développement des anthères (Millar & Gubler, 2005) et dans le processus de mort cellulaire (Alonso-Peral *et al.*, 2010). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que la famille miR159 joue un rôle au cours du développement de la galle via la répression de l'expression de *MYB33*. Toutefois, des expériences complémentaires d'analyses d'activité des promoteurs et d'identification de l'ensemble des cibles de miR159 dans les galles sont nécessaires pour décrypter le rôle des différents membres de cette famille de miARN dans la formation de la galle.

5. Accumulation différentielle des siARN dans les galles induites par les nématodes à galles.

Les siARN constituent la deuxième grande sous famille des petits ARN régulateurs. Les siARN présentent une classification complexe et leur étude nécessite une analyse *de novo* à l'échelle du génome pour chaque condition biologique analysée. Afin de réaliser cette analyse à l'échelle du génome j'ai choisi d'utiliser l'outil bioinformatique Shortstack (Axtell *et al.* 2013), qui i) prédit *de novo* les zones du génome correspondant à des zones qui accumulent les petits ARN, appelées « clusters » et ii) effectue le comptage des séquences correspondant à ces clusters entre les conditions galles et racines. Cet algorithme réalise donc des analyses de clustering et ne compare pas les taux d'expression de séquences uniques. Shortstack a été mis au point sur *A. thaliana*, la tomate, le maïs et le riz et est particulièrement adapté pour l'analyse des siARN de plantes. En plus de la prédiction des clusters générant des siARN, Shortstack fournit également différentes informations sur les populations de petits ARN de chaque cluster incluant par exemple la probabilité que ce cluster soit le résultat d'une maturation par une enzyme de type DICER (DicerCall), l'estimation du taux de « phasing », la distribution des tailles, la position sur le brin, la séquence la plus représentée au locus etc. Dans un premier temps, afin d'être le plus exhaustif possible Shortstack a été utilisé avec les paramètres par défaut dont le taux minimal de « reads » nécessaire pour définir un cluster qui est fixé à 5, comme c'est le cas de plusieurs autres analyses de siARN (Kasschau *et al.*, 2007; Coruh *et al.*, 2015). Une fois les clusters de siARN prédits, un premier filtre a été imposé afin d'augmenter la robustesse de ces prédictions en sélectionnant uniquement les clusters présents dans au moins deux banques sur les trois dans au moins une des deux conditions (galles ou racines), comme cela a été

décrit pour l'identification par Shortstack des clusters de siARN chez *Physcomitrella patens* (Coruh *et al.*, 2015). Cette approche nous a permis d'identifier un grand nombre de clusters dans les galles et dans les racines saines. Toutefois, une différence très nette est observée entre ces deux conditions avec un nombre de clusters prédits dans les banques « racines non inoculées » très inférieur à celui des galles. De plus, cette tendance est encore accrue avec la proportion de clusters ayant un DicerCall. Les clusters prédits auquel un DicerCall est attribué présentent une population de séquences dont plus de 80% ont la taille canonique de siARN (entre 20 et 24 nt). Le même déséquilibre de l'effectif des clusters de siARN prédits entre galles et racines a été observé dans les analyses Shortstack réalisés à partir des données de séquençage des petits ARN de galles et de racines saines à 3 jai générés par l'équipe de Carolina Escobar (Tolède, Espagne). De plus, j'ai vérifié si ce nombre supérieur de clusters dans les galles ne serait pas dû à un simple fractionnement des clusters en clusters plus petits. Toutefois, la taille des clusters ne semble pas représenter une variation importante entre les conditions « galles » et « racines saines » n'indiquant pas un biais de prédiction dans un échantillon. Cette surreprésentation du nombre de clusters prédits dans les galles suit la tendance observée pour les séquences, avec une population de séquences de 23-24 nt nettement supérieure dans les galles par rapport aux racines saines observée à 3, 7 et 14 jai. En revanche ce déséquilibre n'est pas observé pour les séquences de 20-22 nt. Il semble donc que ce déséquilibre des séquences de 23 – 24 nt soit caractéristique des galles. Cette surreprésentation des séquences de 23-24nt est la raison pour laquelle la grande majorité des clusters prédits dans les galles ont un DicerCall de 23-24nt

Une analyse statistique Deseq a permis d'identifier les clusters différentiellement régulés entre les conditions galles et racines (Anders & Huber, 2010). Toujours dans la même intention d'obtenir des données les plus robustes possibles, la stringence de notre analyse a été augmentée en sélectionnant uniquement les clusters différentiellement régulés qui i) présentaient un DicerCall et ii) présentaient un minimum d'expression de 2 reads par millions mappées (rpmm) dans l'ensemble des trois banques pour au moins une condition (galle ou racine). La sélection par le DicerCall présente l'avantage d'éliminer les clusters qui accumulent majoritairement des séquences supérieures ou inférieures à la gamme 20–24 nt correspondant probablement à des produits de dégradation des ARN. Le DicerCall indique d'une part si le cluster contient plus de 80 % des reads entre la gamme 20–24 nt et si c'est le cas il indique également la taille majoritaire des séquences du cluster. Toutefois, cette taille majoritaire peut masquer l'hétérogénéité du cluster puisqu'elle n'indique pas dans la proportion correspondant à cette taille majoritaire et comment se répartissent les tailles des autres séquences dans la gamme 20-24nt.

Le second filtre qui fixe un seuil minimum d'expression permet d'éliminer les clusters avec une densité en petits ARN très faible qui n'ont probablement pas de réalité biologique et qui sont en grandes proportions dans notre analyse. Cette stratégie d'augmentation de la stringence des analyses est supportée par les dernières versions de Shortstack (3.7 et 3.8) dans lesquelles le seuil minimum du nombre de reads (mincov) à partir duquel un cluster est défini a été rehaussée de 5 à 20 reads.

L'application de ces filtres aboutit à l'identification de clusters dont la prédiction repose sur 1/ des résultats reproductibles dans les différentes banques, 2/un nombre significatif de séquences (supérieur à 2rpm) et 3/ une forte probabilité d'être issu d'un clivage par DICER (DicerCall), dans les trois réplicats d'une des bibliothèques galls ou racines. L'ensemble des clusters répondant à ces critères dans les différentes conditions ont été regroupés en une seule liste qui constitue un set de référence afin de procéder à l'étape de comptage.

5.1. Les siARN associés aux régulations de PTGS.

Pour l'analyse des natsiARN, des tasiARN et des phasiARN notre étude a été restreinte aux clusters de siARN prédits différentiellement exprimés dans les galls et ciblant le corps des gènes. Dans un premier temps, j'ai regardé si les gènes ciblés par des clusters prédits correspondaient à des gènes définis comme étant des « natural antisenses » (NAT) dans le génome d'*A. thaliana* (TAIR10). Les nat-siRNA générés à partir des transcrits d'un des deux gènes d'une paire de gènes NATs ciblent la dégradation des transcrits du deuxième gène dans une boucle de régulation (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006). Pour chaque gène NAT correspondant à un cluster de siARN, j'ai extrait le profil d'expression du second gène de la paire de NAT correspondante dans les données d'analyse de puces à ADN référencées dans la base de données NEMATICS (Cabrera *et al.*, 2014a) et recherché des profils anticorrélés d'expression entre le cluster de siARN et le gène complémentaire. En théorie, les deux gènes partageant une séquence complémentaire devraient avoir des profils anticorrélés (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2013b). Parmi les 297 et 96 couples de gènes trans-NAT dont un des deux gènes est ciblé par un cluster à 7 et 14 j'ai respectivement, aucun couple ne présente de profils anticorrélés. De la même façon, parmi les 524 et 175 couples de gènes cis-NAT dont un des deux gènes est ciblé par un cluster à 7 et 14 j'ai respectivement, aucun couple ne présente de profils anticorrélés. Ainsi aucune anti-corrélation n'a pu être mise en évidence à partir de ces données permettant de supporter que les clusters de siARN prédits pourraient être des NAT-siARN. Toutefois, parmi les 1092 couples de gènes NAT analysés, seuls 54 couples possèdent un des deux gènes avec une expression différentielle dans les galls d'après les analyses de puces à ADN, limitant donc cette analyse de profil d'expression anti-corrélé. Il serait donc intéressant de réitérer cette analyse avec de

nouvelles analyses de transcriptomes plus exhaustives basées sur les nouvelles technologies de séquençage. Cependant la majorité des clusters prédits correspondant à un NAT présentent un DicerCall de 23 ou 24 nt, ce qui ne correspond pas à la taille canonique des NAT-siARN. Il est donc fort probable que ces clusters prédits ne soient pas des zones génératrices de NAT-siARN.

De la même façon, je me suis intéressée aux gènes *TAS* présents chez *A. thaliana* afin de voir s'ils étaient couverts par des clusters de siARN prédits et différentiellement exprimés, afin de rechercher des clusters générant des tasiARN. Aucun gène *TAS* ne correspond à un cluster différentiellement exprimé. Ce résultat est surprenant car l'équipe de Carolina Escobar (Université de Tolède ; Espagne) a mis en évidence le rôle du module miR390/TAS3/ARF dans la formation de la galle (Cabrera *et al.*, 2016) et miR390 est un miARN surexprimé à 7 et 14 jai dans nos données de séquençage.

Enfin la famille des phasiRNA a également été étudiée. Nous avons utilisé une des données fournies par Shortstack qui indique la probabilité pour chaque cluster d'être associé à une population de siARN phasés. Le programme Shortstack n'a identifié aucun cluster associé à des phasiRNA avec un score suffisamment robuste (entre le 95^{ème} et le 99^{ème} percentile). Ce résultat n'est toutefois pas surprenant car chez *A. thaliana* les phasiRNA sont peu répandus et se limitent aux 4 gènes *TAS* (Fei *et al.*, 2013). Toutefois, la méthode d'analyse de « phasing » réalisée par Shortstack a été modifiée dans les dernières versions de Shortstack 3.7 et 3.8. Il serait donc intéressant de relancer cette analyse avec la dernière version.

L'ensemble de ces analyses ne semblent pas mettre en évidence des siARN associés aux régulations par PTGS. Pourtant, l'analyse du mutant *rdr6-15* impliqué dans la biosynthèse de ces siARN suggère l'importance de la voie des siARN associés au PTGS dans la formation de la galle. Il est possible que l'analyse statistique de l'expression différentielle des clusters de siARN associés au PTGS ait été biaisée par la présence massive des séquences de 23-24 nt traditionnellement associées au TGS et largement supérieure à la proportion des séquences de 20-21-22 nt (d'un facteur supérieur à 2). Il est possible que cela crée un biais dans l'analyse statistique et masque les clusters de siARN de 20-22nt différentiellement régulés qui représentent moins de 1,3% dans nos analyses. Il serait donc intéressant de traiter séparément les séquences de 20-21-22 nt et de 23-24 nt pour les analyses statistiques. Par ailleurs, il est possible que l'analyse de clustering réalisée par Shortstack ne soit pas la plus adaptée pour l'analyse des NAT-siARN. En effet, il a été observé dans certains cas pour les NAT-siARN qu'une seule séquence unique est surexprimée, formant ainsi un pic d'accumulation (Zhang *et al.*, 2012). Nos analyses de clustering ne sont pas optimales pour détecter ces pics d'accumulation car un pic présent dans un cluster dans la condition A n'apparaîtra pas

différentiellement exprimé si dans la condition B ce cluster accumulent un nombre similaire de séquences mais réparties sur toute la longueur du cluster. Dans ce cas, la séquence majoritairement accumulée dans la condition A ne sera pas retenue lors de l'analyse statistique. Il serait donc intéressant d'utiliser une autre approche afin d'éviter ce biais pour les NAT-siARN. Le clustering est cependant bien adapté aux hc-siARN de 24 nt, une taille que l'on retrouve en grande proportions sur nos clusters.

5.2. Les siARN liés aux régulations TGS

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les hc-siARN associés aux régulations de type TGS ciblent majoritairement les régions promotrices bien que quelques exemples montrent que les hc-siARN peuvent cibler des introns dans le corps du gène (Matzke *et al.*, 2009; Zhong *et al.*, 2012). Pour l'étude des hc-siARN nous avons donc fait le choix de cibler notre analyse sur deux catégories de clusters de siARN prédits : ceux qui ciblent les corps des gènes et ceux qui ciblent des régions promotrices. Afin de sélectionner les clusters prédits dont l'action régulatrice est supportée par des évidences biologiques, nous avons restreint notre étude aux clusters prédits DE avec un DicerCall de 23-24 qui couvrent des régions promotrices ou les corps de gènes DE dans les galles dans les analyses de puces à ADN et qui présentent un profil d'expression anti-corrélé avec les clusters correspondant. Toutefois cette stratégie est très restrictive car seul 2,5% et 3% des gènes couverts par un cluster dans le corps du gène ou dans leur région promotrice présente une régulation transcriptomique dans les données de puces à ADN : seuls des clusters différenciellement exprimés ciblent le corps des gènes à 7 et 14 jai respectivement et présentent une expression différentielle dans les galles d'après NEMATICS. De même, seuls 5% et 6,5% des clusters différenciellement exprimés ciblent la région promotrice à 7 et 14 jai respectivement et présentent une expression différentielle dans les galles d'après NEMATICS. Parmi ces 2,5% et 3% se distinguent des gènes surexprimés codant pour des facteurs de transcriptions impliqué dans la développement d'organes comme NAC, AGAMOUS, CLAVATA3/ESR-RELATED 2, (CLE2), des protéines de résistances de type NBS-LRR, des microtubule-associated protein 18 (MAP18) et des gènes réprimés codant pour des expansines, des pectate lyase-like, des gènes pouvant participer à l'architecture et la forme des cellules géantes.

Parmi les gènes DE dans les galles, ciblés par des clusters de siARN et présentant des profils d'expression anticorrélés avec Leur cluster, on note la présence du gène *WRKY22* dont la région promotrice a été décrite comme étant ciblée par des siARN et la RdDM et qui est impliqué dans les défenses basales de type PTI (Yu *et al.*, 2013a).

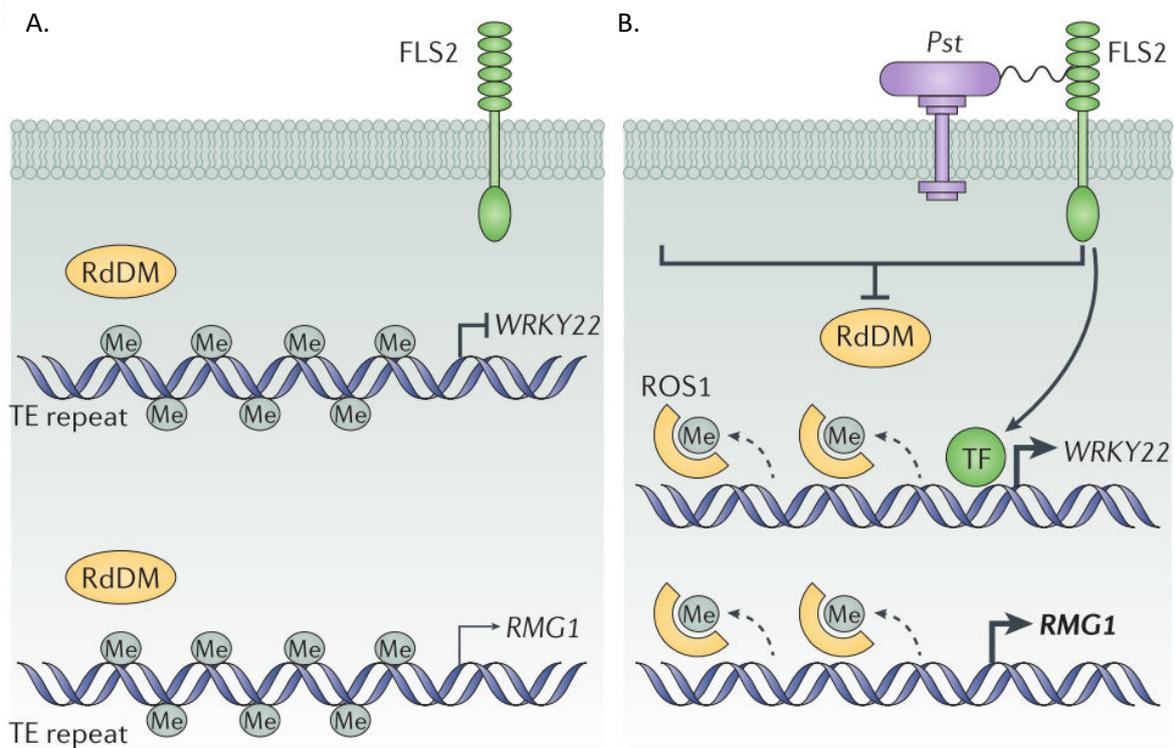


Fig. 42: Profils de méthylation et expression de *RMG1* (A) et *WRKY22* (B) en condition “non traité” et traité avec la flagelline flg22.

- A. *WRKY22* et *RMG1* présentent dans leur région promotrice, des éléments transposables (TE) qui sont ciblées par la RdDM. En absence d’infection, la méthylation de l’ADN réprime la transcription de *WRKY22* et *RMG1*.
- B. En cas d’infection par la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Pst) deux mécanismes de illustrés par les exemples de *WRKY22* et de *RMG1* permettent le déclenchement de la PTI. Dans le cas de *WRKY22*, deux processus induisent la transcription du gène: la répression de la RdDM par la bactérie et la déméthylation de la région promotrice par la déméthylase ROS1 permettant la fixation d’un facteur de transcription. Dans le cas de *RMG1*, l’activation de la transcription du gène est due à la répression de la RdDM par la bactérie et à une éventuelle déméthylation indépendante de ROS1.

L’infection bactérienne induit donc la PTI via la déméthylation des régions promotrices des gènes de défense. Cette déméthylation est due à une modification de la RdDM et/ou l’action de déméthylase dont ROS1. Me, methylated cytosine; TE, transposable element; TF, transcription factor; FLS2, FLAGELLIN-SENSITIVE 2

(D’après Pumplin & Voinnet al. 2013)

5.3. Identification de gènes impliqués dans la réponse de type PTI potentiellement réprimés par les mécanismes de la RdDM au cours de l'interaction plante - nématode à galles

Les stress biotiques induisent chez les plantes des réponses de défense et notamment l'induction de la PTI. Yu et al. (2013) ont mis en évidence deux mécanismes de régulation transcriptionnelle, impliquant des siARN, de gènes impliqués dans la réponse aux stress biotiques et en particulier à la réponse au traitement par le peptide flg22 dérivé de la flagelline bactérienne. Ces deux mécanismes sont illustrés par deux exemples : le gène *RMG1* et *WRKY22* (Fig. 42).

Le gène *Resistance Methylated Gene 1 (RMG1)* est un gène de résistance qui contient deux éléments transposables de type « hélitron » dans sa région promotrice. En condition contrôle (plantes saines), la région promotrice est ciblée par des hc siARN qui induisent sa méthylation par un mécanisme de RdDM, empêchant ainsi la fixation du facteur de transcription constitutif de *RMG1* et inhibant donc la transcription de *RMG1*. Lors d'un traitement avec le peptide flg22, la déméthylase ROS1 déméthyle la région promotrice laissant alors la possibilité au facteur de transcription de se fixer à l'ADN et induire la transcription du gène *RMG1*. Autrement dit l'expression de *RMG1* est contrôlée par deux mécanismes antagonistes qui ciblent sa région promotrice: la RdDM réprimant son expression basale chez les plantes saines et la déméthylation par ROS1 permettant son expression en cas de stress biotique.

Un deuxième cas de figures est illustré avec l'exemple de *WRKY22* qui présente une séquence dérivée d'élément transposable dans sa région promotrice. En condition non traitée à la flg22, la région promotrice de *WRKY22* est ciblée par la RdDM, empêchant ainsi la transcription de *WRKY22*. Lors d'un traitement à flg22, la répression de la RdDM et des déméthylation indépendante de ROS1 induisent une hypométhylation de la région promotrice de *WRKY22* sur laquelle un facteur de transcription nouvellement produit va pouvoir se fixer et induire la transcription du gène *WRKY22*. Ainsi la régulation de l'expression de *WRKY22* dépend de la régulation RdDM et est indépendante de ROS1.

Cette étude montre que la méthylation/déméthylation des régions promotrices par un mécanisme impliquant la RdDM contrôle l'expression de certains gènes de défense associés à la PTI et contenant des éléments transposables/répétitions dans leurs régions promotrices. En plus de *RGM1* et de *WRKY22*, 311 gènes sont induits par un traitement avec flg22 et accumulant des siARN dans leur région promotrice (Yu et al. 2013). La comparaison des gènes DE dans les galles ciblés par des clusters de siARN également DE dans les galles dont la répression transcriptionnelle est supportée par des profils d'expression anticorrélés avec les 311 gènes de Yu et al, a permis d'identifier 10 gènes

en communs. Alors que ces 10 gènes sont induits par la flg22 ils sont tous réprimés dans les galles. Cette répression et l'accumulation de siARN dans leur région promotrice dans les galles suggèrent que ces gènes sont réprimés transcriptionnellement par des siARN lors de l'interaction plantes-nématodes à galles. Il semble donc qu'en cas d'infection par les nématodes, la répression de ces gènes empêcherait le déclenchement de la PTI et permettrait à l'infection de s'établir, contrairement à ce qui a été observé lors de l'infection bactérienne. Autrement dit, la réponse de type PTI liée à l'induction des gènes de défenses par l'hypométhylation des régions promotrices pourrait être inhibée dans le cas d'une infection par les nématodes à galles. Cette hypothèse est cohérente avec les résultats préliminaires des tests d'infestation réalisés avec le mutant affecté dans le gène *ros1* codant pour une déméthylase qui présente une susceptibilité accrue avec une augmentation du nombre de masse d'œufs par rapport aux plantes sauvage (Annexe 2) et avec les résultats préliminaires obtenus avec le mutant de méthylation *ddm1* qui présente une susceptibilité diminuée. La méthylation semble donc jouer un rôle négatif lors de l'interaction plante-nématodes à galles. Il est établi que les nématodes sont capables de supprimer la PTI grâce à la sécrétion d'effecteurs dans les racines. Un des suppresseurs de PTI le mieux caractérisé est la calréticuline sécrétée par *M. incognita* (Jaouannet *et al.*, 2012). La présence de calréticuline supprime le dépôt de callose et réduit l'activation des gènes de défenses liés à la PTI (Jaouannet *et al.*, 2012). Il est donc possible d'émettre l'hypothèse que les modifications de l'état de méthylation de l'ADN interviendraient dans la modulation de la PTI par le nématode et qu'un effecteur sécrété par le nématode pourrait perturber l'état de méthylation des gènes de défenses en modulant la voie de la RdDM et inhibant ainsi le déclenchement de la PTI.

Conclusions & Perspectives

L'analyse des miARN a identifié dix et 20 miARN comme différentiellement exprimés dans les galles à 7 et 14 jai respectivement. L'approche gène rapporteur a identifié *MIR167d*, *MIR390* et *MIR394* comme des candidats intéressants pour intervenir dans la formation de la galle. De plus, le rôle de miR159 dans la formation de la galle a été établi, les mutants KO *mir159abc* présentant une résistance accrue aux nématodes à galles. De plus, l'étude du profil d'expression du gène rapporteur fusionnés à MYB33, une des cibles de miR159, présente une diminution du signal entre 4 et 14 dpi, un profil anti-corrélé avec celui de miR159 a et c. D'autre part, une analyse à l'échelle du génome complet a également permis de prédire les régions du génome de la plante appelées clusters qui correspondent à des zones accumulant différentiellement des siARN dans les racines saines et les galles. Cette analyse a également permis de mettre en évidence une surreprésentation des séquences de 23-24 nt dans les galles par rapport aux racines comme cela a été vu dans les analyses réalisées par Cabrera et al (2016) et collaborateurs à 3 jai. Enfin le recouplement avec les résultats d'analyses de puces à ADN a identifié des gènes différentiellement exprimés dans les galles et ciblés dans leur région promotrice ou dans le corps des gènes par des clusters prédits de siARN différentiellement exprimés. Parmi ces gènes, nous avons pu identifier 10 gènes tous réprimés dans les galles et ciblés dans leur région promotrice par des clusters prédits de siARN surexprimés dans les galles avec une taille majoritaire de 23-24 nt et qui ont été déjà décrits chez *A. thaliana* comme des gènes associés à la PTI et ciblés par des mécanismes de RdDM dans les plantes saines (Yu et al. 2013).

- La régulation TGS et PTGS chez *A. thaliana* en réponse à *M. incognita*

Cette étude a permis de mettre en évidence le rôle des régulations PTGS dans l'interaction plantes-nématodes à galles probablement réalisées par les miARN et nos travaux ont montré l'importance du miARN miR159 en particulier. Les tests de résistance ont montré chez le triple mutant KO *mir159abc* une résistance aux nématodes à galles. Il serait intéressant d'une part d'étudier la réponse des mutants KO *mir159ab* et *mi159c* dans la réponse aux nématodes à galles, afin d'évaluer le rôle des différents gènes de miR159 (et en particulier de *MIR159c*) dans les galles. Dans la même idée, la production de mutants possédant une fusion promoteur:GUS sont en cours d'obtention au laboratoire pour les gènes *MIR159a*, *MIR159b* et *MIR159c* afin de déterminer quelle forme de miR159 est exprimée dans les galles. D'autre part il serait également intéressant d'étudier l'expression des cibles prédites de la famille miR159 dans les galles par qPCR ou par séquençage de de caractériser les voies de régulation associées à miR159 dans les galles. De plus, deux autres miARN

surexprimés dans les galles apparaissent prometteurs : miR167d et miR394b. Le rôle de ces miARN reste maintenant à déterminer par la caractérisation de mutants. D'une part, nous avons récemment obtenu des lignées mimicry pour miR394 (Todesco *et al.*, 2010) qui produisent une cible chimérique résistante au clivage par miR394 mais présentant une forte affinité pour le miR394, l'empêchant ainsi de cliver sa cible originelle. D'autre part Jason Reed (University of North Carolina, Chapel Hill) nous a récemment fourni des lignées d'*Arabidopsis* KO pour les cibles *ARF6* et *ARF8*. L'analyse de la réponse de ces mutants à l'infection par les nématodes à galles permettra de déterminer le rôle de ces miARN dans l'interaction *A. thaliana* – nématodes à galles. Parmi les 20 familles de miARN différentiellement exprimés dans les galles dans cette étude 14 sont conservés chez une autre espèce qu'*Arabidopsis* (ex : miR319, miR167, miR164). Bien que l'objectif de ce projet soit d'identifier les acteurs moléculaires qui participent à la formation de la galle chez *A. thaliana*, nous nous intéressons particulièrement à l'identification de mécanismes moléculaires conservés chez plusieurs plantes hôtes. Si l'on recherche une sortie appliquée à cette étude, il est en effet plus judicieux d'identifier des mécanismes de la formation de la galle qui soient conservés entre espèces d'intérêt agronomique et entre *A. thaliana* et des espèces d'intérêt agronomiques. Dans ce cadre, le séquençage de la population de petits ARN ainsi que des transcrits de racines saines et galles de tomate à 7 et 14dpi a été récemment réalisé au laboratoire. L'analyse de ces données permettra d'identifier les miARN conservés et différentiellement régulés dans les galles.

Bien que les mutants TGS testés n'aient pas montré de réponse significativement différente par rapport aux plantes sauvages du point de vue statistique, l'implication de la méthylation de l'ADN dans la formation de la galle est prometteuse. En effet, les mutants affectés dans les voies de méthylation de l'ADN comme le mutant KO pour le gène *ROS1* codant une déméthylase qui présente une résistance aux nématodes et le mutant du gène *DDM1* codant pour un facteur remodelant de la chromatine qui présente une sensibilité accrue avec une augmentation du nombre de masse d'œufs par rapport aux plantes sauvages. La méthylation de l'ADN liée ou pas à la RdDM semble donc réguler positivement le développement des galles. Une étude du méthylome des kystes racinaires induits par le nématode à kystes *H. schachtii* a été étudié très récemment (Hewezi *et al.*, 2017). Cette étude repose sur le séquençage haut débit de l'ADN génomique extrait de kystes et soumis à un traitement bisulfite qui modifie les cytosines en uraciles à l'exception des cytosines méthylées. La comparaison des zones méthylées avec les clusters accumulant des siARN a permis d'identifier les régions du génome potentiellement régulées par la RdDM. Une analyse similaire, du méthylome de galles induites par *M. incognita* sera prochainement réalisée au laboratoire. Il sera intéressant de confronter les variations du méthylome d'*A. thaliana* en réponse aux nématodes à kystes et aux nématodes à galles, tous deux inducteurs d'un site nourricier.

Le séquençage de petits ARN a permis d'explorer non seulement les miARN mais également les siARN exprimés dans les galles. Les analyses de clustering réalisées par l'algorithme Shortstack ont permis d'identifier les régions du génome qui accumulent des petits ARN. Toutefois notre analyse n'a pas permis d'obtenir de résultat intéressant concernant les siARN associés aux régulations de type PTGS. L'analyse par clustering est particulièrement bien adaptée aux « phasiARN » et aux hc-siARN. Toutefois, il est possible qu'elle soit moins adaptée à l'étude des nat-siARN pour lesquels des exemples montrent qu'une seule séquence unique est surexprimée, formant ainsi un pic d'accumulation (Zhang *et al.*, 2012). De plus, il est possible que la surreprésentation des séquences de 23-24 dans les galles ait introduit un biais dans notre analyse statistique. Il serait donc intéressant de compléter notre première analyse de clustering en i) réalisant une nouvelle analyse statistique spécifique aux deux catégories de taille des siARN 20-22nt d'une part et 23-24 nt d'autre part et ii) en réalisant une analyse statistique du taux d'expression des séquences (Yu *et al.*, 2013b).

- La méthylation des gènes associés à la PTI : une stratégie d'infection par les nématodes à galles ?

Notre analyse a permis d'identifier 10 gènes associés à la PTI, qui sont réprimés dans les galles et ciblés dans leur région promotrice par des clusters de siARN surexprimés dans les galles. Dans l'interaction plante-nématodes, les résultats obtenus au cours de ma thèse suggèrent que le nématode modulerait le déclenchement de la PTI par deux mécanismes de régulation de l'expression des gènes associés à la PTI. Un modèle pour ces deux mécanismes s'inspirant des régulations transcriptionnelles des gènes de défense lors de la réponse antibactérienne sont présentés figure 43. Le premier mécanisme ferait intervenir la RdDM et la déméthylation de l'ADN par ROS1 (ex : RMG1) et le deuxième reposerait sur la RdDM et une déméthylation de l'ADN indépendante de ROS1 (ex : WRKY22). Dans les plantes saines, la région promotrice des gènes associés à la mise en place des défenses seraient méthylés via la RdDM et ne seraient par conséquent pas transcrits. Dans le premier mécanisme : l'infection par les nématodes entraînerait une amplification du mécanisme de la régulation RdDM. La région promotrice serait alors hyperméthylée et ne permettrait pas la fixation du facteur de transcription. En conséquence le gène de défense ne serait pas transcrit. Cet exemple est supporté par la répression du gène *WRKY22* observée dans les galles et dont la région promotrice est ciblée par un cluster de siARN surexprimé dans les galles.

Dans le deuxième mécanisme : l'infection par les nématodes à galles induirait une amplification du mécanisme de la régulation RdDM ainsi qu'une répression de l'activité déméthylase de ROS1. La région promotrice du gène de défense resterait donc méthylée empêchant la fixation d'un facteur de transcription. En conséquence le gène de défense ne serait pas transcrit. Ce modèle est supporté par

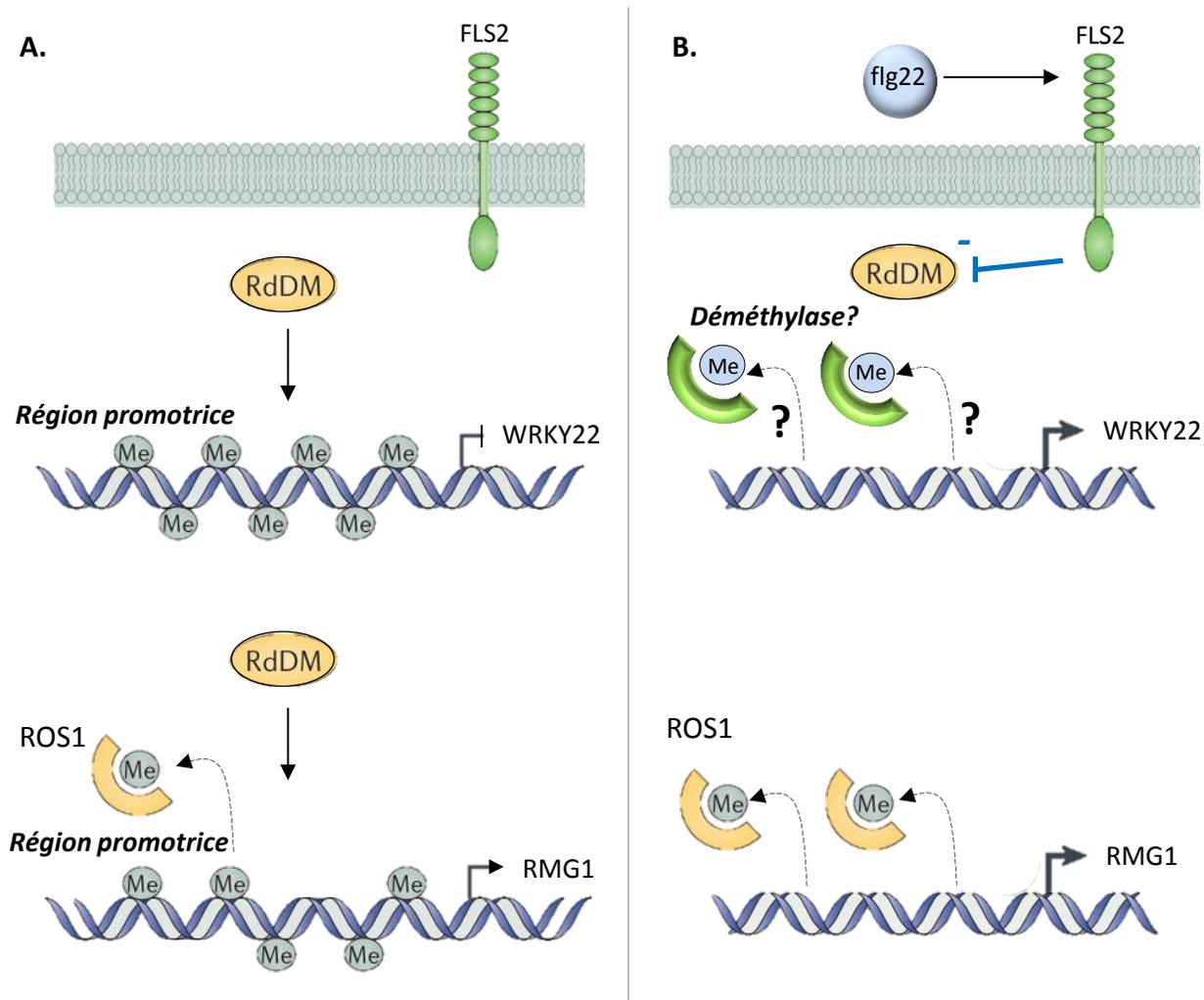


Fig. 43: Profils de méthylation et expression de *RMG1* (A) et *WRKY22* (B) en condition “non traité” et traité avec la flagelline flg22.

A. Condition contrôlée (non traitée): *WRKY22* et *RESISTANCE METHYLATED GENE 1 (RMG1)* présentent dans leur région promotrice, des séquences répétées dérivées d'éléments transposables qui sont ciblées par la méthylation dirigée par les siARN (RdDM). En condition contrôlée (non traitée), la RdDM induit la méthylation du promoteur de *WRKY22* et *RMG1* bloquant ainsi la transcription de *WRKY22*. Malgré l'action de la RdDM, le gène *RMG1* présente une expression basale dépendante de l'action de l'ADN déméthylase ROS1.

B. Traitement avec le peptide flg22 dérivé de la flagelline de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst). Le traitement avec flg22 induit deux mécanismes différents illustrés par les exemples de *WRKY22* et de *RMG1*. Dans le cas de *WRKY22*, flg22 induit une activation de l'expression due à la répression de la RdDM par flg22 et une éventuelle déméthylation qui serait indépendante de ROS1. Dans le cas de *RMG1*, flg22 induit une surexpression de ce gène d'une part par la répression de la RdDM par flg22 et d'autre part par la déméthylation de la région promotrice par la déméthylase ROS1. Le traitement avec flg22 induirait donc la PTI en induisant l'expression des gènes de défense via la déméthylation de leurs régions promotrices. Cette déméthylation est due à une répression de la RdDM par flg22 et/ou l'action d'ADN déméthylases.

Des expériences complémentaires sont nécessaires afin de déterminer si les 10 gènes associés à la PTI et réprimés dans les galles sont régulés par un de ces deux mécanismes présentés. Dans un premier temps, la présence de séquences dérivées d'éléments transposables sera réalisée dans la région promotrice de ces gènes. Par la suite les niveaux d'expression de ces gènes seront comparés par qPCR dans des galles et racines saines d'un écotype sauvage et dans des mutants de la voie des RdDM afin de déterminer si la répression observée est bien due à la RdDM. Enfin, une analyse des cytosines méthylées au niveau des promoteurs de ces 10 gènes sera réalisée par séquençage de l'ADNg après traitement bisulfite. Enfin il sera intéressant de tester si la surexpression de ces 10 gènes induit une résistance au nématode à galles.

- La génération de transcriptomes par technologies NGS : vers une meilleure compréhension de l'activité régulatrice des petits ARN ?

Au cours de cette thèse, j'ai recherché les corrélations négatives entre les profils d'expression des miARN DE dans les galles ou des clusters siARN prédits DE et ceux de leurs cibles en me référant aux données de puces à ADN afin de supporter les prédictions bioinformatiques par des évidences biologiques d'une potentielle activité régulatrice des petits ARN. Toutefois, comme on a pu le voir précédemment, la majorité des gènes ciblés par les siARN et les miARN n'apparaissent pas comme différentiellement exprimés dans les puces à ADN. De nouvelles analyses de transcriptomes de galles d'*A. thaliana* basée sur le séquençage haut débit des transcrits par la méthode Illumina, vont être prochainement réalisées au laboratoire. De plus, des analyses de séquençage spécifique des produits de dégradation des ARNm par les miARN dans les galles seront également réalisées prochainement avec la technologie du dégradome (German *et al.*, 2008). L'intégration de l'ensemble de ces données permettra d'avoir une information plus claire de l'activité régulatrice des siARN et des miARN dans les galles.

- La sécrétion de petits ARN par *M. incognita*

Enfin, le séquençage des petits ARN de galles d'*A. thaliana* a généré des séquences provenant du nématode. Au cours de ce projet, je me suis focalisée sur les petits ARN s'alignant sur le génome végétal. Il serait intéressant à la suite de ce projet d'identifier les miARN et siARN exprimés par les stades parasites du nématode. De plus, en parallèle du séquençage des bibliothèques de galles présenté dans ce projet de thèse, trois réplicats de petits ARN de nématodes au stade J2 ont été séquencés et restent à analyser. L'analyse de ces différentes données permettra notamment d'identifier les séquences conservées entre les deux partenaires de l'interaction. Il est possible d'envisager que certains petits ARN puissent être sécrétés par le nématode dans la cellule végétale pour cibler des ARNm issus de la transcription du génome végétal. Ce type de mécanisme a été

montré chez les nématodes parasites d'animaux comme *Heligmosomoides polygyrus* qui sécrète dans l'intestin de souris, des vésicules ou exosomes contenant des miARN et des protéines argonautes de nématode et qui régulent l'expression des gènes de l'hôte associés à l'immunité et à l'inflammation (Buck *et al.*, 2014). Il a également été montré que les pathogènes peuvent exploiter la machinerie de la plante pour l'activité des petits ARN en sécrétant des petits ARN dans les tissus de la plante hôte. C'est le cas du champignon *Botrytis cinerea* qui détourne la protéine végétale ARGONAUTE 1 en sécrétant des miARN fongiques qui sont chargés dans l'AGO1 de la plante pour induire la répression post transcriptionnelle des gènes impliqués dans la défense de la plante hôte (Weiberg *et al.*, 2013). Il est tout à fait possible des manipulations de la plante hôte similaires se déroulent dans le cadre de l'interaction plantes-nématodes à galles. Toutefois, la transformation stable de *M. incognita* n'étant pas possible à ce jour il n'est pas aisée de prouver cette sécrétion.

Pour conclure, ce projet a permis de caractériser les populations de miARN et de siARN différemment régulés dans les galles lors de l'interaction *A. thaliana* – *M. incognita* à 7 et 14 jai. En particulier le rôle de miR159 dans la formation des galles a été établi, probablement à travers la régulation post transcriptionnelle du facteur de transcription *MYB33*. Cette étude a également permis de soulever le rôle potentiel de miR159c dans les racines. D'un point de vue appliqué, l'identification de miARN de plantes et de leurs cibles ou des gènes ciblés par les clusters de siARN DE lors de la formation de la galle pourraient constituer des pistes innovantes pour développer de nouvelles méthode de lutte contre nématodes à galles. D'un point de vue fondamental, ce projet a permis d'enrichir les connaissances relatives aux mécanismes de régulation de l'expression génique au cours de la formation de la galle mais aussi ce projet a mis en évidence un rôle potentiel de miR159c dans les racines.

Bibliographie

Références Bibliographiques

- Abad P, Gouzy J, Aury J-M, Castagnone-Sereno P, Danchin EGJ, Deleury E, Perfus-Barbeoch L, Anthouard V, Artiguenave F, Blok VC, et al. 2008.** Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature biotechnology* **26**: 909–15.
- Abad P, Williamson VM. 2010.** Plant Nematode Interaction: A Sophisticated Dialogue. *Advances in Botanical Research*.147–192.
- Abramovitch RB, Anderson JC, Martin GB. 2006.** Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**: 601–11.
- Absmanner B, Stadler R, Hammes UZ. 2013.** Phloem development in nematode-induced feeding sites: the implications of auxin and cytokinin. *Frontiers in Plant Science* **4**.
- Achard P, Herr A, Baulcombe DC, Harberd NP. 2004.** Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development* **131**.
- Addo-Quaye C, Eshoo TW, Bartel DP, Axtell MJ. 2008.** *Endogenous siRNA and miRNA Targets Identified by Sequencing of the Arabidopsis Degradome*.
- Agorio A, Vera P. 2007.** ARGONAUTE4 is required for resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **19**: 3778–90.
- Ahmed I, Sarazin A, Bowler C, Colot V, Quesneville H. 2011.** Genome-wide evidence for local DNA methylation spreading from small RNA-targeted sequences in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* **39**: 6919–6931.
- Allen RS, Li J, Alonso-Peral MM, White RG, Gubler F, Millar AA. 2010.** MicroR159 regulation of most conserved targets in *Arabidopsis* has negligible phenotypic effects. *Silence* **1**: 18.
- Allen RS, Li J, Stahle MI, Dubroué A, Gubler F, Millar A a. 2007.** Genetic analysis reveals functional redundancy and the major target genes of the *Arabidopsis* miR159 family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 16371–16376.
- Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Carrington JC, Yang M, Padgett RW, Steward R, Chen X, Crete P, Picault N, et al. 2005.** microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* **121**: 207–21.
- de Almeida Engler J, Favery B. 2011.** The Plant Cytoskeleton Remodelling in Nematode Induced Feeding Sites. *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*. Dordrecht: Springer Netherlands, 369–393.
- de Almeida Engler J, Gheysen G. 2013.** Nematode-induced endoreduplication in plant host cells: why and how? *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **26**: 17–24.
- de Almeida Engler J, Kyndt T, Vieira P, Van Cappelle E, Boudolf V, Sanchez V, Escobar C, De Veylder L, Engler G, Abad P, et al. 2012.** *CCS52* and *DEL1* genes are key components of the endocycle in nematode-induced feeding sites. *The Plant Journal* **72**: 185–198.
- de Almeida Engler J, Van Poucke K, Karimi M, De Groodt R, Gheysen GG, Engler G, Gheysen GG. 2004.** Dynamic cytoskeleton rearrangements in giant cells and syncytia of nematode-infected roots. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **38**: 12–26.

- Alonso-Peral MM, Li J, Li Y, Allen RS, Schnippenkoetter W, Ohms S, White RG, Millar AA. 2010.** The microRNA159-regulated GAMYB-like genes inhibit growth and promote programmed cell death in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **154**: 757–71.
- Anders S, Huber W. 2010.** Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology* **11**: R106.
- Aukerman MJ, Sakai H. 2003.** Regulation of Flowering Time and Floral Organ Identity by a MicroRNA and Its APETALA2-Like Target Genes. *THE PLANT CELL ONLINE* **15**: 2730–2741.
- Axtell MJ. 2013a.** Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annual review of plant biology* **64**: 137–59.
- Axtell MJ. 2013b.** ShortStack: comprehensive annotation and quantification of small RNA genes. *RNA (New York, N.Y.)* **19**: 740–51.
- Axtell MJ, Jan C, Rajagopalan R, Bartel DP. 2006.** A Two-Hit Trigger for siRNA Biogenesis in Plants. *Cell* **127**: 565–577.
- Bagnaresi P, Sala T, Irdani T, Scotto C, Lamontanara A, Beretta M, Rotino GL, Sestili S, Cattivelli L, Sabatini E. 2013.** *Solanum torvum* responses to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *BMC genomics* **14**: 540.
- Baker CC, Sieber P, Wellmer F, Meyerowitz EM. 2005.** The early extra petals1 Mutant Uncovers a Role for MicroRNA miR164c in Regulating Petal Number in *Arabidopsis*. *Current Biology* **15**: 303–315.
- Bakhetia M, Urwin PE, Atkinson HJ. 2007.** qPCR Analysis and RNAi Define Pharyngeal Gland Cell-Expressed Genes of *Heterodera glycines* Required for Initial Interactions with the Host. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 306–312.
- Balasubramanian M, Rangaswami G. 1962.** Presence of Indole Compound in Nematode Galls. *Nature* **194**: 774–775.
- Baldacci-Cresp F, Chang C, Maucourt M, Deborde C, Hopkins J, Lecomte P, Bernillon S, Brouquisse R, Moing A, Abad P, et al. 2012.** (Homo)glutathione deficiency impairs root-knot nematode development in *Medicago truncatula*. *PLoS pathogens* **8**: e1002471.
- Banora MY, Rodiuc N, Baldacci-Cresp F, Smertenko A, Bleve-Zacheo T, Mellilo MT, Karimi M, Hilson P, Evrard JL, Favery B, et al. 2011.** Feeding cells induced by phytoparasitic nematodes require ??-tubulin ring complex for microtubule reorganization. *PLoS Pathogens* **7**.
- Bar-Orl C, Kapulnik Y, Koltai H. 2005.** A broad characterization of the transcriptional profile of the compatible tomato response to the plant parasitic root knot nematode *Meloidogyne javanica*. *European Journal of Plant Pathology* **111**: 181–192.
- Barcala M, García A, Cabrera J, Casson S, Lindsey K, Favery B, García-Casado G, Solano R, Fenoll C, Escobar C. 2010.** Early transcriptomic events in microdissected *Arabidopsis* nematode-induced giant cells. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **61**: 698–712.
- Bartlem DG, Jones MGK, Hammes UZ. 2014.** Vascularization and nutrient delivery at root-knot nematode feeding sites in host roots. *Journal of Experimental Botany* **65**: 1789–1798.
- Baumann K. 2013.** Plant cell biology: Mobile miRNAs for stem cell maintenance. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **14**: 128–129.
- Bazin J, Khan GA, Combier J-P, Bustos-Sanmamed P, Debernardi JM, Rodriguez R, Sorin C, Palatnik**

- J, Hartmann C, Crespi M, et al. 2013.** miR396 affects mycorrhization and root meristem activity in the legume *Medicago truncatula*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **74**: 920–34.
- Bellafiore S, Shen Z, Rosso M-N, Abad P, Shih P, Briggs SP. 2008.** Direct Identification of the *Meloidogyne incognita* Secretome Reveals Proteins with Host Cell Reprogramming Potential (JL Dangl, Ed.). *PLoS Pathogens* **4**: e1000192.
- Bellini C, Pacurar DI, Perrone I. 2014.** Adventitious Roots and Lateral Roots: Similarities and Differences. *Annual Review of Plant Biology* **65**: 639–666.
- Berardini TZ, Reiser L, Li D, Mezheritsky Y, Muller R, Strait E, Huala E. 2015.** The arabidopsis information resource: Making and mining the ‘gold standard’ annotated reference plant genome. *genesis* **53**: 474–485.
- Berg RH, Fester T, Taylor CG. 2008.** Development of the root knot nematode feeding cell. *Cell Biology of Plant Nematode Parasitism*. 115–152.
- Berg RH, Fester T, Taylor CG. 2009.** Development of the Root-Knot Nematode Feeding Cell. *Cell Biology of Plant Nematode Parasitism*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 115–152.
- Bert W, Leliaert F, Vierstraete AR, Vanfleteren JR, Borgonie G. 2008.** Molecular phylogeny of the *Tylenchina* and evolution of the female gonoduct (Nematoda: Rhabditida). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **48**: 728–744.
- Bhattarai KK, Xie Q-G, Mantelin S, Bishnoi U, Girke T, Navarre DA, Kaloshian I. 2008.** Tomato Susceptibility to Root-Knot Nematodes Requires an Intact Jasmonic Acid Signaling Pathway. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 1205–1214.
- Bird A. 1961.** The ultrastructure and histochemistry of a nematode-induced giant cell. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*.
- Bird DM, Williamson VM, Abad P, McCarter J, Danchin EGJ, Castagnone-Sereno P, Opperman CH. 2009.** The genomes of root-knot nematodes. *Annual review of phytopathology* **47**: 333–351.
- Blevins T, Rajeswaran R, Shivaprasad P V., Beknazariants D, Si-Ammour A, Park H-S, Vazquez F, Robertson D, Meins F, Hohn T, et al. 2006.** Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Research* **34**: 6233–6246.
- Blok VC, Jones JT, Phillips MS, Trudgill DL. 2008.** Parasitism genes and host range disparities in biotrophic nematodes: The conundrum of polyphagy versus specialisation. *BioEssays* **30**: 249–259.
- Boccaro M, Sarazin A, Thiébeauld O, Jay F, Voinnet O, Navarro L, Colot V. 2014.** The Arabidopsis miR472-RDR6 Silencing Pathway Modulates PAMP- and Effector-Triggered Immunity through the Post-transcriptional Control of Disease Resistance Genes (J-M Zhou, Ed.). *PLoS Pathogens* **10**: e1003883.
- Bohmann H. 2015.** Introductory Chapter on the Basic Biology of Cyst Nematodes. *Plant Nematode Interactions: A view on compatible interrelationships*. 34–50.
- Bohmert K, Camus I, Bellini C, Bouchez D, Caboche M, Benning C. 1998.** AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *The EMBO journal* **17**: 170–80.
- Bologna NG, Voinnet O. 2014.** The Diversity, Biogenesis, and Activities of Endogenous Silencing Small RNAs in *Arabidopsis*. *Annual Review of Plant Biology* **65**: 473–503.
- Borges F, Martienssen RA. 2015.** The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Publishing*

Group 16: 1–15.

Borsani O, Zhu J, Verslues P, Sunkar R, Zhu J. 2005. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell*.

Boualem A, Laporte P, Jovanovic M, Laffont C, Plet J, Combiér J-P, Niebel A, Crespi M, Frugier F. 2008. MicroRNA166 controls root and nodule development in *Medicago truncatula*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **54**: 876–87.

Breakfield NW, Corcoran DL, Petricka JJ, Shen J, Sae-Seaw J, Rubio-Somoza I, Weigel D, Ohler U, Benfey PN. 2012. High-resolution experimental and computational profiling of tissue-specific known and novel miRNAs in Arabidopsis. *Genome research* **22**: 163–76.

Brodersen P, Voinnet O. 2006. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics* **22**: 268–280.

Buck AH, Coakley G, Simbari F, McSorley HJ, Quintana JF, Le Bihan T, Kumar S, Abreu-Goodger C, Lear M, Harcus Y, et al. 2014. Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nature Communications* **5**: 5488.

Bustos-Sanmamed P, Mao G, Deng Y, Elouet M, Khan GA, Bazin J, Turner M, Subramanian S, Yu O, Crespi M, et al. 2013. Overexpression of miR160 affects root growth and nitrogen-fixing nodule number in *Medicago truncatula*. *Functional Plant Biology* **40**: 1208.

Byrne ME. 2005. Networks in leaf development. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 59–66.

Cabello S, Lorenz C, Crespo S, Cabrera J, Ludwig R, Escobar C, Hofmann J. 2014. Altered sucrose synthase and invertase expression affects the local and systemic sugar metabolism of nematode-infected Arabidopsis thaliana plants. *Journal of Experimental Botany* **65**: 201–212.

Cabrera J, Barcala M, García A, Rio-Machín A, Medina C, Jaubert-Possamai S, Favery B, Maizel A, Ruiz-Ferrer V, Fenoll C, et al. 2016. Differentially expressed small RNAs in Arabidopsis galls formed by *Meloidogyne javanica*: A functional role for miR390 and its TAS3-derived tasiRNAs. *New Phytologist* **209**: 1625–1640.

Cabrera J, Bustos R, Favery B, Fenoll C, Escobar C. 2014a. NEMATIC: A simple and versatile tool for the insilico analysis of plant-nematode interactions. *Molecular Plant Pathology* **15**: 627–636.

Cabrera J, Díaz-Manzano FE, Sanchez M, Rosso MN, Melillo T, Goh T, Fukaki H, Cabello S, Hofmann J, Fenoll C, et al. 2014b. A role for LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN 16 during the interaction Arabidopsis-Meloidogyne spp. provides a molecular link between lateral root and root-knot nematode feeding site development. *New Phytologist* **203**: 632–645.

Cabrera J, Fernando ED, Barcala M, Arganda-carreras I, Almeida-engler J De, Engler G, Fenoll C, Escobar C. 2015. Methods Phenotyping nematode feeding sites : three-dimensional reconstruction and volumetric measurements of giant cells induced by root-knot nematodes in Arabidopsis.

Caillaud MC, Abad P, Favery B. 2008a. Cytoskeleton reorganization, a key process in root-knot nematode-induced giant cell ontogenesis. *Plant signaling & behavior* **3**: 816–818.

Caillaud M-C, Favery B. 2016. In Vivo Imaging of Microtubule Organization in Dividing Giant Cell.137–144.

Caillaud M-C, Lecomte P, Jammes F, Quentin M, Pagnotta S, Andrio E, de Almeida Engler J, Marfaing N, Gounon P, Abad P, et al. 2008b. MAP65-3 microtubule-associated protein is essential

for nematode-induced giant cell ontogenesis in Arabidopsis. *The Plant cell* **20**: 423–37.

Van de Cappelle E, Plovie E, Kyndt T, Grunewald W, Cannoot B, Gheysen G. 2008. *AtCDKA;1* silencing in *Arabidopsis thaliana* reduces reproduction of sedentary plant-parasitic nematodes. *Plant Biotechnology Journal* **6**: 749–757.

Carbonell A, Fahlgren N, Garcia-Ruiz H, Gilbert KB, Montgomery TA, Nguyen T, Cuperus JT, Carrington JC. 2012. Functional analysis of three Arabidopsis ARGONAUTES using slicer-defective mutants. *The Plant cell* **24**: 3613–29.

Carlsbecker A, Lee J-Y, Roberts CJ, Dettmer J, Lehesranta S, Zhou J, Lindgren O, Moreno-Risueno MA, Vatén A, Thitamadee S, et al. 2010. Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature* **465**: 316–321.

Castagnone-Sereno P. 2006. Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root-knot nematodes. *Heredity* **96**: 282–289.

Castagnone-Sereno P, Danchin EGJ, Perfus-Barbeoch L, Abad P. 2013. Diversity and evolution of root-knot nematodes, genus *Meloidogyne*: new insights from the genomic era. *Annual review of phytopathology* **51**: 203–20.

Castañeda NEN, Alves GSC, Almeida RM, Amorim EP, Fortes Ferreira C, Togawa RC, Costa MMDC, Grynberg P, Santos JRP, Cares JE, et al. 2017. Gene expression analysis in *Musa acuminata* during compatible interactions with *Meloidogyne incognita*. *Annals of Botany*: mcw272.

Castle LA LA, Errampalli D, Atherton TLT, Franzmann LH, Yoon ES, Meinke DW. 1993. Genetic and molecular characterization of embryonic mutants identified following seed transformation in Arabidopsis. **241–241**: 504–514.

Chan SW-L, Zhang X, Bernatavichute Y V, Jacobsen SE. 2006. Two-step recruitment of RNA-directed DNA methylation to tandem repeats. *PLoS biology* **4**: e363.

Chellappan P, Xia J, Zhou X, Gao S, Zhang X, Coutino G, Vazquez F, Zhang W, Jin H. 2010. siRNAs from miRNA sites mediate DNA methylation of target genes. *Nucleic Acids Research* **38**: 6883–6894.

Chen X. 2004. A MicroRNA as a Translational Repressor of APETALA2 in Arabidopsis Flower Development. *Science* **303**: 2022–2025.

Chen Z, Agnew JL, Cohen JD, He P, Shan L, Sheen J, Kunkel BN. 2007. Pseudomonas syringae type III effector AvrRpt2 alters Arabidopsis thaliana auxin physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 20131–20136.

Christie J. 1936. Development of root-knot nematode galls. *Phytopathology* **26**: 1–22.

Chuck G, Cigan AM, Saeteurn K, Hake S. 2007. The heterochronic maize mutant Corngrass1 results from overexpression of a tandem microRNA. *Nature Genetics* **39**: 544–549.

Clément M, Ketelaar T, Rodiuc N, Banora MY, Smertenko A, Engler G, Abad P, Hussey PJ, de Almeida Engler J. 2009. Actin-depolymerizing factor2-mediated actin dynamics are essential for root-knot nematode infection of Arabidopsis. *The Plant cell* **21**: 2963–79.

Coelho RR, Vieira P, Antonino de Souza Júnior JD, Martin-Jimenez C, De Veylder L, Cazareth J, Engler G, Grossi-de-Sa MF, de Almeida Engler J. 2017. Exploiting cell cycle inhibitor genes of the *KRP* family to control root-knot nematode induced feeding sites in plants. *Plant, Cell & Environment*.

Cokus SJ, Feng S, Zhang X, Chen Z, Merriman B, Haudenschild CD, Pradhan S, Nelson SF, Pellegrini

- M, Jacobsen SE. 2008.** Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* **452**: 215–219.
- Combier J-P, Frugier F, de Billy F, Boualem A, El-Yahyaoui F, Moreau S, Vernie T, Ott T, Gamas P, Crespi M, et al. 2006a.** MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes & Development* **20**: 3084–3088.
- Combier J-P, Frugier F, de Billy F, Boualem A, El-Yahyaoui F, Moreau S, Vernie T, Ott T, Gamas P, Crespi M, et al. 2006b.** MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes & development* **20**: 3084–8.
- Cooper WR, Jia L, Goggin L. 2005.** Effects of Jasmonate-Induced Defenses on Root-Knot Nematode Infection of Resistant and Susceptible Tomato Cultivars. *Journal of Chemical Ecology* **31**: 1953–1967.
- Coruh C, Cho SH, Shahid S, Liu Q, Wierzbicki A, Axtell MJ. 2015.** Comprehensive Annotation of *Physcomitrella patens* Small RNA Loci Reveals That the Heterochromatic Short Interfering RNA Pathway Is Largely Conserved in Land Plants. *The Plant cell* **27**: tpc.15.00228-.
- Couzigou JM, Combier JP. 2016.** Plant microRNAs: key regulators of root architecture and biotic interactions. *New Phytologist* **212**: 22–35.
- Csorba T, Bovi A, Dalmay T, Burgyán J. 2007.** The p122 subunit of Tobacco Mosaic Virus replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA- and microRNA-mediated pathways. *Journal of virology* **81**: 11768–80.
- Cui J, You C, Chen X. 2017.** The evolution of microRNAs in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **35**: 61–67.
- Damiani I, Baldacci-Cresp F, Hopkins J, Andrio E, Balzergue S, Lecomte P, Puppo A, Abad P, Favery B, Hérouart D. 2012.** Plant genes involved in harbouring symbiotic rhizobia or pathogenic nematodes. *The New phytologist* **194**: 511–22.
- Danchin EGJ, Arguel M-J, Campan-Fournier A, Perfus-Barbeoch L, Magliano M, Rosso M-N, Da Rocha M, Da Silva C, Nottet N, Labadie K, et al. 2013.** Identification of Novel Target Genes for Safer and More Specific Control of Root-Knot Nematodes from a Pan-Genome Mining (E Ghedin, Ed.). *PLoS Pathogens* **9**: e1003745.
- Danchin EGJ, Rosso M-N, Vieira P, de Almeida-Engler J, Coutinho PM, Henrissat B, Abad P. 2010.** Multiple lateral gene transfers and duplications have promoted plant parasitism ability in nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 17651–6.
- Das S, Ehlers J, Close T, Roberts P. 2010.** Transcriptional profiling of root-knot nematode induced feeding sites in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) using a soybean genome array. *BMC Genomics* **11**: 480.
- Davies LJ, Zhang L, Elling AA. 2015.** The Arabidopsis thaliana papain-like cysteine protease RD21 interacts with a root-knot nematode effector protein. *Nematology* **17**: 655–666.
- Davis EL. 1992.** Novel Immunization Procedures Used to Develop Monoclonal Antibodies that Bind to Specific Structures in *Meloidogyne* spp. *Phytopathology* **82**: 1244.
- Davis EL, Allen R, Pratt, Hussey RS. 1992.** Novel immunization procedures used to develop monoclonal antibodies that bind to specific structures in *Meloidogyne* spp. *Phytopathology*.1244–1250.

- Davis EL, Haegeman A, Kikuchi T. 2011.** Degradation of the Plant Cell Wall by Nematodes. *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*. Dordrecht: Springer Netherlands, 255–272.
- Davis E, Hussey RS, Baum TJ. 2004a.** Getting to the roots of parasitism by nematodes. *Trends in Parasitology* **20**: 134–141.
- Davis EL, Hussey RS, Baum TJ. 2004b.** Getting to the roots of parasitism by nematodes. *Trends in parasitology* **20**: 134–41.
- Davis EL, Hussey RS, Mitchum MG, Baum TJ. 2008.** Parasitism proteins in nematode–plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 360–366.
- Daxinger L, Kanno T, Bucher E, van der Winden J, Naumann U, Matzke AJM, Matzke M. 2009.** A stepwise pathway for biogenesis of 24-nt secondary siRNAs and spreading of DNA methylation. *The EMBO Journal* **28**: 48–57.
- Debernardi JM, Rodriguez RE, Mecchia MA, Palatnik JF, Chapman E. 2012.** Functional Specialization of the Plant miR396 Regulatory Network through Distinct MicroRNA–Target Interactions (MJ Axtell, Ed.). *PLoS Genetics* **8**: e1002419.
- Deleris A, Halter T, Navarro L. 2016.** DNA Methylation and Demethylation in Plant Immunity. *Annual Review of Phytopathology* **54**: 579–603.
- Devers EA, Branscheid A, May P, Krajinski F. 2011.** Stars and symbiosis: microRNA- and microRNA*-mediated transcript cleavage involved in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant physiology* **156**: 1990–2010.
- Ding X, Shields J, Allen R, Hussey RS. 1998.** A Secretory Cellulose-Binding Protein cDNA Cloned from the Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*). *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 952–959.
- Dolgosheina E V., Morin RD, Aksay G, Sahinalp SC, Magrini V, Mardis ER, Mattsson J, Unrau PJ. 2008.** Conifers have a unique small RNA silencing signature. *RNA* **14**: 1508–1515.
- Donaire L, Barajas D, Martinez-Garcia B, Martinez-Priego L, Pagan I, Llave C. 2008.** Structural and Genetic Requirements for the Biogenesis of Tobacco Rattle Virus-Derived Small Interfering RNAs. *Journal of Virology* **82**: 5167–5177.
- Downen RH, Pelizzola M, Schmitz RJ, Lister R, Downen JM, Nery JR, Dixon JE, Ecker JR. 2012.** Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: E2183–91.
- Doyle EA, Lambert KN. 2002.** Cloning and Characterization of an Esophageal-Gland-Specific Pectate Lyase from the Root-Knot Nematode *Meloidogyne javanica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**: 549–556.
- Du J, Johnson LM, Jacobsen SE, Patel DJ. 2015.** DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **16**: 519–532.
- Duan C-G, Zhang H, Tang K, Zhu X, Qian W, Hou Y-J, Wang B, Lang Z, Zhao Y, Wang X, et al. 2015.** Specific but interdependent functions for Arabidopsis AGO4 and AGO6 in RNA-directed DNA methylation. *The EMBO Journal* **34**: 581–592.
- Dubreuil G, Magliano M, Deleury E, Abad P, Rosso MN. 2007.** Transcriptome analysis of root-knot nematode functions induced in the early stages of parasitism. *New Phytologist* **176**: 426–436.

- Dugas D V., Bartel B. 2008.** Sucrose induction of Arabidopsis miR398 represses two Cu/Zn superoxide dismutases. *Plant Molecular Biology* **67**: 403–417.
- Dunoyer P, Himber C, Voinnet O. 2006.** Induction, suppression and requirement of RNA silencing pathways in virulent *Agrobacterium tumefaciens* infections. *Nature Genetics* **38**: 258–263.
- Ekwall K, Cao X, Jacobsen SE, Bartel DP, Teng G, Martienssen RA, Allshire RC, Samuelsson B, Radmark O, Ekwall K. 2004.** The RITS complex-A direct link between small RNA and heterochromatin. *Molecular cell* **13**: 304–5.
- Ellendorff U, Fradin EF, de Jonge R, Thomma BPHJ. 2009.** RNA silencing is required for Arabidopsis defence against *Verticillium* wilt disease. *Journal of experimental botany* **60**: 591–602.
- Endo BY. 1971.** Synthesis of nucleic acids at infection sites of soybean roots parasitized by *Heterodera glycines*. *Phytopathology* **61**: 4395–399.
- Endo Y, Iwakawa H, Tomari Y. 2013.** Arabidopsis ARGONAUTE7 selects miR390 through multiple checkpoints during RISC assembly. *EMBO reports* **14**: 652–658.
- Engler J de A, Engler G, Gheysen G. 2011.** Unravelling the Plant Cell Cycle in Nematode Induced Feeding Sites. *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*. Dordrecht: Springer Netherlands, 349–368.
- Engler JDA, Vleeschauwer V De, Burssens S, Celenza JL, Inzé D, Montagu M Van, Engler G, Gheysen G. 1999.** Molecular Markers and Cell Cycle Inhibitors Show the Importance of Cell Cycle Progression in Nematode-Induced Galls and Syncytia. **11**: 793–807.
- Errampalli D, Patton D, Castle L, Mickelson L, Hansen K, Schnall J, Feldmann K, Meinke D. 1991.** Embryonic Lethals and T-DNA Insertional Mutagenesis in Arabidopsis. *The Plant cell* **3**: 149–157.
- Escobar C, Fenoll C. 2015.** *Plant Nematode Interactions: A View on Compatible Interrelationships*.
- Etemadi M, Gutjahr C, Couzigou J-M, Zouine M, Lauressergues D, Timmers A, Audran C, Bouzayen M, Bécard G, Combier J-P. 2014.** Auxin Perception Is Required for Arbuscule Development in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Plant Physiology* **166**: 281–292.
- Eun C, Lorkovic ZJ, Naumann U, Long Q, Havecker ER, Simon SA, Meyers BC, Matzke AJM, Matzke M. 2011.** AGO6 Functions in RNA-Mediated Transcriptional Gene Silencing in Shoot and Root Meristems in Arabidopsis thaliana (M Freitag, Ed.). *PLoS ONE* **6**: e25730.
- Fahlgren N, Montgomery TA, Howell MD, Allen E, Dvorak SK, Alexander AL, Carrington JC. 2006.** Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA affects developmental timing and patterning in Arabidopsis. *Current biology : CB* **16**: 939–44.
- Favery B, Chelysheva LA, Lebris M, Jammes F, Marmagne A, De Almeida-Engler J, Lecomte P, Vaury C, Arkowitz RA, Abad P. 2004.** Arabidopsis formin AtFH6 is a plasma membrane-associated protein upregulated in giant cells induced by parasitic nematodes. *The Plant cell* **16**: 2529–40.
- Favery B, Complainville A, Vinardell JM, Lecomte P, Vaubert D, Mergaert P, Kondorosi A, Kondorosi E, Crespi M, Abad P. 2002.** The Endosymbiosis-Induced Genes *ENOD40* and *CCS52a* Are Involved in Endoparasitic-Nematode Interactions in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**: 1008–1013.
- Favery B, Lecomte P, Gil N, Bechtold N, Bouchez D, Dalmaso A, Abad P. 1998.** RPE, a plant gene involved in early developmental steps of nematode feeding cells. *The EMBO journal* **17**: 6799–811.

- Favery B, Quentin M, Jaubert-Possamai S, Abad P. 2016.** Gall-forming root-knot nematodes hijack key plant cellular functions to induce multinucleate and hypertrophied feeding cells. *Journal of Insect Physiology* **84**: 60–69.
- Fei Q, Li P, Teng C, Meyers B. 2015.** Secondary siRNAs from Medicago NB-LRRs modulated via miRNA–target interactions and their abundances. *The Plant Journal*.
- Fei Q, Xia R, Meyers BC. 2013.** Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. *The Plant cell* **25**: 2400–15.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. 2008.** Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics* **2008**: 102–114.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806–811.
- Fosu-Nyarko J, Jones MGK, Wang Z. 2009.** Functional characterization of transcripts expressed in early-stage *Meloidogyne javanica*-induced giant cells isolated by laser microdissection. *Molecular plant pathology* **10**: 237–48.
- Franco-Zorrilla JM, Valli A, Todesco M, Mateos I, Puga MI, Rubio-Somoza I, Leyva A, Weigel D, García JA, Paz-Ares J. 2007.** Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature Genetics* **39**: 1033–1037.
- Fudali SL, Wang C, Williamson VM. 2013.** Ethylene Signaling Pathway Modulates Attractiveness of Host Roots to the Root-Knot Nematode *Meloidogyne hapla*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**: 75–86.
- Fujimoto T, Tomitaka Y, Abe H, Tsuda S, Futai K, Mizukubo T. 2011.** Expression profile of jasmonic acid-induced genes and the induced resistance against the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in tomato plants (*Solanum lycopersicum*) after foliar treatment with methyl jasmonate. *Journal of Plant Physiology* **168**: 1084–1097.
- Fuller V, Lilley C. 2007.** Differential gene expression in *Arabidopsis* following infection by plant-parasitic nematodes *Meloidogyne incognita* and *Heterodera schachtii*. *Molecular Plant Pathology* **8**: 595–609.
- Fuller VLV, Lilley CCJC, Atkinson HJ, Urwin PE. 2007.** Differential gene expression in *Arabidopsis* following infection by plant-parasitic nematodes *Meloidogyne incognita* and *Heterodera schachtii*. *Molecular plant pathology* **8**: 595–609.
- Furuta K, Lichtenberger R, Helariutta Y. 2012.** The role of mobile small RNA species during root growth and development. *Current opinion in cell biology* **24**: 211–6.
- Gal TZ, Aussenberg ER, Burdman S, Kapulnik Y, Koltai H. 2006.** Expression of a plant expansin is involved in the establishment of root knot nematode parasitism in tomato. *Planta* **224**: 155–162.
- Garcia D. 2008.** A miRacle in plant development: Role of microRNAs in cell differentiation and patterning. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **19**: 586–595.
- Garcia-Ruiz H, Takeda A, Chapman EJ, Sullivan CM, Fahlgren N, Brempelis KJ, Carrington JC. 2010.** *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection. *The Plant cell* **22**: 481–96.
- German MA, Pillay M, Jeong D-H, Hetawal A, Luo S, Janardhanan P, Kannan V, Rymarquis LA,**

- Nobuta K, German R, et al. 2008.** Global identification of microRNA–target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends. *Nature Biotechnology* **26**: 941–946.
- Gheysen G, de Almeida Engler J, van Montagu M. 1997.** Cell Cycle Regulation in Nematode Feeding Sites. Springer Netherlands, 120–132.
- Gheysen G, Fenoll C. 2002.** Gene expression in nematode feeding sites. *Annual review of phytopathology* **40**: 191–219.
- Gifford ML, Dean A, Gutierrez RA, Coruzzi GM, Birnbaum KD. 2008.** Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 803–8.
- Goellner M, Wang X, Davis EL. 2001.** Endo-beta-1,4-glucanase expression in compatible plant-nematode interactions. *The Plant cell* **13**: 2241–55.
- Gohlke J, Scholz C-J, Kneitz S, Weber D, Fuchs J, Hedrich R, Deeken R. 2013.** DNA Methylation Mediated Control of Gene Expression Is Critical for Development of Crown Gall Tumors (JM McDowell, Ed.). *PLoS Genetics* **9**: e1003267.
- Golinowski W, Grundler FMW, Sobczak M. 1996.** Changes in the structure of *Arabidopsis thaliana* during female development of the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *Protoplasma* **194**: 103–116.
- Goverse A, Bird D. 2011.** The role of plant hormones in nematode feeding cell formation. *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode*.
- Goverse A, Overmars H, Engelbertink J, Schots A, Bakker J, Helder J. 2000.** Both Induction and Morphogenesis of Cyst Nematode Feeding Cells Are Mediated by Auxin. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 1121–1129.
- Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O, Estelle M. 2001.** Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* **414**: 271–276.
- Grigg SP, Galinha C, Kornet N, Canales C, Scheres B, Tsiantis M. 2009.** Repression of Apical Homeobox Genes Is Required for Embryonic Root Development in *Arabidopsis*. *Current Biology* **19**: 1485–1490.
- Grundler FMW, Sobczak M, Golinowski W. 1998.** Formation of wall openings in root cells of *Arabidopsis thaliana* following infection by the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 545–551.
- Gubler F, Jacobsen J V. 1992.** Gibberellin-responsive elements in the promoter of a barley high-pl alpha-amylase gene. *The Plant cell* **4**: 1435–41.
- Guimaraes PM, Guimaraes LA, Morgante C V, Silva OB, Araujo ACG, Martins ACQ, Saraiva MAP, Oliveira TN, Togawa RC, Leal-Bertioli SCM, et al. 2015.** Root Transcriptome Analysis of Wild Peanut Reveals Candidate Genes for Nematode Resistance. (N Baisakh, Ed.). *PloS one* **10**: e0140937.
- Guo H-S, Xie Q, Fei J-F, Chua N-H. 2005.** MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for *Arabidopsis* lateral root development. *The Plant cell* **17**: 1376–86.
- Gutierrez L, Bussell JD, Pacurar DI, Schwambach J, Pacurar M, Bellini C. 2009.** Phenotypic Plasticity of Adventitious Rooting in *Arabidopsis* Is Controlled by Complex Regulation of AUXIN RESPONSE

FACTOR Transcripts and MicroRNA Abundance. *The Plant Cell* **21**: 3119–3132.

Gutierrez L, Mongelard G, Floková K, Pacurar DI, Novák O, Staswick P, Kowalczyk M, Pacurar M, Demailly H, Geiss G, et al. 2012. Auxin controls Arabidopsis adventitious root initiation by regulating jasmonic acid homeostasis. *The Plant cell* **24**: 2515–27.

Haegeman A, Bauters L, Kyndt T, Rahman MM, Gheysen G. 2013. Identification of candidate effector genes in the transcriptome of the rice root knot nematode *Meloidogyne graminicola*. *Molecular Plant Pathology* **14**: 379–390.

Hamamouch N, LI C, SEO PJ, PARK C-M, DAVIS EL. 2011. Expression of Arabidopsis pathogenesis-related genes during nematode infection. *Molecular Plant Pathology* **12**: 355–364.

Hamilton AJ, Baulcombe DC. 1999. A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science* **286**.

Hammes UZ, Schachtman DP, Berg RH, Nielsen E, Koch W, McIntyre LM, Taylor CG. 2005. Nematode-induced changes of transporter gene expression in Arabidopsis roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**: 1247–1257.

Hannon GJ, Hammond SM, Bernstein E, Beach D. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**: 293–296.

Havecker ER, Wallbridge LM, Hardcastle TJ, Bush MS, Kelly KA, Dunn RM, Schwach F, Doonan JH, Baulcombe DC. 2010. The Arabidopsis RNA-Directed DNA Methylation Argonautes Functionally Diverge Based on Their Expression and Interaction with Target Loci. *The Plant Cell* **22**: 321–334.

Havelda Z, Vrallyay va, Vlcsi A, Burgyn J. 2008. Plant virus infection-induced persistent host gene downregulation in systemically infected leaves. *The Plant Journal* **55**: 278–288.

Hewezi T, Howe P, Maier TR, Baum TJ. 2008. Arabidopsis Small RNAs and Their Targets During Cyst Nematode Parasitism. **21**: 1622–1634.

Hewezi T, Lane T, Piya S, Rambani A, Rice JH, Staton M. 2017. Cyst nematode parasitism induces dynamic changes in the root epigenome. *Plant Physiology*: pp.01948.2016.

Hewezi T, Maier TR, Nettleton D, Baum TJ. 2012. The Arabidopsis microRNA396-GRF1/GRF3 regulatory module acts as a developmental regulator in the reprogramming of root cells during cyst nematode infection. *Plant physiology* **159**: 321–35.

Hewezi T, Piya S, Qi M, Balasubramaniam M, Rice JH, Baum TJ. 2016. Arabidopsis miR827 mediates post-transcriptional gene silencing of its ubiquitin E3 ligase target gene in the syncytium of the cyst nematode *Heterodera schachtii* to enhance susceptibility. *Plant Journal*: 179–192.

Hogenhout SA, Van der Hoorn RAL, Terauchi R, Kamoun S. 2009. Emerging Concepts in Effector Biology of Plant-Associated Organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 115–122.

Holterman M, Karssen G, van den Elsen S, van Megen H, Bakker J, Helder J. 2009. Small Subunit rDNA-Based Phylogeny of the Tylenchida Sheds Light on Relationships Among Some High-Impact Plant-Parasitic Nematodes and the Evolution of Plant Feeding. *Phytopathology* **99**: 227–235.

Holterman M, van der Wurff A, van den Elsen S, van Megen H, Bongers T, Holovachov O, Bakker J, Helder J. 2006. Phylum-Wide Analysis of SSU rDNA Reveals Deep Phylogenetic Relationships among Nematodes and Accelerated Evolution toward Crown Clades. *Molecular Biology and Evolution* **23**: 1792–1800.

van der Hoorn RAL, Kamoun S. 2008. From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant cell* **20**: 2009–17.

Huang CS. 1985. Formation, anatomy and physiology of giant cells induced by root-knot nematodes.

Huang G, Allen R, Davis EL, Baum TJ, Hussey RS. 2006a. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 14302–14306.

Huang G, Dong R, Allen R, Davis EL, Baum TJ, Hussey RS. 2006b. A Root-Knot Nematode Secretory Peptide Functions as a Ligand for a Plant Transcription Factor. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 463–470.

Huang G, Gao B, Maier T, Allen R, Davis EL, Baum TJ, Hussey RS. 2003. A Profile of Putative Parasitism Genes Expressed in the Esophageal Gland Cells of the Root-knot Nematode *Meloidogyne incognita*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 376–381.

Huang C, Maggenti A. 1969. Wall modifications in developing giant cells of *Vicia faba* and *Cucumis sativus* induced by root knot nematode, *Meloidogyne javanica*. *Phytopathology*.

Huang X, Tian B, Niu Q, Yang J, Zhang L, Zhang K. 2005. An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes. *Research in Microbiology* **156**: 719–727.

Hudson L. 2008. Analysis of Cell Wall Synthesis Genes in Feeding Cells Formed by Root-Knot Nematodes.

Hugot J-P, Baujard P, Morand S. 2001. Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology* **3**: 199–208.

Hunter C, Willmann MR, Wu G, Yoshikawa M, de la Luz Gutiérrez-Nava M, Poethig SR. 2006. Trans-acting siRNA-mediated repression of ETTIN and ARF4 regulates heteroblasty in *Arabidopsis*. *Development (Cambridge, England)* **133**: 2973–81.

Hutangura P, Mathesius U, Jones MGK, Rolfe BG. 1999. Auxin induction is a trigger for root gall formation caused by root-knot nematodes in white clover and is associated with the activation of the flavonoid pathway. *Australian Journal of Plant Physiology* **26**: 221.

Ibrahim HMM, Hosseini P, Alkharouf NW, Hussein EH a, Gamal El-Din AEKY, Aly M a M, Matthews BF. 2011. Analysis of gene expression in soybean (*Glycine max*) roots in response to the root knot nematode *Meloidogyne incognita* using microarrays and KEGG pathways. *BMC genomics* **12**: 220.

Jagadeeswaran G, Saini A, Sunkar R. 2009. Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in *Arabidopsis*. *Planta* **229**: 1009–14.

Jammes F, Lecomte P, de Almeida-Engler J, Bitton F, Martin-Magniette M-L, Renou JP, Abad P, Favery B. 2005. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **44**: 447–58.

Jaouannet M, Magliano M, Arguel MJ, Gourgues M, Evangelisti E, Abad P, Rosso MN. 2013. The Root-Knot Nematode Calreticulin Mi-CRT Is a Key Effector in Plant Defense Suppression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**: 97–105.

Jaouannet M, Perfus-Barbeoch L, Deleury E, Magliano M, Engler G, Vieira P, Danchin EGJ, Rocha M Da, Coquillard P, Abad P, et al. 2012. A root-knot nematode-secreted protein is injected into giant

cells and targeted to the nuclei. *New Phytologist* **194**: 924–931.

Jaubert S, Laffaire J-B, Abad P, Rosso M-N. 2002a. A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *FEBS letters* **522**: 109–12.

Jaubert S, Laffaire J-B, Ledger TN, Escoubas P, Amri E-Z, Abad P, Rosso MN. 2004. Comparative analysis of two 14-3-3 homologues and their expression pattern in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *International Journal for Parasitology* **34**: 873–880.

Jaubert S, Laffaire JB, Piotte C, Abad P, Rosso M-N, Ledger TN. 2002b. Direct identification of stylet secreted proteins from root-knot nematodes by a proteomic approach. *Molecular and Biochemical Parasitology* **121**: 205–211.

Jaubert S, Milac AL, Petrescu AJ, Almeida-engler J De, Abad P, Rosso M, Interactions P, Health P, Bp C, Antipolis S. 2005. In Planta Secretion of a Calreticulin by Migratory and Sedentary Stages of Root-Knot Nematode. **18**: 1277–1284.

Jauvion V, Rivard M, Bouteiller N, Elmayan T, Vaucheret H. 2012. RDR2 Partially Antagonizes the Production of RDR6-Dependent siRNA in Sense Transgene-Mediated PTGS (P Meyer, Ed.). *PLoS ONE* **7**: e29785.

Jepson SB. 1987. *Identification of root-knot nematodes (Meloidogyne species)*. C.A.B. International.

Ji H, Gheysen G, Denil S, Lindsey K, Topping JF, Nahar K, Haegeman A, De Vos WH, Trooskens G, Van Criekeing W, et al. 2013. Transcriptional analysis through RNA sequencing of giant cells induced by *Meloidogyne graminicola* in rice roots. *Journal of Experimental Botany* **64**: 3885–3898.

Jin H, Vacic V, Girke T, Lonardi S, Zhu J-K. 2008. Small RNAs and the regulation of cis-natural antisense transcripts in Arabidopsis. *BMC Molecular Biology* **9**: 6.

Johnson C, Kasprzewska A, Tennessen K, Fernandes J, Nan G-L, Walbot V, Sundaresan V, Vance V, Bowman LH. 2009. Clusters and superclusters of phased small RNAs in the developing inflorescence of rice. *Genome Research* **19**: 1429–1440.

Jones-Rhoades MW. 2012. Conservation and divergence in plant microRNAs. *Plant Molecular Biology* **80**: 3–16.

Jones-Rhoades MW, Bartel DP. 2004. Computational Identification of Plant MicroRNAs and Their Targets, Including a Stress-Induced miRNA. *Molecular Cell* **14**: 787–799.

Jones JDG, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.

Jones JT, Haegeman A, Danchin EGJ, Gaur HS, Helder J, Jones MGK, Kikuchi T, Manzanilla-López R, Palomares-Rius JE, Wesemael WML, et al. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **14**: 946–961.

Jones M, Northcote D. 1972. Nematode-induced syncytium—a multinucleate transfer cell. *J Cell Sci.*

Jones MG, Payne HL. 1978. Early stages of nematode-induced giant-cell formation in roots of *Impatiens balsamina*. *Journal of nematology* **10**: 70–84.

Jung J-H, Seo Y-H, Seo PJ, Reyes JL, Yun J, Chua N-H, Park C-M. 2007. The GIGANTEA-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of CONSTANS in Arabidopsis. *The Plant cell* **19**: 2736–48.

Kandath PK, Mitchum MG. 2013. War of the worms: how plants fight underground attacks. *Current*

Opinion in Plant Biology **16**: 457–463.

Karczmarek A, Ovemars H, Helder J, Goverse A. 2004. Feeding cell development by cyst and root-knot nematodes involves a similar early, local and transient activation of a specific auxin-inducible promoter element. *Molecular Plant Pathology* **5**: 343–346.

Kasschau KD, Fahlgren N, Chapman EJ, Sullivan CM, Cumbie JS, Givan S a., Carrington JC. 2007. Genome-wide profiling and analysis of Arabidopsis siRNAs. *PLoS Biology* **5**: 0479–0493.

Katiyar-Agarwal S, Gao S, Vivian-Smith A, Jin H. 2007. A novel class of bacteria-induced small RNAs in Arabidopsis. *Genes & development* **21**: 3123–34.

Katiyar-Agarwal S, Morgan R, Dahlbeck D, Borsani O, Villegas A, Zhu J-K, Staskawicz BJ, Jin H. 2006. A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 18002–7.

Kaur P, Shukla N, Joshi G, VijayaKumar C, Jagannath A, Agarwal M, Goel S, Kumar A. 2017. Genome-wide identification and characterization of miRNAome from tomato (*Solanum lycopersicum*) roots and root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) during susceptible interaction (Q Zou, Ed.). *PLOS ONE* **12**: e0175178.

Khraiwesh B, Zhu J-K, Zhu J. 2012. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1819**: 137–148.

Knauer S, Holt AL, Rubio-Somoza I, Tucker EJ, Hinze A, Pisch M, Javelle M, Timmermans MC, Tucker MR, Laux T. 2013. A Protodermal miR394 Signal Defines a Region of Stem Cell Competence in the Arabidopsis Shoot Meristem. *Developmental Cell* **24**: 125–132.

Koyama T, Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K, Ohme-Takagi M. 2010. TCP transcription factors regulate the activities of ASYMMETRIC LEAVES1 and miR164, as well as the auxin response, during differentiation of leaves in Arabidopsis. *The Plant cell* **22**: 3574–88.

van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR. 1990. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *The Plant cell* **2**: 291–9.

Kurihara Y, Takashi Y, Watanabe Y. 2006. The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA (New York, N.Y.)* **12**: 206–12.

Kyndt T, Denil S, Haegeman A, Trooskens G, Bauters L, Van Criekinge W, De Meyer T, Gheysen G. 2012. Transcriptional reprogramming by root knot and migratory nematode infection in rice. *The New phytologist* **196**: 887–900.

Lambert KN, Allen KD, Sussex IM. 1999. Cloning and Characterization of an Esophageal-Gland-Specific Chorismate Mutase from the Phytoparasitic Nematode *Meloidogyne javanica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**: 328–336.

Lanahan MB, Ho TH, Rogers SW, Rogers JC. 1992. A gibberellin response complex in cereal alpha-amylase gene promoters. *The Plant cell* **4**: 203–11.

Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology* **10**: R25.

Laufs P, Peaucelle A, Morin H, Traas J. 2004. MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems. *Development* **131**: 4311–4322.

- Lauressergues D, Delaux P-M, Formey D, Lelandais-Brière C, Fort S, Cottaz S, Bécard G, Niebel A, Roux C, Combier J-P. 2012.** The microRNA miR171h modulates arbuscular mycorrhizal colonization of *Medicago truncatula* by targeting *NSP2*. *The Plant Journal* **72**: 512–522.
- Law JA, Jacobsen SE. 2010.** Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature reviews. Genetics* **11**: 204–20.
- Le T-N, Schumann U, Smith NA, Tiwari S, Au PCK, Zhu Q-H, Taylor JM, Kazan K, Llewellyn DJ, Zhang R, et al. 2014.** DNA demethylases target promoter transposable elements to positively regulate stress responsive genes in Arabidopsis. *Genome biology* **15**: 458.
- Ledger TN, Jaubert S, Bosselut N, Abad P, Rosso M-N. 2006.** Characterization of a new β -1,4-endoglucanase gene from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and evolutionary scheme for phytonematode family 5 glycosyl hydrolases. *Gene* **382**: 121–128.
- Lee HW, Kim NY, Lee DJ, Kim J. 2009.** LBD18/ASL20 regulates lateral root formation in combination with LBD16/ASL18 downstream of ARF7 and ARF19 in Arabidopsis. *Plant physiology* **151**: 1377–89.
- Lee HJ, Park YJ, Kwak KJ, Kim D, Park JH, Lim JY, Shin C, Yang K-Y, Kang H. 2015.** MicroRNA844-Guided Downregulation of Cytidinephosphate Diacylglycerol Synthase3 (CDS3) mRNA Affects the Response of *Arabidopsis thaliana* to Bacteria and Fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **28**: 892–900.
- Lelandais-Brière C, Naya L, Sallet E, Calenge F, Frugier F, Hartmann C, Gouzy J, Crespi M. 2009.** Genome-wide *Medicago truncatula* small RNA analysis revealed novel microRNAs and isoforms differentially regulated in roots and nodules. *The Plant cell* **21**: 2780–96.
- Leung AKL, Sharp PA. 2013.** Quantifying Argonaute proteins in and out of GW/P-bodies: implications in microRNA activities. *Advances in experimental medicine and biology* **768**: 165–82.
- Lewis EE, Pérez EE. 2004.** Ageing and developmental behaviour. Nematode behaviour. Wallingford: CABI, 151–176.
- De Ley P, Blaxter M. 2002.** Systematic position and phylogeny. The biology of nematodes.1–30.
- Li H, Deng Y, Wu T, Subramanian S, Yu O. 2010a.** Misexpression of miR482, miR1512, and miR1515 Increases Soybean Nodulation. *PLANT PHYSIOLOGY* **153**: 1759–1770.
- Li J, Guo G, Guo W, Guo G, Tong D, Ni Z, Sun Q, Yao Y, Souer E, Houwelingen A van, et al. 2012a.** miRNA164-directed cleavage of ZmNAC1 confers lateral root development in maize (*Zea mays* L.). *BMC Plant Biology* **12**: 220.
- Li Y, Lu Y-G, Shi Y, Wu L, Xu Y-J, Huang F, Guo X-Y, Zhang Y, Fan J, Zhao J-Q, et al. 2014.** Multiple rice microRNAs are involved in immunity against the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant physiology* **164**: 1077–92.
- Li X, Wang X, Zhang S, Liu D, Duan Y, Dong W. 2012b.** Identification of soybean microRNAs involved in soybean cyst nematode infection by deep sequencing. *PLoS one* **7**: e39650.
- Li J, Yang Z, Yu B, Liu J, Chen X. 2005.** Methylation Protects miRNAs and siRNAs from a 3'-End Uridylation Activity in Arabidopsis. *Current Biology* **15**: 1501–1507.
- Li Y, Zhang Q, Zhang J, Wu L, Qi Y, Zhou JM. 2010b.** Identification of MicroRNAs Involved in Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Plant Innate Immunity. *PLANT PHYSIOLOGY* **152**: 2222–2231.

- Lin S-S, Wu H-W, Elena SF, Chen K-C, Niu Q-W, Yeh S-D, Chen C-C, Chua N-H. 2009.** Molecular evolution of a viral non-coding sequence under the selective pressure of amiRNA-mediated silencing. *PLoS pathogens* **5**: e1000312.
- Lin B, Zhuo K, Chen S, Hu L, Sun L, Wang X, Zhang L-H, Liao J. 2016.** A novel nematode effector suppresses plant immunity by activating host reactive oxygen species-scavenging system. *New Phytologist* **209**: 1159–1173.
- Lin B, Zhuo K, Wu P, Cui R, Zhang L-H, Liao J. 2013.** A Novel Effector Protein, MJ-NULG1a, Targeted to Giant Cell Nuclei Plays a Role in *Meloidogyne javanica* Parasitism. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**: 55–66.
- Lister R, O'Malley RC, Tonti-Filippini J, Gregory BD, Berry CC, Millar AH, Ecker JR. 2008.** Highly Integrated Single-Base Resolution Maps of the Epigenome in Arabidopsis. *Cell* **133**: 523–536.
- Liu J, He Y, Amasino R, Chen X. 2004.** siRNAs targeting an intronic transposon in the regulation of natural flowering behavior in Arabidopsis. *Genes & Development* **18**: 2873–2878.
- Liu Y, Wang Y, Zhu Q-H, Fan L. 2013.** Identification of phasiRNAs in wild rice (*Oryza rufipogon*). *Plant Signaling & Behavior* **8**: e25079.
- Liu N, Wu S, Houten J Van, Wang Y, Ding B, Fei Z, Clarke TH, Reed JW, Van Der Knaap E. 2014.** Down-regulation of AUXIN RESPONSE FACTORS 6 and 8 by microRNA 167 leads to floral development defects and female sterility in tomato. *Journal of Experimental Botany* **65**: 2507–2520.
- Lohar DP, Schaff JE, Laskey JG, Kieber JJ, Bilyeu KD, Bird DM. 2004.** Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and Rhizobial symbioses. *The Plant Journal* **38**: 203–214.
- López A, Ramírez V, García-Andrade J, Flors V, Vera P. 2011.** The RNA Silencing Enzyme RNA Polymerase V Is Required for Plant Immunity (CS Pikaard, Ed.). *PLoS Genetics* **7**: e1002434.
- Ludewig A. 2013.** Ascaroside signaling in *C. elegans*. *WormBook*: 1–22.
- Ma C, Burd S, Lers A. 2015.** miR408 is involved in abiotic stress responses in Arabidopsis. *Plant J* **84**: 169–187.
- Ma Z, Coruh C, Axtell MJ. 2010.** Arabidopsis lyrata small RNAs: transient MIRNA and small interfering RNA loci within the Arabidopsis genus. *The Plant cell* **22**: 1090–103.
- MacRae IJ, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks AN, Cande WZ, Adams PD, Doudna JA. 2006.** Structural Basis for Double-Stranded RNA Processing by Dicer. *Science* **311**: 195–198.
- Maillet F, Poinot V, André O, Puech-Pagès V, Haouy A, Gueunier M, Cromer L, Giraudet D, Formey D, Niebel A, et al. 2011.** Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* **469**: 58–63.
- Mallory AC, Bartel DP, Bartel B. 2005.** MicroRNA-Directed Regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 Is Essential for Proper Development and Modulates Expression of Early Auxin Response Genes. **17**: 1360–1375.
- Mallory AC, Bouché N. 2008.** MicroRNA-directed regulation: to cleave or not to cleave. *Trends in plant science* **13**: 359–67.
- Mallory AC, Reinhart BJ, Jones-Rhoades MW, Tang G, Zamore PD, Barton MK, Bartel DP. 2004.** MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *The EMBO Journal* **23**: 3356–3364.

- Mallory A, Vaucheret H. 2010a.** Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *The Plant cell* **22**: 3879–89.
- Mallory A, Vaucheret H. 2010b.** Form, Function, and Regulation of ARGONAUTE Proteins. *The Plant Cell* **22**: 3879–3889.
- Manavella PA, Koenig D, Weigel D. 2012.** Plant secondary siRNA production determined by microRNA-duplex structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 2461–6.
- Manosalva P, Manohar M, von Reuss SH, Chen S, Koch A, Kaplan F, Choe A, Micikas RJ, Wang X, Kogel K-H, et al. 2015.** Conserved nematode signalling molecules elicit plant defenses and pathogen resistance. *Nature Communications* **6**: 7795.
- Mao G, Turner M, Yu O, Subramanian S. 2013.** miR393 and miR164 influence indeterminate but not determinate nodule development. *Plant Signaling & Behavior* **8**: e26753.
- Marella HH, Nielsen E, Schachtman DP, Taylor CG. 2013.** The Amino Acid Permeases AAP3 and AAP6 Are Involved in Root-Knot Nematode Parasitism of *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**: 44–54.
- Margis R, Fusaro AF, Smith NA, Curtin SJ, Watson JM, Finnegan EJ, Waterhouse PM. 2006.** The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Letters* **580**: 2442–2450.
- Marin E, Jouannet V, Herz A, Lokerse AS, Weijers D, Vaucheret H, Nussaume L, Crespi MD, Maizel A. 2010.** miR390, Arabidopsis TAS3 tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. *The Plant cell* **22**: 1104–17.
- Mathesius U. 2003.** Conservation and divergence of signalling pathways between roots and soil microbes – the Rhizobium-legume symbiosis compared to the development of lateral roots, mycorrhizal interactions and nematode-induced galls. *Plant and Soil* **255**: 105–119.
- Matzke M, Kanno T, Daxinger L, Huettel B, Matzke AJ. 2009.** RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Current Opinion in Cell Biology* **21**: 367–376.
- Matzke MA, Mosher RA. 2014.** RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Reviews Genetics* **15**: 394–408.
- Mazarei M, Lennon KA, Puthoff DP, Rodermel SR, Baum TJ. 2003.** Expression of an Arabidopsis phosphoglycerate mutase homologue is localized to apical meristems, regulated by hormones, and induced by sedentary plant-parasitic nematodes. *Plant Molecular Biology* **53**: 513–530.
- McCue AD, Panda K, Nuthikattu S, Choudury SG, Thomas EN, Slotkin RK. 2015.** ARGONAUTE 6 bridges transposable element mRNA-derived siRNAs to the establishment of DNA methylation. *The EMBO Journal* **34**: 20–35.
- van Megen H, Olovachov, OleksandrBongers T, Bakker J, Helder J, van den Elsen S, Holterman M, Karssen G, Mooyman P. 2009.** A phylogenetic tree of nematodes based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences. *Nematology* **11**: 927–950.
- Meister G, Tuschl T. 2004.** Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**: 343–349.
- Melillo MT, Leonetti P, Bongiovanni M, Castagnone-Sereno P, Bleve-Zacheo T. 2006.** Modulation of reactive oxygen species activities and H₂O₂ accumulation during compatible and incompatible

tomato-root-knot nematode interactions. *New Phytologist* **170**: 501–512.

Meng Y, Ma X, Chen D, Wu P, Chen M. 2010. MicroRNA-mediated signaling involved in plant root development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **393**: 345–349.

Metzker ML. 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nature reviews. Genetics* **11**: 31–46.

De Meutter J, Tytgat T, Prinsen E, Gheysen G, Van Onckelen H, Gheysen G. 2005. Production of auxin and related compounds by the plant parasitic nematodes *Heterodera schachtii* and *Meloidogyne incognita*. *Communications in agricultural and applied biological sciences* **70**: 51–60.

De Meutter J, Tytgat T, Witters E, Gheysen G, Van Onckelen H, Gheysen G. 2003. Identification of cytokinins produced by the plant parasitic nematodes *Heterodera schachtii* and *Meloidogyne incognita*. *Molecular Plant Pathology* **4**: 271–277.

Mi S, Cai T, Hu Y, Chen Y, Hodges E, Ni F, Wu L, Li S, Zhou H, Long C, et al. 2008. Sorting of Small RNAs into Arabidopsis Argonaute Complexes Is Directed by the 5' Terminal Nucleotide. *Cell* **133**: 116–127.

Millar AA, Gubler F. 2005. The Arabidopsis GAMYB-Like Genes, MYB33 and MYB65, Are MicroRNA-Regulated Genes That Redundantly Facilitate Anther Development. **17**: 705–721.

Mitchum MG, Sukno S, Wang X, Shani Z, Tsabary G, Shoseyov O. 2004. The promoter of the Arabidopsis thaliana Cel1 endo-1,4- β glucanase gene is differentially expressed in plant feeding cells induced by root-knot and cyst nematodes. *Molecular plant pathology* **5**: 175–181.

Mitreva-Dautova M, Roze E, Overmars H, de Graaff L, Schots A, Helder J, Goverse A, Bakker J, Smant G. 2006. A Symbiont-Independent Endo-1,4- β -Xylanase from the Plant-Parasitic Nematode *Meloidogyne incognita*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 521–529.

Miyashima S, Honda M, Hashimoto K, Tatematsu K, Hashimoto T, Sato-Nara K, Okada K, Nakajima K. 2013. A Comprehensive Expression Analysis of the Arabidopsis MICRORNA165/6 Gene Family during Embryogenesis Reveals a Conserved Role in Meristem Specification and a Non-Cell-Autonomous Function. *Plant and Cell Physiology* **54**: 375–384.

Moens M, Perry RN, Starr JL. 2011. *Meloidogyne* species - a diverse group of novel and important plant parasites. Root-knot nematodes. Wallingford: CABI, 1–17.

Montgomery TA, Howell MD, Cuperus JT, Li D, Hansen JE, Alexander AL, Chapman EJ, Fahlgren N, Allen E, Carrington JC. 2008. Specificity of ARGONAUTE7-miR390 Interaction and Dual Functionality in TAS3 Trans-Acting siRNA Formation. *Cell* **133**: 128–141.

Morel J-B, Godon C, Mourrain P, Béclin C, Boutet S, Feuerbach F, Proux F, Vaucheret H. 2002. Fertile hypomorphic ARGONAUTE (*ago1*) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *The Plant cell* **14**: 629–39.

Morin RD, Aksay G, Dolgosheina E, Ebhardt HA, Magrini V, Mardis ER, Sahinalp SC, Unrau PJ. 2008. Comparative analysis of the small RNA transcriptomes of *Pinus contorta* and *Oryza sativa*. *Genome Research* **18**: 571–584.

Nahar K, Kyndt T, Hause B, Höfte M, Gheysen G. 2013. Brassinosteroids Suppress Rice Defense Against Root-Knot Nematodes Through Antagonism With the Jasmonate Pathway. *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI* **106**: 106–115.

- Nahar K, Kyndt T, De Vleeschauwer D, Höfte M, Gheysen G. 2011.** The Jasmonate Pathway Is a Key Player in Systemically Induced Defense against Root Knot Nematodes in Rice. *Plant Physiology* **157**: 305–316.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. 1990.** Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant cell* **2**: 279–289.
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JDG. 2006.** A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science (New York, N.Y.)* **312**: 436–9.
- Navarro L, Jay F, Nomura K, He SY, Voinnet O. 2008.** Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science (New York, N.Y.)* **321**: 964–7.
- Nawrocki EP, Burge SW, Bateman A, Daub J, Eberhardt RY, Eddy SR, Floden EW, Gardner PP, Jones TA, Tate J, et al. 2015.** Rfam 12.0: updates to the RNA families database. *Nucleic acids research* **43**: D130–7.
- Neveu C, Jaubert S, Abad P, Castagnone-Sereno P. 2003.** A Set of Genes Differentially Expressed Between Avirulent and Virulent *Meloidogyne incognita* Near-Isogenic Lines Encode Secreted Proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 1077–1084.
- Niblack TL, Lambert KN, Tylka GL. 2006.** A Model Plant Pathogen from the Kingdom Animalia: *Heterodera glycines*, the Soybean Cyst Nematode. *Annual Review of Phytopathology* **44**: 283–303.
- Niebel A, de Almeida Engler J, Hemerly A, Ferreira P, Inzé D, Van Montagu M, Gheysen G. 1996.** Induction of *cdc2a* and *cyc1At* expression in *Arabidopsis thaliana* during early phases of nematode-induced feeding cell formation. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **10**: 1037–43.
- Niu Q-W, Lin S-S, Reyes JL, Chen K-C, Wu H-W, Yeh S-D, Chua N-H. 2006.** Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. *Nature Biotechnology* **24**: 1420–1428.
- Niu J, Liu P, Liu Q, Chen C, Guo Q, Yin J, Yang G, Jian H. 2016.** Msp40 effector of root-knot nematode manipulates plant immunity to facilitate parasitism. *Scientific Reports* **6**: 19443.
- Nobuta K, Lu C, Shrivastava R, Pillay M, De Paoli E, Accerbi M, Arteaga-Vazquez M, Sidorenko L, Jeong D-H, Yen Y, et al. 2008.** Distinct size distribution of endogenous siRNAs in maize: Evidence from deep sequencing in the *mop1-1* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 14958–14963.
- Nova-Franco B, Íñiguez LP, Valdés-López O, Alvarado-Affantranger X, Leija A, Fuentes SI, Ramírez M, Paul S, Reyes JL, Girard L, et al. 2015.** The Micro-RNA172c-APETALA2-1 Node as a Key Regulator of the Common Bean- *Rhizobium etli* Nitrogen Fixation Symbiosis. *Plant Physiology* **168**: 273–291.
- Nuthikattu S, McCue AD, Panda K, Fultz D, DeFraia C, Thomas EN, Slotkin RK. 2013.** The Initiation of Epigenetic Silencing of Active Transposable Elements Is Triggered by RDR6 and 21-22 Nucleotide Small Interfering RNAs. *PLANT PHYSIOLOGY* **162**: 116–131.
- Okushima Y, Fukaki H, Onoda M, Theologis A, Tasaka M. 2007.** ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **19**: 118–30.
- Oldroyd GED, Long SR. 2003.** Identification and Characterization of Nodulation-Signaling Pathway 2, a Gene of *Medicago truncatula* Involved in Nod Factor Signaling. *PLANT PHYSIOLOGY* **131**: 1027–

Opperman CH, Bird DM, Williamson VM, Rokhsar DS, Burke M, Cohn J, Cromer J, Diener S, Gajan J, Graham S, et al. 2008. Sequence and genetic map of *Meloidogyne hapla*: A compact nematode genome for plant parasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 14802–7.

Ori N, Cohen AR, Etzioni A, Brand A, Yanai O, Shleizer S, Menda N, Amsellem Z, Efroni I, Pekker I, et al. 2007. Regulation of LANCEOLATE by miR319 is required for compound-leaf development in tomato. *Nature Genetics* **39**: 787–791.

Orman-Ligeza B, Parizot B, Gantet PP, Beeckman T, Bennett MJ, Draye X. 2013. Post-embryonic root organogenesis in cereals: branching out from model plants. *Trends in Plant Science* **18**: 459–467.

Padmanabhan C, Zhang X, Jin H. 2009. Host small RNAs are big contributors to plant innate immunity. *Current opinion in plant biology* **12**: 465–72.

Palatnik JF, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC, Weigel D. 2003. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* **425**: 257–63.

Palatnik JF, Wollmann H, Schommer C, Schwab R, Boisbouvier J, Rodriguez R, Warthmann N, Allen E, Dezulian T, Huson D, et al. 2007. Sequence and Expression Differences Underlie Functional Specialization of Arabidopsis MicroRNAs miR159 and miR319. *Developmental Cell* **13**: 115–125.

Pandey SP, Baldwin IT. 2007. RNA-directed RNA polymerase 1 (RdR1) mediates the resistance of *Nicotiana attenuata* to herbivore attack in nature. *The Plant Journal* **50**: 40–53.

Park YJ, Lee HJ, Kwak KJ, Lee K, Hong SW, Kang H. 2014. MicroRNA400-Guided Cleavage of Pentatricopeptide Repeat Protein mRNAs Renders *Arabidopsis thaliana* More Susceptible to Pathogenic Bacteria and Fungi. *Plant and Cell Physiology* **55**: 1660–1668.

Park MY, Wu G, Gonzalez-Sulser A, Vaucheret H, Poethig RS. 2005. Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 3691–6.

Parry G, Calderon-Villalobos LI, Prigge M, Peret B, Dharmasiri S, Itoh H, Lechner E, Gray WM, Bennett M, Estelle M. 2009. Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 22540–5.

Peng H-C, Kaloshian I, Brunner H, Brakch N, Martin G. 2014. The Tomato Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinases SISRK3A and SISRK3B Have Overlapping Functions in Bacterial and Nematode Innate Immunity (J Jones, Ed.). *PLoS ONE* **9**: e93302.

Peragine A, Yoshikawa M, Wu G, Albrecht HL, Poethig RS. 2004. SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes & Development* **18**: 2368–2379.

Pérez-Quintero AL, Neme R, Zapata A, López C. 2010. Plant microRNAs and their role in defense against viruses: a bioinformatics approach. *BMC plant biology* **10**: 138.

Perez L, ANDRE N, GUTLEBEN C, VENDEVILLE J, LACORDAIRE A-I, MAURY A, CHAPIN E. 2010. *Phytoma, défense des cultures; revue mensuelle d'information et de documentation*. S.E.P.A.I.C.

Petitot A-S, Kyndt T, Haidar R, Dereeper A, Collin M, de Almeida Engler J, Gheysen G, Fernandez D. 2017. Transcriptomic and histological responses of African rice (*Oryza glaberrima*) to *Meloidogyne*

graminicola provide new insights into root-knot nematode resistance in monocots. *Annals of Botany* **119**: 885–899.

Platel R. 1992. Nematelminthes. Des protozoaires aux échinodermes. 75–79.

Portillo M, Cabrera J, Lindsey K, Topping J, Andrés MF, Emiliozzi M, Oliveros JC, García-Casado G, Solano R, Koltai H, et al. 2013. Distinct and conserved transcriptomic changes during nematode-induced giant cell development in tomato compared with Arabidopsis: a functional role for gene repression. *The New phytologist* **197**: 1276–90.

Portillo M, Lindsey K, Casson S, García-casado G, Solano R, Fenoll C, Escobar C. 2009. Technical advance Isolation of RNA from laser-capture-microdissected giant cells at early differentiation stages suitable for differential transcriptome analysis. **10**: 523–535.

Postnikova OA, Hult M, Shao J, Skantar A, Nemchinov LG. 2015. Transcriptome analysis of resistant and susceptible alfalfa cultivars infected with root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *PloS one* **10**: e0123157.

Priya DB, Somasekhar N, Prasad J, Kirti P. 2011. Transgenic tobacco plants constitutively expressing Arabidopsis NPR1 show enhanced resistance to root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *BMC research notes* **4**: 231.

Pruss GJ, Nester EW, Vance V. 2008. Infiltration with *Agrobacterium tumefaciens* Induces Host Defense and Development-Dependent Responses in the Infiltrated Zone. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 1528–1538.

Pumplin N, Voinnet O. 2013. RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature reviews. Microbiology* **11**: 745–60.

Qu J, Ye J, Fang R. 2007. Artificial microRNA-mediated virus resistance in plants. *Journal of virology* **81**: 6690–9.

Quentin M, Abad P, Favery B. 2013. Plant parasitic nematode effectors target host defense and nuclear functions to establish feeding cells. *Frontiers in Plant Science* **4**: 53.

Raja P, Sanville BC, Buchmann RC, Bisaro DM. 2008. Viral Genome Methylation as an Epigenetic Defense against Geminiviruses. *Journal of Virology* **82**: 8997–9007.

Rajagopalan R, Vaucheret H, Trejo J, Bartel DP. 2006. A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in Arabidopsis thaliana. *Genes & Development* **20**: 3407–3425.

Rambani A, Rice JH, Liu J, Lane T, Ranjan P, Mazarei M, Pantalone V, Stewart CN, Staton M, Hewezi T. 2015. The Methylome of Soybean Roots during the Compatible Interaction with the Soybean Cyst Nematode. *Plant physiology* **168**: 1364–77.

Rigal M, Kevei Z, Péliissier T, Mathieu O. 2012. DNA methylation in an intron of the IBM1 histone demethylase gene stabilizes chromatin modification patterns. *The EMBO Journal* **31**: 2981–2993.

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. *The Plant Journal* **67**: 218–231.

Rodiuc N, Barlet X, Hok S, Perfus-Barbeoch L, Allasia V, Engler G, Séassau A, Marteu N, de Almeida-Engler J, Panabières F, et al. 2016. Evolutionarily distant pathogens require the *Arabidopsis* phyto-sulfokine signalling pathway to establish disease. *Plant, Cell & Environment* **39**: 1396–1407.

- Rodriguez RE, Mecchia M a, Debernardi JM, Schommer C, Weigel D, Palatnik JF. 2010.** Control of cell proliferation in *Arabidopsis thaliana* by microRNA miR396. *Development (Cambridge, England)* **137**: 103–12.
- Rogers K, Chen X. 2013.** Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant cell* **25**: 2383–99.
- Rohini HM, Ekanayake K, Vito D di. 1986.** Life cycle and multiplication of *Meloidogyne incognita* on tomato and egg plant seedlings. *Tropical Agriculturist* **142**: 59–68.
- Ron M, Saez M, Williams L, Fletcher J. 2010.** Proper regulation of a sperm-specific cis-nat-siRNA is essential for double fertilization in *Arabidopsis*. *Genes &*
- Ronemus M, Vaughn MW, Martienssen RA. 2006.** MicroRNA-targeted and small interfering RNA-mediated mRNA degradation is regulated by argonaute, dicer, and RNA-dependent RNA polymerase in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **18**: 1559–74.
- Rosso M-N, Favery B, Piotte C, Arthaud L, De Boer JM, Hussey RS, Bakker J, Baum TJ, Abad P. 1999.** Isolation of a cDNA Encoding a β -1,4-endoglucanase in the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita* and Expression Analysis During Plant Parasitism. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**: 585–591.
- Rosso M-N, Grenier E. 2011.** Other Nematode Effectors and Evolutionary Constraints. *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*. Dordrecht: Springer Netherlands, 287–307.
- Rosso MN, Jones JT, Abad P. 2009.** RNAi and Functional Genomics in Plant Parasitic Nematodes. *Annual Review of Phytopathology* **47**: 207–232.
- Roze E, HANSE B, MITREVA M, VANHOLME B, BAKKER J, SMANT G. 2007.** Mining the secretome of the root-knot nematode *Meloidogyne chitwoodi* for candidate parasitism genes. *Molecular Plant Pathology* **0**: 071031023555002–???
- Rubio-Somoza I, Weigel D. 2011.** MicroRNA networks and developmental plasticity in plants. *Trends in plant science* **16**: 258–64.
- Rubio-Somoza I, Weigel D. 2013.** Coordination of Flower Maturation by a Regulatory Circuit of Three MicroRNAs. *PLoS Genetics* **9**.
- Ruiz-Ferrer V, Voinnet O. 2009.** Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annual review of plant biology* **60**: 485–510.
- Rutter WB, Hewezi T, Abubucker S, Maier TR, Huang G, Mitreva M, Hussey RS, Baum TJ. 2014.** Mining Novel Effector Proteins from the Esophageal Gland Cells of *Meloidogyne incognita*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**: 965–974.
- de Sá MEL, Conceição Lopes MJ, de Araújo Campos M, Paiva LV, Dos Santos RMA, Beneventi MA, Firmino AAP, de Sá MFG. 2012.** Transcriptome analysis of resistant soybean roots infected by *Meloidogyne javanica*. *Genetics and molecular biology* **35**: 272–82.
- Satina S, Blakeslee AF, Avery AG. 1940.** Demonstration of the Three Germ Layers in the Shoot Apex of *Datura* by Means of Induced Polyploidy in Periclinal Chimeras. *American Journal of Botany* **27**: 895.
- Schaff JE, Nielsen DM, Smith CP, Scholl EH, Bird DM. 2007.** Comprehensive transcriptome profiling in tomato reveals a role for glycosyltransferase in Mi-mediated nematode resistance. *Plant physiology* **144**: 1079–92.

- Schauer SE, Jacobsen SE, Meinke DW, Ray A. 2002.** DICER-LIKE1: blind men and elephants in Arabidopsis development. *Trends in Plant Science* **7**: 487–491.
- Schommer C, Debernardi JM, Bresso EG, Rodriguez RE, Palatnik JF. 2014.** Repression of cell proliferation by miR319-regulated TCP4. *Molecular plant* **7**: 1533–1544.
- Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KF, Jürgens G, Laux T. 2000.** The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell* **100**: 635–44.
- Shahid S, Axtell MJ. 2014.** Identification and annotation of small RNA genes using ShortStack. *Methods (San Diego, Calif.)* **67**: 20–7.
- Sharon E, Spiegel Y. 1993.** Glycoprotein Characterization of the Gelatinous Matrix in the Root-knot Nematode *Meloidogyne javanica*. *Journal of nematology* **25**: 585–9.
- Shindo T, Misas-Villamil JC, Hörger AC, Song J, van der Hoorn RAL. 2012.** A Role in Immunity for Arabidopsis Cysteine Protease RD21, the Ortholog of the Tomato Immune Protease C14 (C-H Yang, Ed.). *PLoS ONE* **7**: e29317.
- Sieber P, Wellmer F, Gheyselinck J, Riechmann JL, Meyerowitz EM. 2007.** Redundancy and specialization among plant microRNAs: role of the MIR164 family in developmental robustness. *Development* **134**.
- Sijmons PC, Atkinson HJ, Wyss U. 1994.** Parasitic Strategies of Root Nematodes and Associated Host Cell Responses. *Annual Review of Phytopathology* **32**: 235–259.
- Skriver K, Olsen FL, Rogers JC, Mundy J. 1991.** cis-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 7266–70.
- Smant G, Stokkermans JP, Yan Y, de Boer JM, Baum TJ, Wang X, Hussey RS, Gommers FJ, Henrissat B, Davis EL, et al. 1998.** Endogenous cellulases in animals: isolation of beta-1, 4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 4906–11.
- Smith ZR, Long JA. 2010.** Control of Arabidopsis apical–basal embryo polarity by antagonistic transcription factors. *Nature* **464**: 423–426.
- Sobczak M, Fudali S, Wiczyrek K. 2011.** Cell Wall Modifications Induced by Nematodes. Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions. Dordrecht: Springer Netherlands, 395–422.
- Sobczak M, Golinowski W. 2008.** Structure of Cyst Nematode Feeding Sites. Springer Berlin Heidelberg, 1–35.
- Song X, Li P, Zhai J, Zhou M, Ma L, Liu B, Jeong D-H, Nakano M, Cao S, Liu C, et al. 2012.** Roles of DCL4 and DCL3b in rice phased small RNA biogenesis. *The Plant Journal* **69**: 462–474.
- Soppe WJ, Jacobsen SE, Alonso-Blanco C, Jackson JP, Kakutani T, Koornneef M, Peeters AJ, Kardailsky I, Malancharuvil EJ, Neff MM, et al. 2000.** The late flowering phenotype of fwa mutants is caused by gain-of-function epigenetic alleles of a homeodomain gene. *Molecular cell* **6**: 791–802.
- Sorin C, Bussell JD, Camus I, Ljung K, Kowalczyk M, Geiss G, McKhann H, Garcion C, Vaucheret H, Sandberg G, et al. 2005.** Auxin and light control of adventitious rooting in Arabidopsis require ARGONAUTE1. *The Plant cell* **17**: 1343–59.

- Sorin C, Declerck M, Christ A, Blein T, Ma L, Lelandais-Brière C, Njo MF, Beeckman T, Crespi M, Hartmann C. 2014.** A miR169 isoform regulates specific NF-YA targets and root architecture in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **202**: 1197–1211.
- Spoel SH, Dong X. 2008.** Making Sense of Hormone Crosstalk during Plant Immune Responses. *Cell Host & Microbe* **3**: 348–351.
- Starr JL. 1993.** Dynamics of the Nuclear Complement of Giant Cells Induced by *Meloidogyne incognita*. *Journal of nematology* **25**: 416–421.
- Steele A. 1965.** The host range of the sugar beet nematode, *Heterodera schachtii*. *Journal of the American Society of Sugar Beet Technologists* **13(7)**: 573–603.
- Stroud H, Do T, Du J, Zhong X, Feng S, Johnson L, Patel DJ, Jacobsen SE. 2013.** Non-CG methylation patterns shape the epigenetic landscape in *Arabidopsis*. *Nature Structural & Molecular Biology* **21**: 64–72.
- Sunkar R, Jagadeeswaran G. 2008.** In silico identification of conserved microRNAs in large number of diverse plant species. *BMC plant biology* **8**: 37.
- Świącicka M, Skowron W, Cieszyński P, Dąbrowska-Bronk J, Matuszkiewicz M, Filipecki M, Koter MD. 2017.** The suppression of tomato defence response genes upon potato cyst nematode infection indicates a key regulatory role of miRNAs. *Plant Physiology and Biochemistry* **113**: 51–55.
- Takeda S, Hanano K, Kariya A, Shimizu S, Zhao L, Matsui M, Tasaka M, Aida M. 2011.** CUP-SHAPED COTYLEDON1 transcription factor activates the expression of LSH4 and LSH3, two members of the ALOG gene family, in shoot organ boundary cells. *The Plant Journal* **66**: 1066–1077.
- Teillet A, Dybal K, Kerry BR, Miller AJ, Curtis RHC, Hedden P. 2013.** Transcriptional Changes of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita* in Response to *Arabidopsis thaliana* Root Signals (M Ghanim, Ed.). *PLoS ONE* **8**: e61259.
- Teotia S, Tang G. 2015.** To Bloom or Not to Bloom: Role of MicroRNAs in Plant Flowering. *Molecular Plant* **8**: 359–377.
- Todesco M, Rubio-Somoza I, Paz-Ares J, Weigel D. 2010.** A collection of target mimics for comprehensive analysis of microRNA function in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS genetics* **6**: e1001031.
- Triantphyllou. 1985.** Cytogenetics of root-knot nematodes. In: F L,, In: CE T, eds. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* species) systematics, genetics and control.85–114.
- Truong NM, Nguyen C-N, Abad P, Quentin M, Favery B. 2015.** Function of Root-Knot Nematode Effectors and Their Targets in Plant Parasitism. *Plant Nematode Interactions: A view on compatible interrelationships*.294–319.
- Turner M, Nizampatnam NR, Baron M, Coppin S, Damodaran S, Adhikari S, Arunachalam SP, Yu O, Subramanian S. 2013.** Ectopic Expression of miR160 Results in Auxin Hypersensitivity, Cytokinin Hyposensitivity, and Inhibition of Symbiotic Nodule Development in Soybean. *PLANT PHYSIOLOGY* **162**: 2042–2055.
- Turner S, Subbotin S. 2013.** Cyst nematodes. In: Perry R,, In: Moens M, eds. *Plant nematology*.109–143.
- Vaistij FE, Jones L, Baulcombe DC. 2002.** Spreading of RNA Targeting and DNA Methylation in RNA Silencing Requires Transcription of the Target Gene and a Putative RNA-Dependent RNA Polymerase.

14: 857–867.

Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. 2006. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes & development* **20**: 515–24.

Vanholme B, De Meutter J, Tytgat T, Van Montagu M, Coomans A, Gheysen G. 2004. Secretions of plant-parasitic nematodes: a molecular update. *Gene* **332**: 13–27.

Vaucheret H. 2006. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes & development* **20**: 759–71.

Vaucheret H. 2008. Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Science* **13**: 350–358.

Vaucheret H, Vazquez F, Cr  t   P, Bartel DP. 2004. The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes & development* **18**: 1187–97.

Vazquez F, Blevins T, Ailhas J, Boller T, Meins F, Jr. 2008. Evolution of Arabidopsis MIR genes generates novel microRNA classes. *Nucleic acids research* **36**: 6429–38.

Vazquez F, Vaucheret H, Rajagopalan R, Lepers C, Gascioli V, Mallory AC, Hilbert J-L, Bartel DP, Cr  t   P. 2004. Endogenous trans-Acting siRNAs Regulate the Accumulation of Arabidopsis mRNAs. *Molecular Cell* **16**: 69–79.

Vens C, Rosso M-N, Danchin EGJ. 2011. Identifying discriminative classification-based motifs in biological sequences. *Bioinformatics* **27**: 1231–1238.

Goellner M, Wang X, Davis EL. 2001. Endo-beta-1,4-glucanase expression in compatible plant-nematode interactions. *The Plant cell* **13**: 2241–55.

Mitchum MG, Sukno S, Wang X, Shani Z, Tsabary G, Shoseyov O. 2004. The promoter of the Arabidopsis thaliana Cel1 endo-1,4-βglucanase gene is differentially expressed in plant feeding cells induced by root-knot and cyst nematodes. *Molecular plant pathology* **5**: 175–181.

Vercauteren I, de Almeida Engler J, De Groot R, Gheysen G. 2002. An Arabidopsis thaliana Pectin Acetyltransferase Gene Is Upregulated in Nematode Feeding Sites Induced by Root-knot and Cyst Nematodes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**: 404–407.

Vieira P, De Clercq A, Stals H, Van Leene J, Van De Slijke E, Van Isterdael G, Eeckhout D, Persiau G, Van Damme D, Verkest A, et al. 2014. The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor KRP6 Induces Mitosis and Impairs Cytokinesis in Giant Cells Induced by Plant-Parasitic Nematodes in Arabidopsis. *The Plant Cell* **26**: 2633–2647.

Vieira P, Danchin EGJ, Neveu C, Crozat C, Jaubert S, Hussey RS, Engler G, Abad P, de Almeida-Engler J, Castagnone-Sereno P, et al. 2011. The plant apoplasm is an important recipient compartment for nematode secreted proteins. *Journal of Experimental Botany* **62**: 1241–1253.

Vieira P, Engler G, de Almeida Engler J. 2012. Whole-mount confocal imaging of nuclei in giant feeding cells induced by root-knot nematodes in Arabidopsis. *New Phytologist* **195**: 488–496.

Vieira P, Escudero C, Rodiuc N, Boruc J, Russinova E, Glab N, Mota M, De Veylder L, Abad P, Engler G, et al. 2013. Ectopic expression of Kip-related proteins restrains root-knot nematode-feeding site expansion. *New Phytologist* **199**: 505–519.

- Wang H, Chua N-H. 2014.** Big effects of small RNAs on legume root biotic interactions. *Genome Biology* **15**: 475.
- Wang J-W, Czech B, Weigel D, Kumar PP, Hong SM, Yoo SJ, Yoo SY, Lee JS, Ahn JH, Handa H, et al. 2009.** miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **138**: 738–49.
- Wang X-J, Gaasterland T, Chua N-H. 2005a.** Genome-wide prediction and identification of cis-natural antisense transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biology* **6**: R30.
- Wang J-J, Guo H-S. 2015.** Cleavage of *INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE28* mRNA by MicroRNA847 Upregulates Auxin Signaling to Modulate Cell Proliferation and Lateral Organ Growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **27**: 574–590.
- Wang Y, Li K, Chen L, Zou Y, Liu H, Tian Y, Li D, Wang R, Zhao F, Ferguson BJ, et al. 2015.** MicroRNA167-Directed Regulation of the Auxin Response Factors *GmARF8a* and *GmARF8b* Is Required for Soybean Nodulation and Lateral Root Development. *Plant Physiology* **168**: 984–999.
- Wang X, Mitchum MG, Gao B, Li C, Diab H, Baum TJ, Hussey RS, Davis EL. 2005b.** A parasitism gene from a plant-parasitic nematode with function similar to CLAVATA3/ESR (CLE) of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant pathology* **6**: 187–91.
- Wang D, Pajerowska-Mukhtar K, Culler AH, Dong X. 2007.** Salicylic Acid Inhibits Pathogen Growth in Plants through Repression of the Auxin Signaling Pathway. *Current Biology* **17**: 1784–1790.
- Wang J-W, Wang L-J, Mao Y-B, Cai W-J, Xue H-W, Chen X-Y. 2005c.** Control of root cap formation by MicroRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **17**: 2204–16.
- Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL. 1994.** RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* **76**: 567–76.
- Weiberg A, Wang M, Lin F-M, Zhao H, Zhang Z, Kaloshian I, Huang H-D, Jin H. 2013.** Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science (New York, N.Y.)* **342**: 118–23.
- Wieczorek K, Elashry A, Quentin M, Grundler FMW, Favery B, Seifert GJ, Bohlmann H. 2014.** A Distinct Role of Pectate Lyases in the Formation of Feeding Structures Induced by Cyst and Root-Knot Nematodes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**: 901–912.
- Wiggers RJ, Starr JL, Price HJ. 1990.** DNA Content and Variation in Chromosome Number in Plant Cells Affected by *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *Phytopathology* **Vol.80 No.:** pp.1391-1395.
- Williamson VM, epulyt R. 2017.** Assessing Attraction of Nematodes to Host Roots Using Pluronic Gel Medium. 261–268.
- Willmann MR, Poethig RS, Zhu J-K, Shimamoto K. 2007.** Conservation and evolution of miRNA regulatory programs in plant development This review comes from a themed issue on Cell Signalling and Gene Regulation Edited. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 503–511.
- Wu G, Poethig RS. 2006.** Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. *Development* **133**: 3539–3547.
- Wu L, Zhou H, Zhang Q, Zhang J, Ni F, Liu C, Qi Y. 2010.** DNA Methylation Mediated by a MicroRNA Pathway. *Molecular Cell* **38**: 465–475.
- Xu M, Li Y, Zhang Q, Xu T, Qiu L, Fan Y, Wang L. 2014.** Novel MiRNA and PhasiRNA Biogenesis

Networks in Soybean Roots from Two Sister Lines That Are Resistant and Susceptible to SCN Race 4. *PLoS one* **9**: e110051.

Xue B, Hamamouch N, Li C, Huang G, Hussey RS, Baum TJ, Davis EL. 2013. The *8D05* Parasitism Gene of *Meloidogyne incognita* Is Required for Successful Infection of Host Roots. *Phytopathology* **103**: 175–181.

Yan Z, Hossain MS, Arikiti S, Valdés-López O, Zhai J, Wang J, Libault M, Ji T, Qiu L, Meyers BC, et al. 2015. Identification of microRNAs and their mRNA targets during soybean nodule development: functional analysis of the role of miR393j-3p in soybean nodulation. *New Phytologist* **207**: 748–759.

Yan K, Liu P, Wu C-A, Yang G-D, Xu R, Guo Q-H, Huang J-G, Zheng C-C. 2012. Stress-induced alternative splicing provides a mechanism for the regulation of microRNA processing in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular cell* **48**: 521–31.

Ye D-Y, Qi Y-H, Cao S-F, Wei B-Q, Zhang H-S. 2017. Histopathology combined with transcriptome analyses reveals the mechanism of resistance to *Meloidogyne incognita* in *Cucumis metuliferus*. *Journal of plant physiology* **212**: 115–124.

Yekta S, Shih I-H, Bartel DP. 2004. MicroRNA-Directed Cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* **304**: 594–596.

Yi H, Richards EJ. 2007. A Cluster of Disease Resistance Genes in *Arabidopsis* Is Coordinately Regulated by Transcriptional Activation and RNA Silencing. *THE PLANT CELL ONLINE* **19**: 2929–2939.

Yoshikawa M, Peragine A, Park MY, Poethig RS. 2005. A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes & development* **19**: 2164–75.

Youssef RM, MacDonald MH, Brewer EP, Bauchan GR, Kim K-H, Matthews BF. 2013. Ectopic expression of AtPAD4 broadens resistance of soybean to soybean cyst and root-knot nematodes. *BMC Plant Biology* **13**: 67.

Yu A, Lepere G, Jay F, Wang J, Bapaume L, Wang Y, Abraham A-L, Penterman J, Fischer RL, Voinnet O, et al. 2013a. Dynamics and biological relevance of DNA demethylation in *Arabidopsis* antibacterial defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 2389–2394.

Yuan C, Wang J, Harrison AP, Meng X, Chen D, Chen M. 2015. Genome-wide view of natural antisense transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research* **22**: 233–243.

Yu X, Yang J, Li X, Liu X, Sun C, Wu F, He Y. 2013b. Global analysis of cis-natural antisense transcripts and their heat-responsive nat-siRNAs in *Brassica rapa*. *BMC plant biology* **13**: 208.

Yu B, Yang Z, Li J, Minakhina S, Yang M, Padgett RW, Steward R, Chen X. 2005. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science (New York, N.Y.)* **307**: 932–5.

Zhai J, Jeong D-H, De Paoli E, Park S, Rosen BD, Li Y, González AJ, Yan Z, Kitto SL, Grusak MA, et al. 2011. MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Genes & development* **25**: 2540–53.

Zhang H, Li L. 2013. SQUAMOSA promoter binding protein-like7 regulated microRNA408 is required for vegetative development in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **74**: 98–109.

Zhang H, Tao Z, Hong H, Chen Z, Wu C, Li X, Xiao J, Wang S. 2016. Transposon-derived small RNA is responsible for modified function of WRKY45 locus. *Nature Plants* **2**: 16016.

- Zhang T, Wang J, Zhou C. 2015.** The role of miR156 in developmental transitions in *Nicotiana tabacum*. *Science China Life Sciences* **58**: 253–260.
- Zhang X, Xia J, Lii Y. 2012.** Genome-wide analysis of plant nat-siRNAs reveals insights into their distribution, biogenesis and function. *Genome*.
- Zhang X, Yuan Y-R, Pei Y, Lin S-S, Tuschl T, Patel DJ, Chua N-H. 2006.** Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes & Development* **20**: 3255–3268.
- Zhang Z, Zhang X. 2012.** Argonautes compete for miR165/166 to regulate shoot apical meristem development. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 652–658.
- Zhang X, Zhao H, Gao S, Wang W-C, Katiyar-Agarwal S, Huang H-D, Raikhel N, Jin H. 2011.** Arabidopsis Argonaute 2 regulates innate immunity via miRNA393(*)-mediated silencing of a Golgi-localized SNARE gene, MEMB12. *Molecular cell* **42**: 356–66.
- Zhang H, Zhu J-K. 2012.** Active DNA Demethylation in Plants and Animals. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **77**: 161–173.
- Zhao Y. 2010.** Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 49–64.
- Zhao W, Li Z, Fan J, Hu C, Yang R, Qi X, Chen H, Zhao F, Wang S. 2015.** Identification of jasmonic acid-associated microRNAs and characterization of the regulatory roles of the miR319/TCP4 module under root-knot nematode stress in tomato. *Journal of Experimental Botany* **66**: 4653–4667.
- Zheng X, Zhu JJ-K, Kapoor A, Zhu JJ-K. 2007.** Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *The EMBO journal* **26**: 1691–701.
- Zhong X, Du J, Hale CJ, Gallego-Bartolome J, Feng S, Vashisht AA, Chory J, Wohlschlegel JA, Patel DJ, Jacobsen SE. 2014.** Molecular Mechanism of Action of Plant DRM De Novo DNA Methyltransferases. *Cell* **157**: 1050–1060.
- Zhong X, Hale CJ, Law JA, Johnson LM, Feng S, Tu A, Jacobsen SE. 2012.** DDR complex facilitates global association of RNA polymerase V to promoters and evolutionarily young transposons. *Nature Structural & Molecular Biology* **19**: 870–875.
- Zhou Y, Honda M, Zhu H, Zhang Z, Guo X, Li T, Li Z, Peng X, Nakajima K, Duan L, et al. 2015.** Spatiotemporal Sequestration of miR165/166 by Arabidopsis Argonaute10 Promotes Shoot Apical Meristem Maintenance. *Cell Reports* **10**: 1819–1827.
- Zhu H, Hu F, Wang R, Zhou X, Sze S-H, Liou LW, Barefoot A, Dickman M, Zhang X, Carrington JC, et al. 2011.** Arabidopsis Argonaute10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development. *Cell* **145**: 242–56.
- Zong J, Yao X, Yin J, Zhang D, Ma H. 2009.** Evolution of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) genes: Duplications and possible losses before and after the divergence of major eukaryotic groups. *Gene* **447**: 29–39.

Annexes

Annexe 1:

Article Cabrera et al. 2016

«Differentially expressed small RNAs in Arabidopsis galls formed by Meloidogyne javanica: a functional role for miR390 and its TAS3-derived tasiRNAs »

Differentially expressed small RNAs in *Arabidopsis* galls formed by *Meloidogyne javanica*: a functional role for miR390 and its TAS3-derived tasiRNAs

Javier Cabrera¹, Marta Barcala¹, Alejandra García¹, Ana Rio-Machín², Clémence Medina³, Stephanie Jaubert-Possamai³, Bruno Favery³, Alexis Maizel⁴, Virginia Ruiz-Ferrer⁵, Carmen Fenoll¹ and Carolina Escobar¹

¹Universidad de Castilla-La Mancha, Facultad de Ciencias Ambientales y Bioquímica, Avda. Carlos III, s/n 45071 Toledo, Spain; ²Molecular Cyrogenetics Group, Human Cancer Genetics Programme, Centro Nacional Investigaciones Oncológicas (CNIO), C/Melchor Fernández Almagro, 3, 28029 Madrid, Spain; ³INRA, Université Nice Sophia Antipolis, CNRS, UMR 1355-7254 Institut Sophia Agrobiotech, 06900 Sophia Antipolis, France; ⁴Centre for Organismal Studies University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld, 230-69120 Heidelberg, Germany; ⁵Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Av. Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

Summary

Author for correspondence:

Carolina Escobar

Tel: +34925268800, ext. 5476

Email: carolina.escobar@uclm.es

Received: 10 August 2015

Accepted: 25 September 2015

New Phytologist (2016) **209**: 1625–1640

doi: 10.1111/nph.13735

Key words: galls, giant cells, meloidogyne, miRNAs, rasiRNAs, silencing, small RNAs, tasiRNAs.

- Root-knot nematodes (RKNs) induce inside the vascular cylinder the giant cells (GCs) embedded in the galls. The distinctive gene repression in early-developing GCs could be facilitated by small RNAs (sRNA) such as miRNAs, and/or epigenetic mechanisms mediated by 24nt-sRNAs, rasiRNAs and 21–22nt-sRNAs. Therefore, the sRNA-population together with the role of the miR390/TAS3/ARFs module were studied during early gall/GC formation.
- Three sRNA libraries from 3-d-post-inoculation (dpi) galls induced by *Meloidogyne javanica* in *Arabidopsis* and three from uninfected root segments were sequenced following Illumina-Solexa technology. *pMIR390a::GUS* and *pTAS3::GUS* lines were assayed for nematode-dependent promoter activation. A sensor line indicative of TAS3-derived tasiRNAs binding to the *ARF3* sequence (*pARF3:ARF3-GUS*) together with a tasiRNA-resistant *ARF3* line (*pARF3:ARF3m-GUS*) were used for functional analysis.
- The sRNA population showed significant differences between galls and controls, with high validation rate and correspondence with their target expression: 21-nt sRNAs corresponding mainly to miRNAs were downregulated, whilst 24-nt-sRNAs from the rasiRNA family were mostly upregulated in galls. The promoters of *MIR390a* and *TAS3*, active in galls, and the *pARF3:ARF3-GUS* line, indicated a role of TAS3-derived-tasiRNAs in galls.
- The regulatory module miR390/TAS3 is necessary for proper gall formation possibly through auxin-responsive factors, and the abundance of 24-nt sRNAs (mostly rasiRNAs) constitutes a gall hallmark.

Introduction

Regulatory small RNAs (sRNAs) are a group of short noncoding RNAs (20–24 nucleotides (nt) long) with diverse roles in gene silencing at the transcriptional and post-transcriptional levels. *Arabidopsis* sRNAs are dominated by short-interfering RNAs (siRNAs) and by microRNAs (miRNAs; Axtell, 2013; Bologna & Voinnet, 2014). Among the endogenous *Arabidopsis* siRNAs there are different sRNAs groups such as trans-acting short-interfering RNAs (ta-siRNAs) and repeat-associated small interfering RNAs (rasiRNAs). Ta-siRNAs are produced through miRNA-guided cleavage of noncoding primary transcripts that are then converted into dsRNA by RDR6, whereas rasiRNAs are generated mostly from transposon loci and DNA repeats. AGO1/7- ta-siRNA complexes mediate the cleavage of mRNA from coding genes, whereas AGO4/6- rasiRNA complexes guide

cytosine methylation in DNA, a landmark of RNA-directed DNA methylation (PolIV-RdDM). Recently, a genetic RdDM pathway was uncovered in *Arabidopsis*. It utilizes 21–22-nt siRNAs as well as 24-nt siRNAs, and methylates ta-siRNAs (Wu *et al.*, 2012; Kanno *et al.*, 2013) and active transposable elements (TEs) by the combined activities of RDR6, DCL2, DCL4 and AGO1 (Nuthikattu *et al.*, 2013). These 21–22-nt siRNAs guide AGO6 to its chromatin targets to establish TE expression-dependent DNA methylation (Wu *et al.*, 2012). Hence, a core of different Dicer-like proteins (DCLs), RNA-dependent RNA polymerases (RDRs) and Argonaute proteins (AGOs) participate in the biogenesis and action of miRNAs, tasiRNAs and rasiRNAs (Axtell, 2013; Bologna & Voinnet, 2014).

In recent years, next-generation sequencing has made clear the importance of sRNA regulation in different abiotic and biotic plant stresses (Sunkar *et al.*, 2012; Balmer & Mauch-

Mani, 2013; Weiberg *et al.*, 2014; Harfouche *et al.*, 2015). Pathogen attack triggers massive miRNA changes, exerting regulatory roles through alteration of hormone pathways, or manipulating silencing pathways to counteract miRNA-mediated defenses, thus regulating plant immunity (reviewed in Balmer & Mauch-Mani, 2013). For example, miR393, implicated in bacterial resistance by repressing auxin signaling, was upregulated in response to the bacterial effector flg22, and targets *TIR1*, *AFB2* and *AFB3* which allow the stabilization of auxin signaling repressor Aux/IAA proteins (Navarro *et al.*, 2006) and viruses use suppressor proteins that interfere with the silencing machinery (Jagga & Gupta, 2014). It can therefore be concluded that miRNAs are very likely to be fundamental players in the concert of broad-spectrum disease resistance (reviewed in Balmer & Mauch-Mani, 2013).

Plant sedentary endoparasitic nematodes are among the most damaging parasites, causing severe agricultural losses (Mitkowski & Abawi, 2003). Two types of sedentary endoparasitic nematodes are described depending on the type of feeding cells that they induce in roots, namely giant cells (GCs) inside galls or knots for root-knot nematodes (RKN; *Meloidogyne* spp; Escobar *et al.*, 2015) and syncytia for cyst nematodes (*Heterodera* spp. and *Globodera* spp.; Bohlmann, 2015). The differentiation of a root vascular cell into a GC or a syncytium, both highly specialized transfer cells, requires dramatic changes in gene expression (reviewed in Escobar *et al.*, 2011, 2015). Generalized gene repression is characteristic of early-developing GCs and galls, and constitutes a signature of early-developing GCs (Schaff *et al.*, 2007; Caillaud *et al.*, 2008; Barcala *et al.*, 2010; Portillo *et al.*, 2013) which includes plant defense-related genes (reviewed in Smant & Jones, 2011; Hewezi & Baum, 2015). For example, peroxidase-coding genes are repressed in compatible interactions, but upregulated in soybean resistant plants (Klink *et al.*, 2009, 2010) and in tomato resistant cultivars homozygous for *Mi-1* (Bar-Or *et al.*, 2005; Schaff *et al.*, 2007). This is consistent with the functional role of tomato TPX1 in resistance to *Meloidogyne javanica* (Portillo *et al.*, 2013). The mechanisms mediating this massive gene repression in early-developing GCs/galls are unknown, but could involve a general differential expression (DE) of sRNAs.

Few massive sequencing experiments have been performed to uncover the role of sRNAs in the plant–nematode interaction and those which have been mainly focused in cyst nematodes (Hewezi *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2015). In *Arabidopsis* infected with *Heterodera schachtii*, Hewezi *et al.* (2008) identified 16 miRNAs DE in syncytia at 4 and/or 7 d post inoculation (dpi). Several of them targeted transposons or retrotransposons of different types, suggesting a role for these miRNAs in controlling TE movement (Hewezi *et al.*, 2008; Hewezi & Baum, 2015). *Arabidopsis rdr* and *dcl* mutants altered in essential genes for sRNA biogenesis showed reduced susceptibility to *H. schachtii* (Hewezi *et al.*, 2008). Two sequencing experiments shed light to the sRNA population from resistant and susceptible soybean lines infected with *H. glycines* (Li *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2014), showing several DE miRNAs and siRNAs

between resistant/susceptible plants. A functional role for a miRNA has been demonstrated only for miR396 in *Arabidopsis* syncytia by Hewezi *et al.* (2012). It was shown that miR396 downregulation following *GRF1/GRF3* induction is necessary for correct syncytia initiation. However, subsequent miR396 induction was necessary once the syncytium is established and it does not incorporate new cells. So far, DE sRNAs and their functional roles in RKN feeding sites have not been described, except for systemic stress responses in phloem after RKN inoculation, where the miR319/TCP4 module acts as a systemic signal responder modulating a systemic defensive response mediated by jasmonic acid (Zhao *et al.*, 2015).

Here we analyze the DE sRNAs during early gall development, by using three sRNA libraries from independent biological replicates of hand-dissected 3-dpi galls formed by *M. javanica* in *Arabidopsis*, and uninfected root segments at equivalent positions of the root to obtain three control libraries. We found significant differences between galls and control roots in the sRNA population. In galls, 21-nt sequences corresponding mostly to miRNAs were downregulated, whereas 24-nt sequences from rasiRNAs were upregulated. We studied the expression pattern and functional role of *miR390*, one of the few upregulated miRNAs in galls and GCs at early infection stages. Its promoter is active in GCs and gall vascular tissues and it regulates TAS3-derived tasiRNAs formation in galls. TAS3 was necessary for proper gall development, possibly through the control of auxin-responsive factors. This is the first report of a functional role during plant–nematode interactions of a highly conserved ta-siRNA from bryophytes to vascular plants.

Materials and Methods

Biological materials, growth conditions and nematode inoculation

All *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh lines were in Col-0 background. Seeds were sterilized, and plants grown and inoculated as in Cabrera *et al.* (2014a).

For functional analysis, four independent infection tests were performed for Col-0 (number of plants (n) = 280) and *mir390a-2* (n = 217), and three independent infection tests with Col-0 (n = 114) and *TAS3a-1* (n = 114). Gall number per main root was determined under a stereo microscope at 14 dpi. For diameter measurements, at least 21 galls at 14 dpi from three independent experiments were hand dissected, photographed and measured with IMAGEJ (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). For significant differences on infection level and gall diameter a Student's *t*-test, $P < 0.05$, was performed using SPSS (IBM, Armonk, NY, USA).

Meloidogyne javanica Treub, 1885 was maintained and *in vitro* infection assays were performed as described in Barcala *et al.* (2010). For *M. incognita*, *Arabidopsis* seeds were stratified in $0.5 \times$ MS/0.8% agar plates at 23°C and 16 h : 8 h, light : dark photoperiod. Twenty days after germination, roots were

inoculated with 200 J2 per plant previously sterilized with 0.01% HgCl₂ and 0.7% streptomycin.

RNA extraction, sRNA library construction and statistical analysis

RNA extractions from three independent samples of *c.* 300 3-dpi galls and three of *c.* 300 control root segments were performed and quality-assessed as in Portillo *et al.* (2009). Each RNA sample extracted from pooled galls or control roots from three or four independent experiments is thus considered a biological replicate. Three of these RNA samples were independently analyzed by massive sequencing for gall or control roots. In each independent experiment, 20 plates containing 10 plants each ($n=200$) were also used to collect galls or control root segments from uninfected plants. Samples were quick-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C .

Illumina-Solexa Sequencing-By-Synthesis technology was used to generate the small-RNA libraries at Beijing Genomics Institute (Shenzhen, China). Clean sequences were obtained after discarding low-quality reads, 5' primer contaminants, and those without 3' primer, without the insert tag, with poly A and/or shorter than 18 nt.

A reads per million (RPM) value was obtained for each sequence in each library (number of reads for a sequence/number of total reads for all sequences in that library $\times 10^6$). Each sequence was tested for expression changes by a two-tailed heteroscedastic *t*-test using statistic software R (R Development Core Team, 2008) between their three independent RPM values in galls and their three independent RPM values in control roots. Expression differences between galls and roots were considered significant when $P < 0.05$. Fold change (FC) was used to measure the expression differences between galls and control roots as the ratio between the average of the RPM values of the three samples in each group. The full raw sequencing data were submitted to the GEO database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) with the accession number: GSE71563.

sRNA sequences annotation

Clean reads were mapped to the Arabidopsis or *M. incognita* genomes (<http://www.arabidopsis.org/> or http://www6.inra.fr/meloidogyne_incognita) by SOAP (Short Oligonucleotide Analysis Package; <http://soap.genomics.org.cn/>) and sRNAs were categorized into types: rRNA, tRNA and snRNA were analyzed in GenBank and in RFAM; known miRNAs and their isomiRs (miRBase19), repeats, exon and intron were analyzed by BGI Genomics in-house database.

Unannotated sequences were screened with Mireap (<http://sourceforge.net/projects/mireap/>) which predicts novel miRNA by exploring secondary structure, DICER cleavage site and minimum free energy (MFE) of the unannotated small RNA tags. The following restrictions were imposed: minimal miRNA sequence length (18 nt), maximal miRNA sequence length (25 nt), minimal miRNA reference sequence length (20 nt), maximal miRNA reference sequence length (23 nt),

maximal copy number of miRNAs on reference (20 nt), maximal free energy allowed for a miRNA precursor ($-18 \text{ kcal mol}^{-1}$), maximal space between miRNA and miRNA* (300 nt), minimal base pairs of miRNA and miRNA* (16 nt), maximal bulge of miRNA and miRNA* (4 nt), and maximal asymmetry of miRNA/miRNA* duplex (4 nt).

Target prediction was performed on the Plant Small RNA Target Analysis Server (psRNATarget; <http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>; Dai & Zhao, 2011). The following restrictions were established: maximum expectation (3.0), length for complementarity scoring (20), allowed maximum energy to unpair the target site (UPE; 25); flanking length around target site for target accessibility analysis (17 bp in upstream/13 bp in downstream); and range of central mismatch leading to translational inhibition (9–11 nt).

q-PCR validation of the expression of miRNAs and their targets, histological analysis of GUS expression and gall phenotyping

Expression levels of selected miRNAs DE in the libraries were analyzed by qRT-PCR using TaqMan[®] Small RNA assays. The probes used were: aly-miR156 h (463816_mat), miR163 (343), miR167d (000350), miR390a (001409miR775 (008366_mat), miR780.2 (464297_mat), miR839 (008535_mat) and aly-miR857 (006362_mat). qRT-PCR was performed as described by Frenquelli *et al.* (2010)). The independent RNA samples used for RNAseq were used for cDNA synthesis. Total RNA (10 ng) was reverse-transcribed with the MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a final reaction volume of 5 μl . Independent reverse transcription reactions were set for each miR-snoR pair. qRT-PCR was performed using TaqMan Fast Universal PCR Master Mix on a 7500 Fast Real-Time PCR System following the manufacturer's protocol. Each independent cDNA template was run in triplicate (384-well plate). Data were normalized to the expression of two small nucleolar RNAs (predesigned TaqMan[®] small RNA control assays snoR101 and snoR66; Applied Biosystems) and relative expression was calculated using the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$). Tendencies were similar with both normalizers.

Validation of the transcript level for predicted miRNA target genes was performed by qRT-PCR. RNA samples used for sequencing were reverse transcribed with the High-Capacity cDNA Reverse Kit (Applied Biosystems), using 500 ng of RNA per reaction and following manufacturer's instructions. Normalization was referred to *GAPC2* according to the method of Barcala *et al.* (2010). Relative expression was calculated using the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$). Primer sequences are listed in Supporting Information Table S1.

For all q-PCR data a Student's *t*-test was performed ($P < 0.05$) to identify FC differences between galls and uninfected controls.

For tissue localization of GUS activity, seedlings from *pMIR390a::GUS*, *pTAS3::GUS*, *pARF3:ARF3-GUS* and *pARF3:ARF3 m-GUS* lines were treated and phenotyped as described in Cabrera *et al.* (2014a).

Results

Overview of sRNAs expressed in galls and control roots

Illumina-Solexa Sequencing-By-Synthesis technology was used to generate three independent sRNA libraries from *c.* 300 hand-collected 3-dpi galls each, and three libraries from their corresponding control samples (see the Materials and Methods section; Fig. 1a). An average of 10.1 million raw reads (Solexa 50 nt reads) were obtained for the three gall libraries (G1, G2 and G3), and an average of 9.8 million for control roots (R1, R2, R3) (Fig. 1b). After filtering reads, the number of clean reads was reduced to an average of 9.8 million for galls and 9.5 million for control roots (Fig. 1b). The similar overall numbers obtained for the three libraries in both sample types indicate a high uniformity among the three biological replicates used for the analysis. An average of 2121 427 clean reads corresponded to unique sRNA sequences in the three gall libraries, almost twice the 1241 364 reads obtained for the control root libraries (Fig. 1b). In the six libraries, 99.9% of the reads had a length between 18 and 29 nt

(Fig. 2a), most of them ranging from 20 to 24 nt, the typical length of small RNAs processed by DICER (Ghildiyal & Zamore, 2009). Read-length distribution in each library was similar except for the 24-nt sequences, which were consistently more abundant in gall than in control root libraries (Fig. 2a). By contrast, 20- and 21-nt reads (the typical length of miRNAs; Ghildiyal & Zamore, 2009) were consistently larger in root than in gall libraries (Fig. 2a).

Fifty-eight percent of the unique sRNA sequences in the six libraries were present exclusively in galls, whilst only 16.2% were exclusive from control roots and 25.8% were shared between both (Fig. 2b). The matched sequences were aligned against sequences in GenBank, Rfam and miRBase to find previously known sRNAs. Fig. 2(c) summarizes the number of sequences found in each library corresponding to different sRNA types. Approximately half of the unique sequences (54% and 50% for galls and control roots, respectively) were unannotated; that is, either they could not be mapped to the Arabidopsis genome (and could be of nematode origin) or they hit Arabidopsis sequences not classified as sRNAs (Fig. 2c).

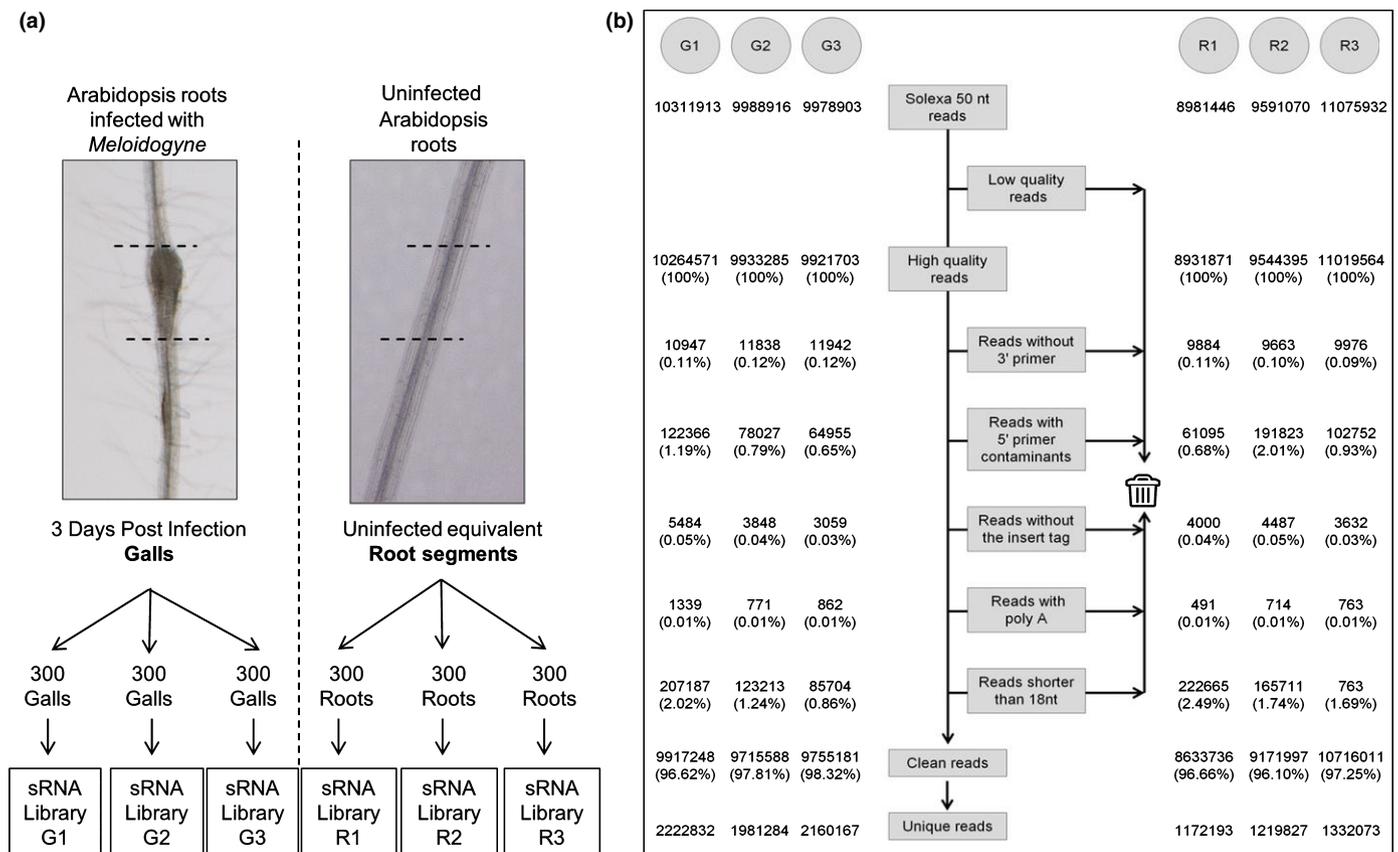


Fig. 1 Schematic representation of sRNA library construction and clean read generation. (a) Approximately 900 at 3-d-post-infection (dpi)-galls induced by *Meloidogyne javanica* in *Arabidopsis thaliana* were collected in three independent biological replicates (left panel) for construction of gall libraries (G1, G2 and G3). Equivalent root segments from uninfected plants grown in the same conditions were collected also in triplicate for uninfected root libraries (R1, R2 and R3; right panel). Dotted lines in the pictures indicate the hand-dissected segments collected. (b) Number of discarded or retained reads is indicated in each step, as well as the percentage that this number represents with respect to the total number of high-quality reads for each library. Clean reads are obtained after discarding reads without 3' primers, with 5' primers contaminants, without the insert tag, with poly A, or shorter than 18 nt, and low-quality sequences. Unique reads represent those distinct sequences read.

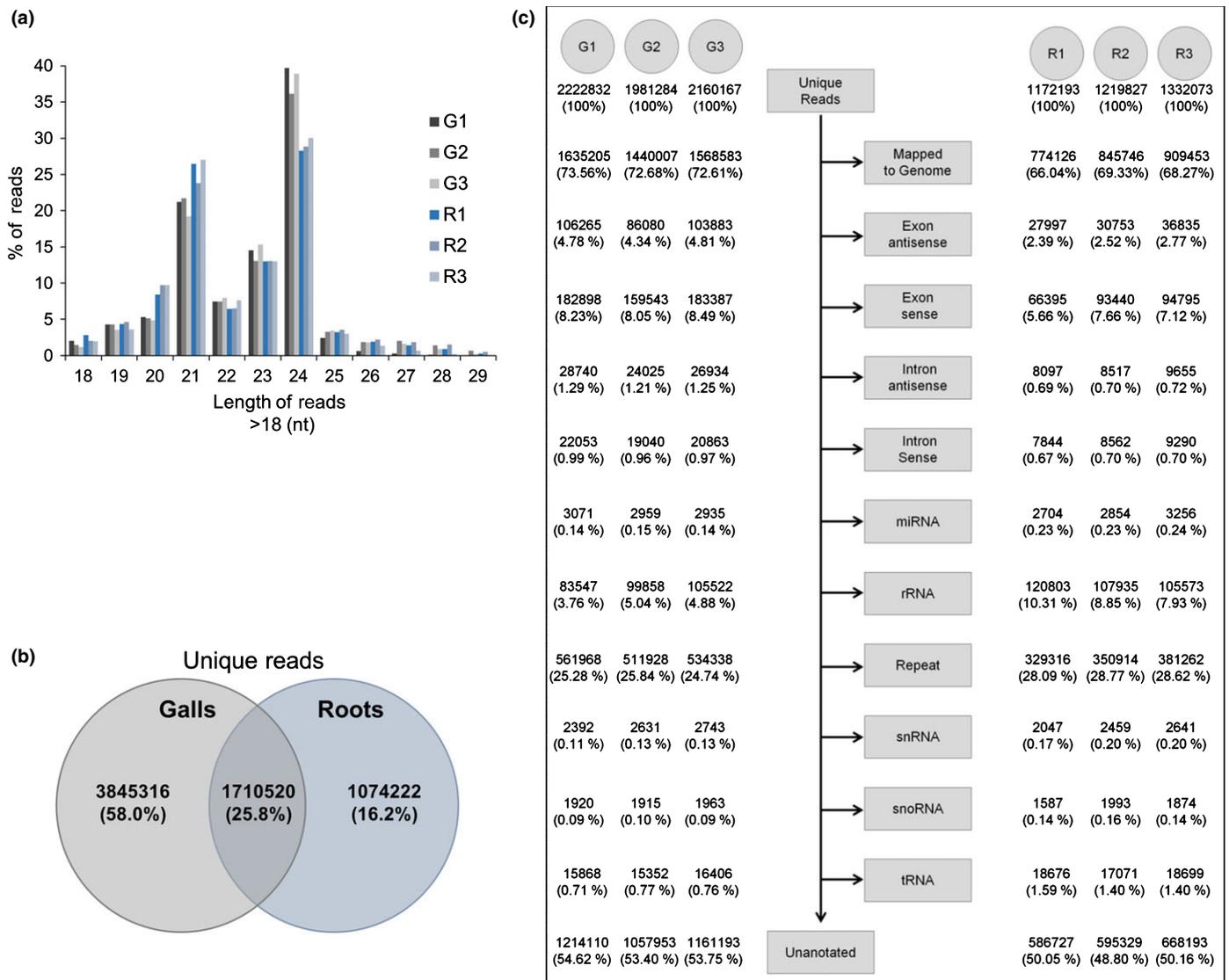


Fig. 2 General sRNA analysis in galls induced by *Meloidogyne javanica* in *Arabidopsis thaliana* and control libraries. (a) Distribution of clean reads (in %) in the six libraries catalogued into length categories. Note the marked abundance of the 24-nt sequences in gall libraries, with an average of 3803 611 sequences as compared to the 2826 085 found in libraries from control roots. (b) Venn diagram indicating number and percentage of unique reads exclusive and/or shared by galls and control roots libraries. (c) Schematic representation of the annotation process of the reads by alignment to the genome and adscription to different small RNA categories (miRNA, rRNA, tRNA, snRNA, snoRNA, repeat, exon, intron). Note that the abundance of intron and exon antisense sequences is higher in galls than in control libraries.

Differential expression of sRNAs and identification of their putative targets in the Arabidopsis genome

From the 338 known Arabidopsis miRNAs, 288 were detected in at least one library, whereas 50 were not identified in any read through the six libraries (Table S2). The overall numbers of reads for each miRNA among the libraries from either galls or control roots presented similar trends (Table S2), reinforcing the validity of the sequencing in the three biological replicates. From the 265 different miRNAs identified in each library, 242 were common to both conditions, 23 were exclusive of galls and 23 were only present in control root libraries (Table S2). For simplicity, the terms differentially expressed (DE), induced/

upregulated and repressed/downregulated are used throughout the text to mean mature sRNA levels higher or lower than in their corresponding controls, respectively. Interestingly, the average number of reads corresponding to known miRNAs in the three control root libraries (24 227) was 1.7-fold that of the three gall libraries (14 617), suggesting a global downregulation of miRNA in galls (Table S2). Accordingly, after normalization of the reads as ‘reads per million’ and analysis of DE miRNAs (see the Materials and Methods section), only 11 of the 288 miRNAs detected were upregulated ($P < 0.05$), whereas 51 were downregulated in galls ($P < 0.05$; Table 1). From the 62 DE miRNAs, large miRNA families as miR166 and miR169 were consistently downregulated in galls (Table 1). By

Table 1 Average number of reads for known miRNAs in gall and control root libraries

	Average no. of reads			<i>P</i> -value
	Gall libraries	Root libraries	FC	
ath-miR156i	5	1	7.06	0.032
ath-miR839	19	5	3.74	0.028
ath-miR5657	64	18	3.47	0.017
ath-miR851-3p	10	3	2.94	0.016
ath-miR390a	53 602	19 921	2.70	0.007
ath-miR390b	53 586	19 917	2.70	0.007
ath-miR391	42	16	2.62	0.002
ath-miR5655	113	45	2.46	0.042
ath-miR775	790	368	2.13	0.012
ath-miR156h	1478	720	2.02	0.020
ath-miR5643a	58	38	1.50	0.047
ath-miR159b	312	459	-1.52	0.049
ath-miR166a	127 138	191 088	-1.54	0.027
ath-miR166g	121 322	182 951	-1.55	0.025
ath-miR166c	121 384	183 056	-1.55	0.025
ath-miR166e	121 289	182 914	-1.55	0.025
ath-miR166d	121 384	183 059	-1.55	0.025
ath-miR166f	121 284	182 909	-1.55	0.025
ath-miR166b	121 344	183 020	-1.55	0.025
ath-miR5645f	113	176	-1.59	0.044
ath-miR5645e	112	174	-1.59	0.036
ath-miR5645a	112	176	-1.60	0.037
ath-miR5645b	112	176	-1.60	0.037
ath-miR165a	40 918	65 318	-1.65	0.044
ath-miR165b	39 533	63 672	-1.67	0.044
ath-miR5635a	75	130	-1.78	0.011
ath-miR5635d	260	503	-1.98	0.005
ath-miR156j	431	1009	-2.40	0.010
ath-miR156b	191 210	461 888	-2.47	0.013
ath-miR156a	191 007	461 738	-2.47	0.013
ath-miR156c	191 007	461 738	-2.47	0.013
ath-miR156e	190 500	461 235	-2.48	0.013
ath-miR156f	190 497	461 238	-2.48	0.013
ath-miR156d	192 256	470 427	-2.50	0.014
ath-miR5653	448	1102	-2.54	0.001
ath-miR399e	5	15	-3.02	0.028
ath-miR156g	187	569	-3.13	0.000
ath-miR169f	41	129	-3.30	0.004
ath-miR857	3	8	-3.30	0.032
ath-miR169j	20	70	-3.53	0.023
ath-miR169n	20	70	-3.53	0.023
ath-miR169l	20	70	-3.55	0.026
ath-miR169g-5p	37	128	-3.55	0.004
ath-miR163	56	200	-3.66	0.015
ath-miR169i	20	72	-3.67	0.021
ath-miR169h	6	21	-3.79	0.023
ath-miR169k	6	21	-3.79	0.023
ath-miR167d	67	263	-3.99	0.041
ath-miR169d	33	126	-4.01	0.004
ath-miR169e	33	126	-4.01	0.004
ath-miR169m	6	23	-4.03	0.024
ath-miR5644	26	102	-4.09	0.029
ath-miR399b	11	46	-4.12	0.003
ath-miR172b-3p	108	482	-4.53	0.029
ath-miR172a	108	483	-4.54	0.028
ath-miR319b	6	27	-4.88	0.003
ath-miR780.2	4	21	-5.45	0.003
ath-miR5648-3p	8	70	-8.58	0.034
ath-miR2111a-5p	2	21	-10.82	0.001

Table 1 (Continued)

	Average no. of reads			<i>P</i> -value
	Gall libraries	Root libraries	FC	
ath-miR2111b-5p	2	21	-10.82	0.001
ath-miR5637	0	4	-12.40	0.001
ath-miR172e	2	35	-17.67	0.000

The three libraries for galls induced by *Meloidogyne javanica* in *Arabidopsis thaliana* and roots are represented separately. Fold change (FC) and statistical significance (*P*-value) for the differentially expressed miRNAs are indicated. Red, induced, and green, repressed miRNAs in galls tested by q-PCR in Fig. 3(a).

contrast, miR390a and miR390b were highly upregulated (FC = 2.70) in galls (Table 1) as were two members of the miR156 family (miR156 h-i; FC = 7.06; Table 1), although the majority of the members of this family were downregulated (miR156a-g, j).

Fold change values for the DE miRNAs were validated by TaqMan[®] assay-based real-time PCR (Fig. 3a). Seven miRNAs were selected for validation, three induced and four repressed in galls, representative of different expression patterns in both libraries; that is, a high number of readings (e.g. miR390a), low number of readings (e.g. miR857), and intermediate number of readings (e.g. miR775s). qPCR was done after cDNA synthesis with the same RNA samples used for the construction of the six small RNA libraries, and resulted in a high validation rate of the sequencing results (6 out of 7 tested; Fig. 3a). Different sensitivities of both techniques might explain the nonvalidated expression pattern of miR167d.

The potential target genes of the known DE miRNAs were downloaded from the Plant MicroRNA Database (<http://bioinformatics.cau.edu.cn/PMRD/>; Zhang *et al.*, 2010) and were also predicted by using the psRNATarget web server (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) accomplishing restrictive parameters (see the Materials and Methods section). The TAIR10 transcripts database was used as the reference genome, identifying 108 putative target genes for the upregulated and 222 for the downregulated miRNAs in galls, respectively (Table S3). Some of the predicted targets had been experimentally validated in different biological systems, for example, those for miR390, miR156 or miR172 that preferentially target TAS3, trans-acting short-interfering RNA 3 (Montgomery *et al.*, 2008), SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEINS (*SPLs*; Wu & Poethig, 2006) and R-homologous Arabidopsis protein (RAP) (Aukerman & Sakai, 2003), respectively. Classification into functional categories with Mapman (Thimm *et al.*, 2004) determined that most targets belong to the category of 'Regulation of Transcription', particularly to the transcription factors subcategory, with 35 transcription factors among the putative targets of downregulated miRNAs and 8 among the targets of the upregulated miRNAs in galls (Table S3). It is also important to point out the identification of 26 transposable elements (TEs) as putative targets of the DE miRNAs (Table S3).

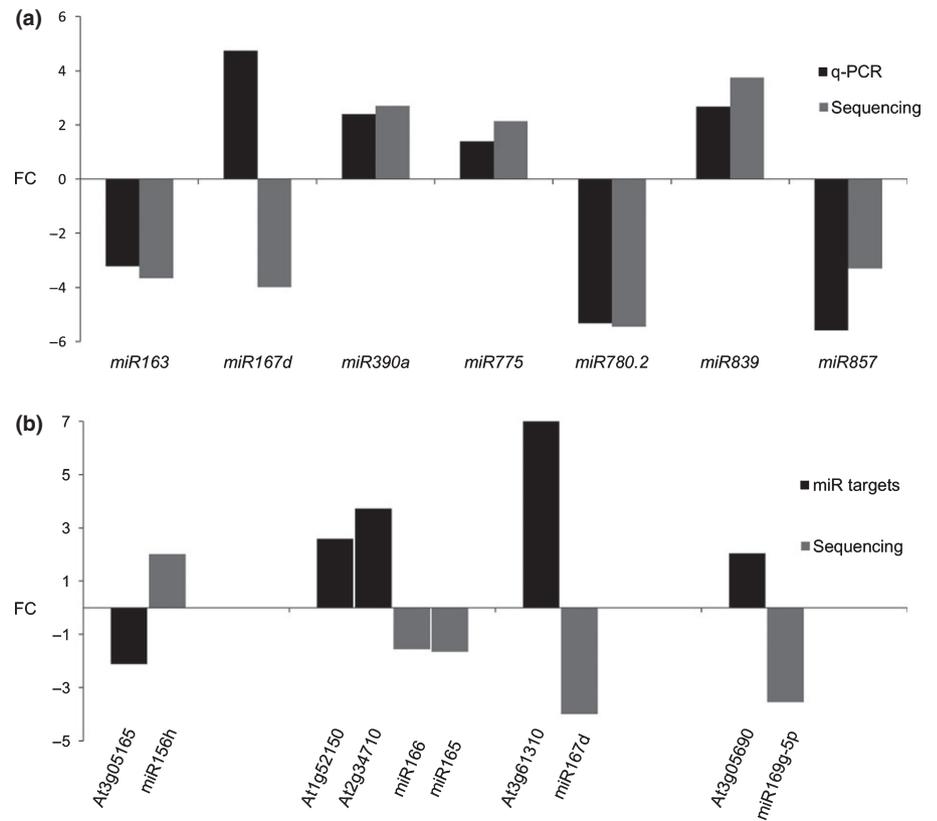


Fig. 3 Quantitative-PCR (q-PCR) analysis of differentially expressed miRNAs and their predicted targets in galls induced by *Meloidogyne javanica* in *Arabidopsis thaliana*. (a) miRNA expression values in galls relative to uninfected controls by RNA-seq (gray) and q-PCR (black). All miRNAs tested showed significant expression differences between galls and controls ($P < 0.05$) by RNA-seq and q-PCR, except miR839 by q-PCR with $P < 0.16$. (b) Expression of six putative miRNA targets measured by q-PCR. All were repressed in galls vs control roots ($P < 0.05$) agreeing with microarray data (Jammes *et al.*, 2005; Barcala *et al.*, 2010). FC, fold change.

A role for miR390 during root-knot nematode infection

miR390a-b were highly expressed in galls, showing the highest number of readings among those up-regulated miRNAs described (*c.* 53 000 each; Table 1). As *MIR390a* (At2g38325) is also predominantly expressed in roots (Marin *et al.*, 2010), we analyzed its promoter activation pattern during nematode infection. A GUS reporter line carrying a 2.6-kb promoter region from *MIR390a* (Fig. 4a–c; Marin *et al.*, 2010) was specifically activated within 4-dpi galls (Fig. 4a) induced by *M. javanica* in *Arabidopsis* roots, whereas in uninfected roots it was only detected in lateral root primordia and in the elongation zone (Fig. S1a,b). Hence, *pMIR390a::GUS* activation pattern was consistent with our sequencing and q-PCR results (Table 1; Fig. 3a). GUS activity in galls was maximal at 7 dpi (Fig. 4b) and decreased at medium-late infection stages (15 dpi; Fig. 4c). GUS activity was localized in the GCs and surrounding cells within the vascular cylinder in semi-thin 4-dpi gall sections (Fig. 4g). The expression pattern of *pMIR390a::GUS* was similar in 5- and 7-dpi galls induced by the related species *M. incognita* (Fig. S1e, f).

We then investigated its functional role during gall development. The homozygous line *mir390a-2*, carrying a T-DNA insertion located 30 bp upstream of the *MIR390a* (At2g38325) transcription start site, showed a strong reduction in the accumulation of the mature miR390a in roots, compared to the wild-type line (Marin *et al.*, 2010) and is therefore considered a loss-of-function line. When tested for nematode infection, this line presented a significant decrease ($P < 0.05$) in infection levels (23% less galls per main root than the wild-type Col-0 line;

Fig. 5a). Moreover, galls formed in the *mir390a-2* line were smaller than those formed in Col-0 plants ($P < 0.05$; Fig. 5b). This suggests that miR390a expression in galls is important for successful nematode infection.

In roots, miR390 controls the biogenesis of *TAS3* derived trans-acting short-interfering RNAs (tasiRNAs), and this function is crucial for lateral root growth (Marin *et al.*, 2010). The *pTAS3a::GUS* line showed activation along the vascular tissue of uninfected roots and in *M. javanica*-induced galls (Fig. S1c,d; Fig. 4d–f). The activation observed at 4 dpi was maintained in 7- and 15-dpi galls (Fig. 4d–f). In semi-thin sections of 4 dpi galls, the GUS signal was intense in GCs as well as in their neighboring cells (Fig. 4h). Thus, the expression patterns of *pTAS3a::GUS* and *pMIR390a::GUS* overlap in galls, similarly to those described for lateral roots (Marin *et al.*, 2010). *TAS3a* role in galls was analyzed by performing infection tests in the mutant line *TAS3a-1* (GABI 621G08), with only 40% of wild-type *TAS3a* transcript levels; Marin *et al.*, 2010). This mutant line presented a 40% reduction in the percentage of galls per main root with respect to the control (Fig. 5c). The galls formed in *TAS3a-1* were not significantly different in size to those of the control (Fig. 5d). It has been demonstrated that miR390a, *TAS3*-derived tasiRNAs and the auxin responsive factors ARF2, ARF3 and ARF4, constitute an auxin-responsive regulatory module controlling lateral root growth, in such a way that active *TAS3*-derived tasiRNAs regulate these ARFs directly in lateral roots by degrading their transcripts (Marin *et al.*, 2010). Accordingly, a GUS-based sensor line that is not induced when the *TAS3*-derived tasiRNAs are actively binding the ARF3 sequence, *pARF3:ARF3-GUS*, was not induced in

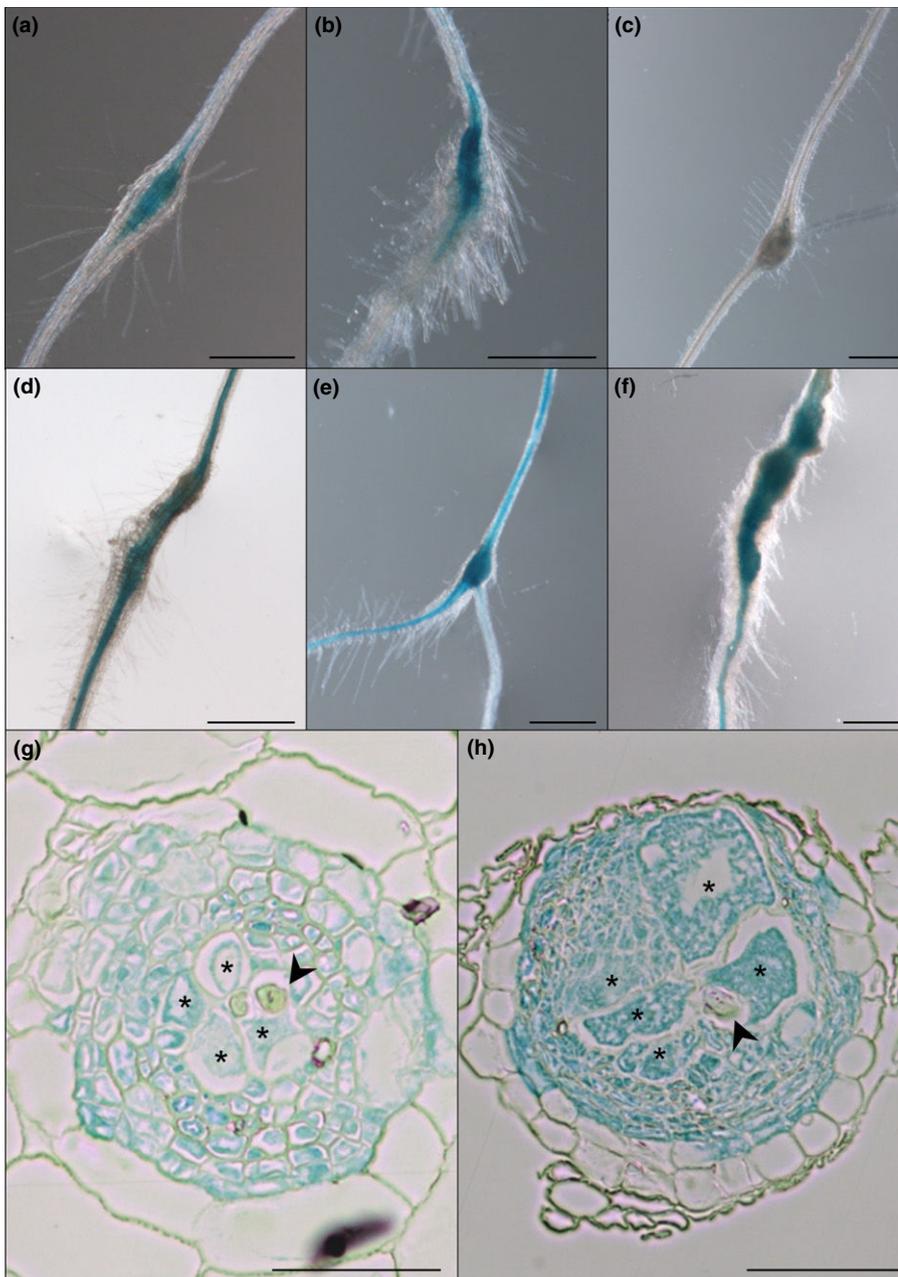


Fig. 4 Overlapping expression patterns of *pMIR390a::GUS* and *pTAS3::GUS* in galls. *pMIR390a::GUS* is active in galls induced by *Meloidogyne javanica* in *Arabidopsis* at 4 d post infection (dpi) (a), reaching its maximum expression at 7 dpi (b). Expression disappears at 15 dpi (c). *pTAS3::GUS* is activated in the vascular cylinder and inside galls at 4 dpi (d). Its expression is maintained at 7 (e) and 15 (f) dpi. GUS signal was localized in giant cells (GCs) and surrounding cells in the vascular cylinder in semi-thin sections of 4-dpi galls from *pMIR390a::GUS* (g) and *pTAS3::GUS* (h). Asterisks indicate GCs. Black arrowhead indicates nematode. Bars: (a–f) 500 μm ; (g, h) 100 μm .

galls (Fig. 6a). By contrast, a line harboring an *ARF3* sequence resistant to the cleavage by *TAS3*-derived *tasiRNAs* (*pARF3::ARF3m-GUS*; induced in the tissues where the promoter is active) was activated in galls at 3 dpi (Fig. 6b). GUS staining in this line showed the same pattern in GCs and surrounding cells as the *MIR390a* promoter and the *TAS3a* promoter lines (Figs 4g,h, 7c). These results confirmed that *TAS3*-derived *tasiRNAs* were active in galls and GCs, as they could degrade their described mRNA target, *ARF3*.

Identification of putative nematode-responsive novel miRNAs

Those sRNA sequences that mapped in the *Arabidopsis* genome but were not classified as any previously described miRNA were

analyzed using Mireap software (<http://sourceforge.net/projects/mireap/>) to predict their secondary structures, *DICER* cleavage sites and MFE (minimum free energy; $-40/-74 \text{ kcal mol}^{-1}$; Bonnet *et al.*, 2004). Six hundred and two sequences ranging from 19 to 25 nt and present in at least one of the six libraries presented structural hairpin characteristics. However, only 11 of these sequences ranging from 21 to 23 nt were DE ($P < 0.05$) in galls as compared to control roots, three of them being upregulated and eight downregulated (Table 2). From them, one upregulated and two downregulated also presented MFE values similar to those described for *Arabidopsis* miRNAs (Table 2). Interestingly, one was exclusively read in control root libraries, another one only in galls, and another sequence was abundant in both, although upregulated in galls (Table 2). The potential targets for these three putative sRNAs were predicted, finding among them

Fig. 5 The role of miRNA390 and TAS3 during the infection of *Arabidopsis thaliana* by *Meloidogyne javanica*. Mutant lines infected with *Meloidogyne javanica* showed a significant decrease in the infection rate. A 23% decrease in the infection level was observed for the mutant *mir390a-2* line (a), as well as a reduction in the size of the formed galls (b). *TAS3a-1* mutant line presented a significant reduction of 40% in the percentage of galls per main root with respect to the Col-0 control (c), but galls were not smaller than those of the control (d). Statistical analysis was performed with three independent experiments per line using ANOVA; significant differences with Col-0 are indicated by asterisks, $P < 0.05$; values are means \pm SE.

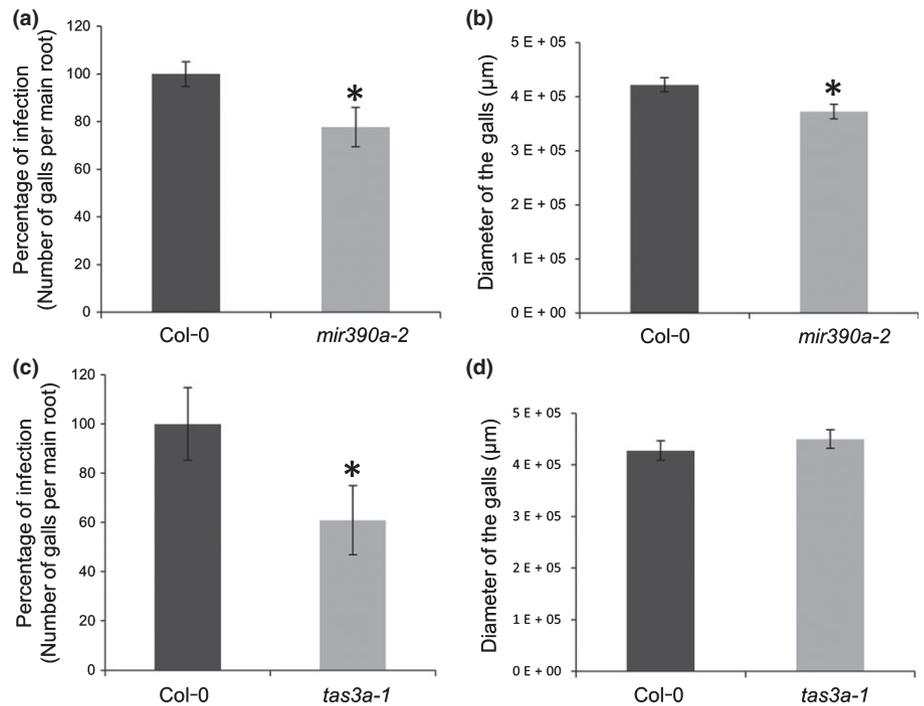
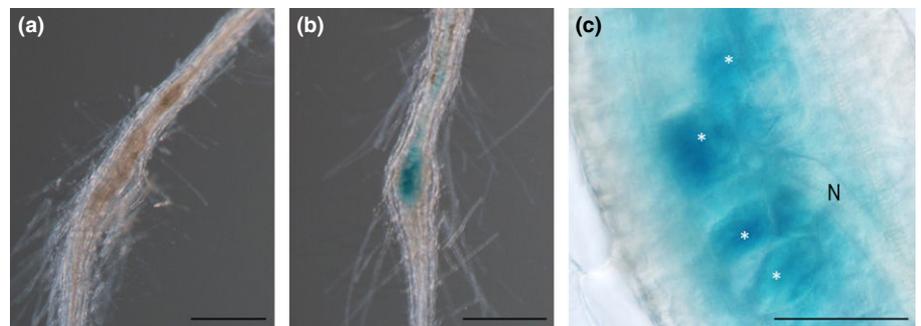


Fig. 6 *TAS3*-derived *tas*iRNAs are active in galls and giant cells (GCs) as they could degrade *ARF3*. At 3 d post infection (dpi), *pARF3:ARF3-GUS* is not induced in galls induced by *Meloidogyne javanica* in *Arabidopsis thaliana* (a), whereas *pARF3:ARF3m-GUS*, a mutated version resistant to *TAS3*, is activated in galls (b), and giant cells (c). Asterisks indicate giant cells. N, nematode. Bars: (a, b) 500 μm; (c) 100 μm.



genes related to stress, hormone metabolism, development or cell cycle (Table S4).

Comparative expression analysis of miRNAs and their targets

The expression of the predicted targets for the upregulated miRNAs in 3-dpi galls (Tables 3, S3) was checked among downregulated genes identified in previous studies, and vice versa. The transcriptomes used were from 3-dpi microdissected GCs and galls (Barcala *et al.*, 2010), and 7 dpi-galls (Jammes *et al.*, 2005; Cabrera *et al.*, 2014b). In these comparisons, six downregulated genes ($P < 0.05$) were predicted as putative targets of six upregulated miRNAs described in this work (Table 3). We found 15 upregulated transcripts that were putative targets of downregulated known and novel miRNAs in our analysis (Table 3). Among them is *MYB33* (targeted by miR159b and miR319b), the only MYB transcription factor upregulated in 3-dpi GCs (Barcala *et al.*, 2010).

A double validation of some of these putative targets by q-PCR showed the same tendencies as in microarray analysis (Fig. 3b; Barcala *et al.*, 2010; Jammes *et al.*, 2005). The selected miRNAs and the mRNA abundance of their predicted targets showed opposite behavior as expected.

Overview and differential expression of 24-nt sRNAs and rasiRNAs

The length distribution overview of the sequences found in the six libraries showed a marked increase in the number of 24-nt reads in galls compared to control roots (Fig. 2a). To investigate the importance of this group of 24-nt sRNAs in galls, a DE analysis was performed after normalization of reads as RPM. From the 2909 193 unique 24-nt sequences found in at least one of the six libraries, 1.94% (corresponding to 56 455 sequences) were DE statistically (Fig. S2). From those, 35% (19 970) were expressed exclusively in galls, whereas 2557 (4.5%) were exclusive from control roots (Fig. S2). From the 33 928 sequences shared

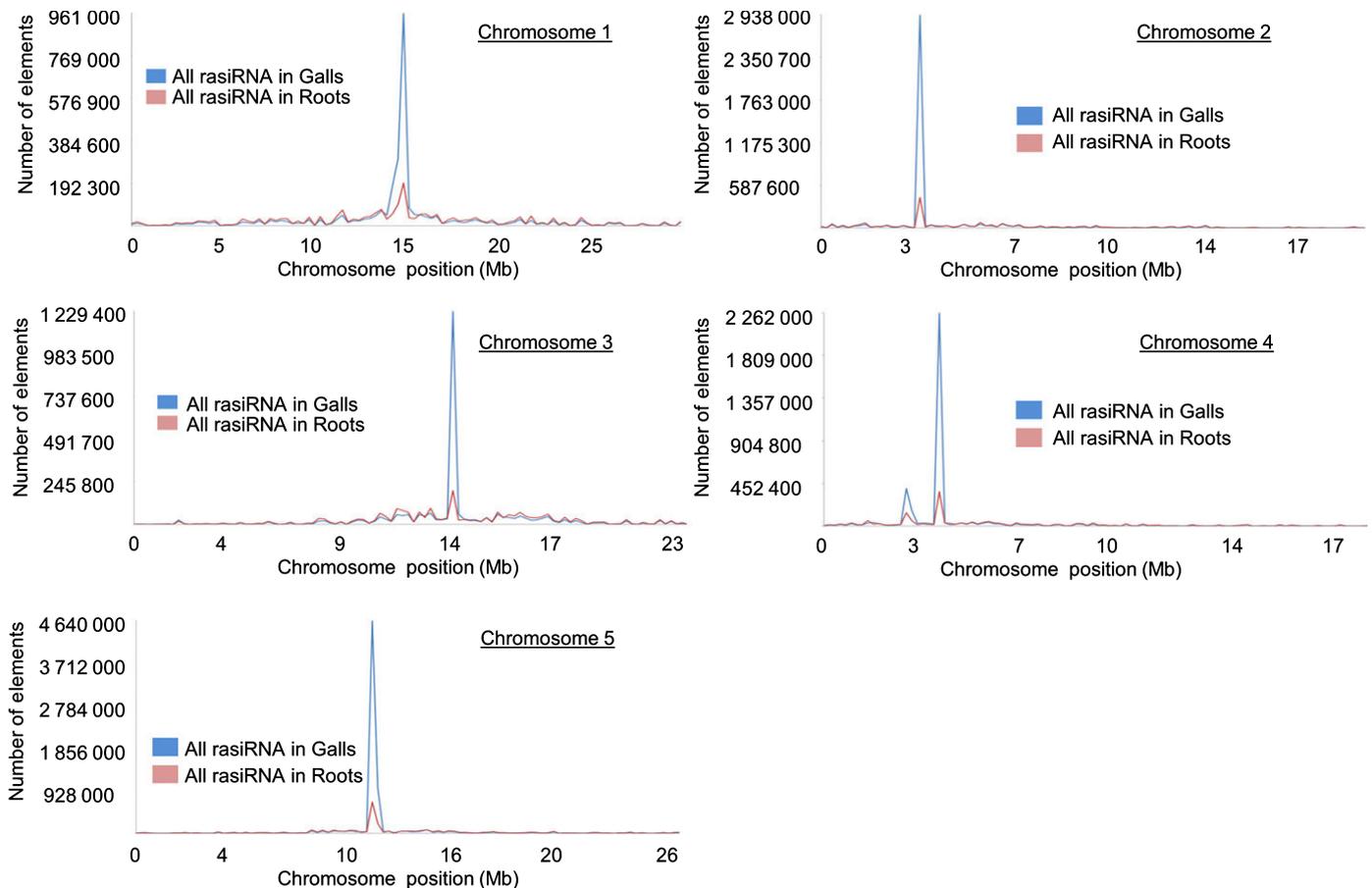


Fig. 7 Distribution of rasiRNAs from *Meloidogyne javanica* galls and control roots in the Arabidopsis genome. Repeat-associated small interfering RNAs in gall and control libraries are shown across the five Arabidopsis chromosomes. x-Axis indicates chromosome position and y-axis the number of reads.

Table 2 Novel Arabidopsis miRNAs identified in galls induced by *Meloidogyne javanica* and control root libraries

	Length	Minimum Free Energy	Total number of Reads						P value
			G1	G2	G3	C1	C2	C3	
GAAGGTAGAGTTGTAGAGAGGTT	23	-61.3	16	11	10	0	0	0	0.020
AGAGAGAGAGAGAGAAGAGCAA	22	-28.2	11	5	8	0	0	0	0.042
TTGAGGGGGTGTATTAATAATA	23	-24	9	14	15	0	0	0	0.022
GAAAGGAATTTGCCGTAGATATA	23	-73.2	1515	1622	1813	1988	2356	2643	0.004
GGGGGCTTTTTGAGAATTGGCAC	23	-31.6	28	0	40	72	62	83	0.035
TGATGAACCTCGCAATTAGACGTA	23	-36.9	0	0	0	10	13	12	0.006
TGGATAGAGATGAGTGATGGATA	23	-22.3	0	0	0	970	1409	1331	0.009
GGAATGATGAGGAAAAATGTA	21	-18	0	0	0	15	13	15	0.005
GTGGAAGAAAGAGAAGATGATA	22	-47.2	0	0	0	17	19	24	0.001
GGTCATGATCGCGGTCACGGT	21	-69.1	0	0	0	17	13	19	0.009
ATGGAAGAGTGATATGGATAA	21	-44.4	0	0	0	40	70	64	0.020

The length, minimum free energy, total number of reads in the six libraries and statistical significance (*P*-value) for the differentially expressed novel miRNAs identified in galls and control roots are indicated. In bold those sequences with a minimum free energy suitable for miRNAs.

by galls and controls, 67.7% (22 974) were upregulated in galls, whereas only 10 954 were repressed (Fig. S2). Therefore, from the 56 455 sequences of 24-nt DE, 42 944 (76%) were either exclusive or upregulated in galls (Fig. S2). Strikingly, up to 1537 sequences of 24 nt presented a FC higher than +20, showing

remarkable differences in their expression levels in galls as compared to the control roots. Comparison of these results to those relative to the sRNAs of 20–21 nt described above, mostly down-regulated in galls, indicate a contrasted regulation between 20–21-nt sRNAs and 24-nt sRNAs in galls.

Table 3 Predicted targets of differentially expressed (DE) miRNAs

miRNA	Target ID	Description
ath-miR156h	AT3G05165	sugar transporter, putative
ath-miR156i	AT2G17220	Protein kinase superfamily protein
ath-miR5643a	AT1G45130	BGAL5 beta-galactosidase 5
ath-miR5655	AT4G28270	ATRMA2, RMA2 RING membrane-anchor 2
ath-miR5657	AT1G20950	Phosphofructokinase family protein
NewSeq1	AT5G51690	ACS12 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 12
ath-miR156a,b,c,d,e,f,g,j	AT5G50670	squamosa promoter-binding protein, putative
ath-miR156j	AT5G08620	STRS2, ATRH25 STRS2 (STRESS RESPONSE SUPPRESSOR 2)
ath-miR159b/ath-miR319b	AT5G06100	MYB33, ATMYB33 MYB33 (MYB DOMAIN PROTEIN 33); DNA binding/transcription factor
ath-miR163	AT3G44870	S-adenosyl-L-methionine:carboxyl methyltransferase family protein
ath-miR163	AT5G37990	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
ath-miR165a,b/ath-miR166a,b,c,d,e,f,g	AT2G34710	PHB, ATHB14, ATHB-14, PHB-1D PHB (PHABULOSA); DNA binding/transcription factor
ath-miR165a,b/ath-miR166a,b,c,d,e,f,g	AT1G52150	ATHB-15, ATHB15, CNA, ICU4 ATHB-15; DNA binding/transcription factor
ath-miR167d	AT3G61310	DNA-binding family protein
ath-miR169d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n	AT5G06510	NF-YA10 NF-YA10 (NUCLEAR FACTOR Y, SUBUNIT A10); transcription factor
ath-miR169d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n	AT3G05690	NF-YA2 (NUCLEAR FACTOR Y, SUBUNIT A2)
ath-miR169 h,i,j,k,l,m,n	AT1G72830	HAP2C, ATHAP2C, NF-YA3 NF-YA3 (NUCLEAR FACTOR Y, SUBUNIT A3); transcription factor
ath-miR172a,b-3p	AT5G12900	unknown protein
ath-miR172a,b-3p	AT4G29430	rps15ae ribosomal protein S15A E
ath-miR2111a-5p,b-5p	AT2G19590	ACO1, ATACO1 ACC oxidase 1
ath-miR399b,e	AT2G33770	UBC24, ATUBC24, PHO2 PHO2 (PHOSPHATE 2); ubiquitin-protein ligase

Predicted Arabidopsis genes differentially expressed (DE) in 3-d-post-inoculation (dpi) giant cells and 3–7-dpi galls induced by *Meloidogyne javanica* and *M. incognita* in *Arabidopsis thaliana* (Jammes *et al.*, 2005; Barcala *et al.*, 2010) as putative targets of the differentially expressed miRNAs described within the manuscript. Red, induced, and green, repressed in galls.

Those sRNAs associated with DNA, rasiRNAs (most of them 24-nt long; Axtell, 2013), from control and gall samples were mapped in the five Arabidopsis chromosomes. Their distribution was concentrated in the same areas (mostly centromeric) for controls and galls, although the total rasiRNAs number was much higher in galls than in controls (Fig. 7), similarly to that occurring for the gall-exclusive and control root-exclusive rasiRNAs (Fig. S3). From the 27 groups or families of repetitive sequences identified in the six libraries, 16 were induced in galls with respect to the controls and only two were less abundant (Table 4; $P < 0.05$). All of these results suggest that the abundance or 24-nt sRNAs (most probably also rasiRNAs), constitutes a gall hallmark as well.

Discussion

Under the generic name of small RNA (sRNA), a plethora of diverse RNA molecules of 20–30 nt that have emerged as major regulators in plants still have little-known roles in plant–nematode interactions. The only data concerning root–knot nematode (RKN)–plant interactions were the role of miRNAs in systemic changes caused by the infection (Zhao *et al.*, 2015). Here we describe for the first time the sRNA population differential expression (DE) in RKN-induced galls compared to uninfected root segments. Our results indicate that the abundance of 24-nt sRNAs (most probably rasiRNAs) constitutes a gall hallmark, at least at early infection stages (Fig. 2). We also describe the first functional role during a plant–nematode interaction for a tasiRNA, TAS3a, regulated by miR390a in galls. This regulatory module is highly conserved from the moss *Physcomitrella patens*

(Allen *et al.*, 2005) to higher plants (Axtell *et al.*, 2006). Our study was performed with three independent biological replicates for galls and for control roots. Accordingly, we had a high validation rate for the abundance tendencies of miRNAs and their putative gene targets by independent techniques based on q-PCR and microarrays (Fig. 3). Galls are pseudo-organs formed by the expansion of giant cells (GCs), the proliferation of the neighboring vascular tissues and the hypertrophy of cortical cells in response to the nematode infection (Escobar *et al.*, 2015). Therefore, sRNAs detected in this study by high-throughput sequencing could be originated from GCs and from any of these cell types.

We obtained sequences of 21 and 24-nt as the most abundant in the six libraries (Fig. 2). This is consistent with the scarce existing data on massive sRNAs sequencing in cyst-nematode feeding sites (Hewezi *et al.*, 2008, 2012; Li *et al.*, 2012). We found differences in sRNA length distribution between galls and control roots: 21-nt sRNAs (the length of most plant miRNAs; Axtell, 2013) were more abundant in uninfected root libraries than in gall libraries, whereas 24-nt sRNAs, (the typical length of rasiRNAs; Axtell, 2013) were amply more abundant in galls. Only 11 miRNAs were upregulated in galls, whereas 51 miRNAs were downregulated. These data strongly suggest a general downregulation of miRNAs in early-developing galls, as reported for 4-d-post-inoculation (dpi)-syncytia (Hewezi *et al.*, 2008). Most downregulated miRNAs in galls are induced or have a confirmed role in other stress conditions or nutritional statuses (Guleria *et al.*, 2011), with the exception of two miRNAs from the same family (miR156i, h), probably related to hypoxia (Guleria *et al.*, 2011), which were induced in galls (Table 1). Although hypoxia

Table 4 Repeat associated small interfering RNA (rasiRNAs) in *Meloidogyne javanica* galls and control root libraries

Type		Unique Reads						FC	P value
		G1	G2	G3	R1	R2	R3		
DNA/En-Spm	Antisense	12 324	10 919	11 389	5193	5921	6432	1.9	0.001
	Sense	16 168	14 660	15 019	5722	6334	7043	2.3	0.001
DNA/Harbinger	Antisense	3068	2672	2842	1893	1964	2194	1.4	0.007
	Sense	3942	3446	3639	2089	2194	2404	1.6	0.003
DNA/hAT-Ac	Antisense	7114	6390	7022	4393	4373	4826	1.5	0.001
	Sense	6072	5246	5578	3138	3284	3491	1.6	0.002
DNA/MuDR	Antisense	62 474	57 081	58 722	39 919	42 600	46 227	1.3	0.001
	Sense	65 456	60 306	62 294	40 907	43 668	47 507	1.4	0.000
DNA/TcMar-Mariner	Antisense	278	227	261	278	301	317	-1.2	0.038
LINE/L1	Antisense	25 452	23 074	24 568	15 505	16 393	17 736	1.4	0.001
	Sense	40 596	36 065	39 289	22 187	23 629	25 230	1.6	0.001
LINE?	Sense	1167	1027	1105	780	854	911	1.3	0.008
LTR/Copia	Antisense	28 689	25 912	27 391	14 858	15 972	17 389	1.6	0.001
	Sense	38 615	35 199	36 448	17 196	18 791	20 583	1.9	0.000
LTR/Gypsy	Antisense	54 906	49 407	51 941	24 441	26 914	29 642	1.9	0.001
	Sense	69 655	63 209	65 910	32 429	36 191	39 162	1.8	0.000
Other/Composite	Antisense	712	699	676	554	545	676	1.1	0.011
RC/Helitron	Antisense	22 238	20 305	20 770	16 397	16 985	18 957	1.2	0.007
rRNA	Antisense	6329	5392	6131	4247	4018	4593	1.3	0.011
Satellite/centr	Antisense	1459	1396	1328	478	554	645	2.4	0.000
	Sense	1066	1037	967	439	536	576	1.9	0.000
Satellite	Antisense	6815	6131	5993	2650	2811	3123	2.1	0.003
	Sense	4410	4211	4066	2096	2112	2375	1.9	0.000
SINE/tRNA	Antisense	3010	2581	3136	3269	3416	3697	-1.2	0.032
SINE?	Sense	210	202	237	139	132	142	1.5	0.007

Number of unique reads in the six libraries are listed. Fold change (FC) and statistical significance (*P*-value) for the differentially expressed groups of repeat associated small interfering RNA (rasiRNAs).

inside galls has not been confirmed, indirect evidences come from the activation in tobacco GCs induced by *Meloidogyne javanica* of a hemoglobin promoter that responds to low oxygen tension (Ehsanpour & Jones, 1996). Additionally, other hypoxia-related genes were also induced in 3-dpi galls (Barcala *et al.*, 2010; Cabello *et al.*, 2014), for example, a gene encoding a class I non-symbiotic leghemoglobin with high oxygen affinity (At1g16060; Hunt *et al.*, 2002), an alcohol dehydrogenase-coding gene (At1g77120), and *SUS1/SUS4*, upregulated in roots under hypoxia (Bieniawska *et al.*, 2007),

Examples of stress-induced miRNAs that were repressed in galls include members of the miR169 family induced under drought (Li *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2011), low temperature (Zhou *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010), high soil salinity (Zhao *et al.*, 2009), N deficiency (Zhao *et al.*, 2010) and UV-B radiation (Zhou *et al.*, 2007). Further examples are miR391 and miR399, which are prominently induced upon phosphate starvation and involved in inorganic phosphate homeostasis maintenance (Lundmark *et al.*, 2010; Guleria *et al.*, 2011), and miR780, induced under N starvation (Liang *et al.*, 2012). Their repression might indicate that N and P status are maintained in galls, probably being a basic requirement to sustain nematode feeding. This is also in accordance with the global downregulation of stress-related genes in early-developing GCs and galls in Arabidopsis and tomato (Jammes *et al.*, 2005; Schaff *et al.*, 2007; Caillaud *et al.*, 2008; Barcala *et al.*, 2010; Portillo *et al.*, 2013).

Other gall-repressed miRNAs are associated with developmental processes, for example, *MIR166/165* genes, which regulates shoot apical meristem and floral development in parallel to the WUSCHEL-CLAVATA pathway (Jung & Park, 2007), or miR156 (a, b, c, d, e, f, j) that regulates the juvenile-to-adult transition (Wu *et al.*, 2009). In this respect, cyst nematodes secrete peptides similar to CLAVATA-LIKE ELEMENTS (CLE-like) plant ligands, which have a role during syncytia formation (Replogle *et al.*, 2011, 2013). Other CLE-like peptides, such as 16D10 from RKNs, interact with transcription factors such as SCARECROW, a key regulator of radial patterning in the Arabidopsis root (Levesque *et al.*, 2006). Thus, the repression of these miRNAs in galls might be related to developmental processes contributing to maintain a balance between cell proliferation and differentiation in the complex gall structure (Table 1).

Although the reasons and functional consequences of massive miRNA repression in galls is currently far from being understood, downregulation of several miRNAs has been reported in several plant species during interactions with different pathogens such as fungi, viruses or bacteria (Balmer & Mauch-Mani, 2013). In Arabidopsis infected with *Heterodera schachtii*, miR396 downregulation and subsequent *GRF1/GRF3* induction are necessary for correct syncytia initiation (Hewezi *et al.*, 2012). In mammals, general miRNA-mediated gene repression contributes to cancer by promoting transposable element (TE) expression that benefits the evolving tumor by leading to genomic instability

(Shalgi *et al.*, 2010). Accordingly, we have identified several miRNAs as being downregulated in early-developing galls that may target TEs in the Arabidopsis genome (Tables S2, S3).

The most abundant miRNA induced in 3-dpi galls is miR390 (Table 1). miR390a and TAS3-derived tasiRNAs define a pathway that regulates leaf patterning establishing leaf polarity and controls lateral root growth by repressing the *ARF* family members *ARF2*, *ARF3* and *ARF4* (Hunter *et al.*, 2006; Nogueira *et al.*, 2007; Marin *et al.*, 2010). Previously, a molecular link between lateral root formation and galls was demonstrated by the crucial role during gall formation of *LBD16*, an essential gene for lateral root development which is regulated by auxins (Cabrera *et al.*, 2014a), similarly to miR390a. Here we describe another regulatory network shared by galls and lateral roots, based on the regulatory action of miR390 on TAS3-derived tasiRNAs (Figs 4–6). The expression patterns of miR390a and TAS3a promoters overlapped in galls, particularly in the vascular tissue and GCs (Fig. 4). Loss-of-function lines showed increased resistance to *M. javanica* and their galls were smaller than in control plants (Fig. 5). Remarkably, TAS3-derived tasiRNAs were active in galls, as proven by the fact that an ARF3::GUS-based sensor line showed no signal in wild-type galls, whereas a line carrying an *ARF3* mutation resistant to TAS3-derived tasiRNAs showed GUS activity restricted to the gall centre, including GCs (Fig. 6). These results concur with our former data from microarrays, where *ARF4*, another demonstrated target of TAS3-derived tasiRNAs in lateral roots (Marin *et al.*, 2010), was repressed in 3-dpi GCs (Barcala *et al.*, 2010). Thus, we identify for the first time in the Arabidopsis–RKN interaction a complex regulatory module that involves two sRNA types: an miRNA highly abundant in galls, miR390, and the TAS3-derived tasiRNAs, actively functioning in both galls and GCs. Although, Arabidopsis is not a natural host for RKNs, the transcriptomes of early GCs induced by *M. javanica* in Arabidopsis and tomato roots showed a high similarity (Portillo *et al.*, 2013). Furthermore, genes such as the peroxidase *TPX1*, downregulated in Arabidopsis GCs at 3 dpi as well as its corresponding ortholog in tomato (Barcala *et al.*, 2010; Portillo *et al.*, 2013) with a demonstrably crucial role for GCs/gall formation in tomato, provide another specific example. These findings validate holistic approaches in the Arabidopsis genetic model for simplicity, and launch the potential to transfer this knowledge to crop plants.

Galls showed a higher abundance in 24-nt sRNA sequences than control roots, most of them being gall-exclusive or upregulated (Fig. S2). Most of these sequences match repetitive sequences in the genome, like TEs (Table 4; Fig. 7). More than 16 out of 26 transposon families predicted to produce the rasiRNAs identified in uninfected roots and galls were over-represented in galls (Table 4). Among them, hAT and PIF/Harbinger families are highly enriched in euchromatic regions in maize and have been related to heterosis (He *et al.*, 2013). rasiRNAs play a pivotal role in gene silencing through the RNA-dependent DNA methylation (RdDM) pathway (Weiberg *et al.*, 2014). In RdDM, the RNA polymerase IV/RDR2/DCL3/AGO4/6/9 module induces DNA methylation through 24 nt sRNAs, which is maintained by MET1 and CMT3. In

accordance, *MET1* is upregulated in Arabidopsis GCs (Barcala *et al.*, 2010) and a chromomethylase involved in DNA methylation (Lindroth *et al.*, 2001) is induced in tomato GCs (Portillo *et al.*, 2013). Moreover, previous microarray results showed a drastic repression of gene expression in GCs as compared to control roots. This tendency was conserved in early-developing GCs (3 dpi) and galls of Arabidopsis and tomato (Jammes *et al.*, 2005; Barcala *et al.*, 2010; Portillo *et al.*, 2013). Thus, in this context, it is possible that epigenetic processes regulated by 24-nt sRNAs mediate gene repression during early stages of GC differentiation from their vascular precursors. A similar abundance of 24-nt sRNAs was found in a *Verticillium*-sensitive cultivar of *Gossypium hirsutum*, infected with *Verticillium dahlia*, a soil-borne fungal pathogen (Yang *et al.*, 2013). Suppression of the RdDM silencing pathway increased Arabidopsis resistance to *Pseudomonas syringae* (Downen *et al.*, 2012), suggesting that this pathway is important for bacterial infection.

In soybean, DNA hypermethylation has been observed in cyst nematode-resistant lines with multiple Rhg1 copies (Cook *et al.*, 2014). Strikingly, tasiRNA transcripts can also generate 24-nt sRNAs in plants (Allen *et al.*, 2005; Khraiwesh *et al.*, 2010). These induce cytosine methylation at tasiRNA-generating loci (Wu *et al.*, 2012), similarly to 21-nt secondary siRNAs generated by DCL4 that participate in post-transcriptional silencing of exogenous targets through AGO1 (Cuperus *et al.*, 2010). In this respect, a recent differential methylation study (methyloma) of Arabidopsis DNA extracted from soybean roots infected with *H. schachtii* (Rambani *et al.*, 2015) showed DNA methylation changes during the compatible interaction that impact a large number of protein coding genes locally in the syncytium and systemically. A significant portion of the differentially methylated genes was among genes with differential expression in the soybean syncytium. These results point to a novel role of syncytia-induced DNA methylation in regulating gene expression changes during parasitism (Rambani *et al.*, 2015).

In conclusion, a plethora of sRNAs is present in early-developing galls. Among them, some miRNAs will contribute to the gene silencing observed in GCs via target mRNA degradation, translation inhibition, or by regulation of ta-siRNAs, such as miR390-TAS3. The scenario gets more complex, as one of the gall molecular signatures is the high abundance of 24-nt sRNAs known to mediate epigenetic regulation of gene expression through chromatin remodeling. Future research will elucidate these sRNA-mediated mechanisms that probably orchestrate the developmental processes participating in gall and GC differentiation.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Government (AGL2013-48787 to C.E. and PCIN-2013-053 to C.F.) and by the Castilla-la Mancha Government (PEII-2014-020-P to C.F.). J.C. was supported by a fellowship from the Ministry of Education, Spain. C.M. was supported by a PhD grant from INRA-SPE Dpt and the Conseil Régional Provence-Alpes-Côte d'Azur (PACA). B.F. was supported by the French Government

(National Research Agency, ANR) through the 'Investments for the Future' LabEx SIGNALIFE (ANR-11-LABX-0028-01).

Author contributions

J.C., C.F. and C.E. planned and designed the research. J.C., M.B., A.G., A.R.-M., C.M. and A.M. performed experiments and analysed data. J.C., V.R.-F, S.J.-P, B.F, C.F and C.E. wrote the manuscript. All authors made changes to the initial manuscript and revised the final version.

References

- Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Carrington JC. 2005. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121: 207–221.
- Aukerman MJ, Sakai H. 2003. Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell* 15: 2730–2741.
- Axtell MJ. 2013. Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annual Review of Plant Biology* 64: 137–159.
- Axtell MJ, Jan C, Rajagopalan R, Bartel DP. 2006. A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants. *Cell* 127: 565–577.
- Balmer D, Mauch-Mani B. 2013. Small yet mighty – microRNAs in plant-microbe interactions. *Microna* 2: 72–79.
- Barcala M, Garcia A, Cabrera J, Casson S, Lindsey K, Favery B, Garcia-Casado G, Solano R, Fenoll C, Escobar C. 2010. Early transcriptomic events in microdissected Arabidopsis nematode-induced giant cells. *Plant Journal* 61: 698–712.
- Bar-Or C, Kapulnik Y, Koltai H. 2005. A broad characterization of the transcriptional profile of the compatible tomato response to the plant parasitic root knot nematode *Meloidogyne javanica*. *European Journal of Plant Pathology* 111: 181–192.
- Bieniawska Z, Paul Barratt DH, Garlick AP, Thole V, Kruger NJ, Martin C, Zrenner R, Smith AM. 2007. Analysis of the sucrose synthase gene family in Arabidopsis. *Plant Journal* 49: 810–828.
- Bohmann H. 2015. Introductory chapter on the basic biology of cyst nematodes. In: Escobar C, Fenoll C, eds. *Advances in botanical research: plant nematode interactions*, vol. 73. Oxford, UK: Elsevier, 33–59.
- Bologna NG, Voinnet O. 2014. The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. *Annual Review of Plant Biology* 65: 473–503.
- Bonnet E, Wuyts J, Rouzé P, Van de Peer Y. 2004. Evidence that microRNA precursors, unlike other non-coding RNAs, have lower folding free energies than random sequences. *Bioinformatics* 20: 2911–2917.
- Cabello S, Lorenz C, Crespo S, Cabrera J, Ludwig R, Escobar C, Hofmann J. 2014. Altered sucrose synthase and invertase expression affects the local and systemic sugar metabolism of nematode-infected *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of Experimental Botany* 65: 201–212.
- Cabrera J, Bustos R, Favery B, Fenoll C, Escobar C. 2014a. NEMATIC: a simple and versatile tool for the *in silico* analysis of plant–nematode interactions. *Molecular Plant Pathology* 15: 627–636.
- Cabrera J, Diaz-Manzano FE, Sanchez M, Rosso MN, Melillo T, Goh T, Fukaki H, Cabello S, Hofmann J, Fenoll C *et al.* 2014b. A role for *LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN 16* during the interaction Arabidopsis–*Meloidogyne* spp. provides a molecular link between lateral root and root-knot nematode feeding site development. *New Phytologist* 203: 632–645.
- Caillaud MC, Dubreuil G, Quentin M, Perfus-Barbeoch L, Lecomte P, de Almeida Engler J, Abad P, Rosso MN, Favery B. 2008. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *Journal of Plant Physiology* 165: 104–113.
- Cook DE, Bayless AM, Wang K, Guo X, Song Q, Jiang J, Bent AF. 2014. Distinct copy number, coding sequence, and locus methylation patterns underlie Rhg1-mediated soybean resistance to soybean cyst nematode. *Plant Physiology* 165: 630–647.
- Cuperus JT, Montgomery TA, Fahlgren N, Burke RT, Townsend T, Sullivan CM, Carrington JC. 2010. Identification of MIR390a precursor processing-defective mutants in Arabidopsis by direct genome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 107: 466–471.
- Dai X, Zhao PX. 2011. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Research* 39: W155–W159.
- Downen RH, Pelizzola M, Schmitz RJ, Lister R, Downen JM, Nery JR, Dixon JE, Ecker JR. 2012. Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 109: E2183–E2191.
- Ehsanpour AA, Jones MG. 1996. Glucuronidase expression in transgenic tobacco roots with a parasponia promoter on infection with *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology* 28: 407–413.
- Escobar C, Barcala M, Cabrera J, Fenoll C. 2015. Overview of root-knot nematodes and giant cells. In: Escobar C, Fenoll C, eds. *Advances in botanical research: plant nematode interactions*, vol. 73. Oxford, UK: Elsevier, 1–32.
- Escobar C, Sigal B, Mitchum M. 2011. Transcriptomic and proteomic analysis of the plant response to nematode infection. In: Jones J, Gheysen G, Fenoll C, eds. *Genomics and molecular genetics of plant–nematode interactions*. Dordrecht, the Netherlands: Springer, 157–176.
- Frenquelli M, Muzio M, Scielzo C, Fazi C, Scarfò L, Rossi C, Ferrari G, Ghia P, Caligaris-Cappio F. 2010. MicroRNA and proliferation control in chronic lymphocytic leukemia: functional relationship between miR-221/222 cluster and p27. *Blood* 115: 3949–3959.
- Ghildiyal M, Zamore PD. 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics* 10: 94–108.
- Guleria P, Mahajan M, Bhardwaj J, Yadav SK. 2011. Plant small RNAs: biogenesis, mode of action and their roles in abiotic stresses. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 9: 183–199.
- Harfouche L, Haichar Fel Z, Achouak W. 2015. Small regulatory RNAs and the fine-tuning of plant–bacteria interactions. *New Phytologist* 206: 98–106.
- He G, Chen B, Wang X, Li X, Li J, He H, Yang M, Lu L, Qi Y, Wang X *et al.* 2013. Conservation and divergence of transcriptomic and epigenomic variation in maize hybrids. *Genome Biology* 14: R57.
- Hewezi T, Baum TJ. 2015. Gene silencing in nematode feeding sites. In: Escobar C, Fenoll C, eds. *Advances in botanical research: plant nematode interactions*, vol. 73. Oxford, UK: Elsevier, 221–239.
- Hewezi T, Howe P, Maier TR, Baum TJ. 2008. Arabidopsis small RNAs and their targets during cyst nematode parasitism. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 1622–1634.
- Hewezi T, Maier TR, Nettleton D, Baum TJ. 2012. The Arabidopsis microRNA396-GRF1/GRF3 regulatory module acts as a developmental regulator in the reprogramming of root cells during cyst nematode infection. *Plant Physiology* 159: 321–335.
- Hunt PW, Klok EJ, Trevaskis B, Watts RA, Ellis MH, Peacock WJ, Dennis ES. 2002. Increased level of hemoglobin 1 enhances survival of hypoxic stress and promotes early growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 99: 17 197–17 202.
- Hunter C, Willmann MR, Wu G, Yoshikawa M, de la Luz Gutierrez-Nava M, Poethig SR. 2006. Trans-acting siRNA-mediated repression of ETTIN and ARF4 regulates heteroblasty in Arabidopsis. *Development* 133: 2973–2981.
- Jagga Z, Gupta D. 2014. Supervised learning classification models for prediction of plant virus encoded RNA silencing suppressors. *PLoS ONE* 9: e97446.
- Jammes F, Lecomte P, de Almeida-Engler J, Bitton F, Martin-Magniette ML, Renou JP, Abad P, Favery B. 2005. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in Arabidopsis. *Plant Journal* 44: 447–458.
- Jung J-H, Park C-M. 2007. MIR166/165 genes exhibit dynamic expression patterns in regulating shoot apical meristem and floral development in Arabidopsis. *Planta* 225: 1327–1338.
- Kanno T, Yoshikawa M, Habu Y. 2013. Locus-specific requirements of DDR complexes for gene-body methylation of TAS genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology Reporter* 31: 1048–1052.
- Khraiwesh B, Arif MA, el Seum GI, Ossowski S, Weigel D, Reski R, Frank W. 2010. Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell* 140: 111–122.
- Klink VP, Hosseini P, Matsye P, Alkharouf NW, Matthews BF. 2009. A gene expression analysis of syncytia laser microdissected from the roots of the *Glycine*

- max* (soybean) genotype PI 548402 (Peking) undergoing a resistant reaction after infection by *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode). *Plant Molecular Biology* 71: 525–567.
- Klink VP, Hosseini P, Matsye PD, Alkharouf NW, Matthews BF. 2010. Syncytium gene expression in *Glycine max* (PI 88788) roots undergoing a resistant reaction to the parasitic nematode *Heterodera glycines*. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 176–193.
- Lee H, Yoo SJ, Lee JH, Kim W, Yoo SK, Fitzgerald H, Carrington JC, Ahn JH. 2010. Genetic framework for flowering-time regulation by ambient temperature-responsive miRNAs in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* 38: 3081–3093.
- Levesque MP, Vernoux T, Busch W, Cui H, Wang JY, Blilou I, Hassan H, Nakajima K, Matsumoto N, Lohmann JU *et al.* 2006. Whole-genome analysis of the SHORT-ROOT developmental pathway in *Arabidopsis*. *PLoS Biology* 4: e143.
- Li W-X, Oono Y, Zhu J, He X-J, Wu J-M, Iida K, Lu X-Y, Cui X, Jin H, Zhu J-K. 2008. The *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell Online* 20: 2238–2251.
- Li X, Wang X, Zhang S, Liu D, Duan Y, Dong W. 2012. Identification of soybean microRNAs involved in soybean cyst nematode infection by deep sequencing. *PLoS ONE* 7: e39650.
- Liang G, He H, Yu D. 2012. Identification of nitrogen starvation-responsive microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 7: e48951.
- Lindroth AM, Cao X, Jackson JP, Zilberman D, McCallum CM, Henikoff S, Jacobsen SE. 2001. Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science* 292: 2077–2080.
- Lundmark M, Korner CJ, Nielsen TH. 2010. Global analysis of microRNA in *Arabidopsis* in response to phosphate starvation as studied by locked nucleic acid-based microarrays. *Physiologia Plantarum* 140: 57–68.
- Marin E, Jouanet V, Herz A, Lokerse AS, Weijers D, Vaucheret H, Nussaume L, Crespi MD, Maizel A. 2010. miR390, *Arabidopsis TAS3* tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. *Plant Cell* 22: 1104–1117.
- Mitkowski NA, Abawi GS. 2003. Root-knot nematodes. *Plant Health Instructor* 2011: doi: 10.1094/PHI-I-2003-0917-0.
- Montgomery TA, Howell MD, Cuperus JT, Li D, Hansen JE, Alexander AL, Chapman EJ, Fahlgren N, Allen E, Carrington JC. 2008. Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in *TAS3* transacting siRNA formation. *Cell* 133: 128–141.
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JD. 2006. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312: 436–439.
- Nogueira FT, Madi S, Chitwood DH, Juarez MT, Timmermans MC. 2007. Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis. *Genes & Development* 21: 750–755.
- Nuthikattu S, McCue AD, Panda K, Fultz D, DeFraia C, Thomas EN, Slotkin RK. 2013. The initiation of epigenetic silencing of active transposable elements is triggered by RDR6 and 21–22 nucleotide small interfering RNAs. *Plant Physiology* 162: 116–131.
- Portillo M, Cabrera J, Lindsey K, Topping J, Andres MF, Emiliozzi M, Oliveros JC, Garcia-Casado G, Solano R, Koltai H *et al.* 2013. Distinct and conserved transcriptomic changes during nematode-induced giant cell development in tomato compared with *Arabidopsis*: a functional role for gene repression. *New Phytologist* 197: 1276–1290.
- Portillo M, Lindsey K, Casson S, Garcia-Casado G, Solano R, Fenoll C, Escobar C. 2009. Isolation of RNA from laser-capture-microdissected giant cells at early differentiation stages suitable for differential transcriptome analysis. *Molecular Plant Pathology* 10: 523–535.
- R Development Core Team 2008. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna Austria: R Foundation for Statistical Computing. URL <http://www.R-project.org> [accessed 01 September 2015].
- Rambani A, Rice JH, Liu J, Lane T, Ranjan P, Mazarei M, Pantalone V, Stewart CN Jr, Staton M, Hewezi T. 2015. The methylome of soybean roots during the compatible interaction with the soybean cyst nematode. *Plant Physiology* 168: 1364–1377.
- Replogle A, Wang J, Bleckmann A, Hussey RS, Baum TJ, Sawa S, Davis EL, Wang X, Simon R, Mitchum MG. 2011. Nematode CLE signaling in *Arabidopsis* requires CLAVATA2 and CORYNE. *Plant Journal* 65: 430–440.
- Replogle A, Wang J, Paolillo V, Smeda J, Kinoshita A, Durbak A, Tax FE, Wang X, Sawa S, Mitchum MG. 2013. Synergistic interaction of CLAVATA1, CLAVATA2, and RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2 in cyst nematode parasitism of *Arabidopsis*. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 26: 87–96.
- Schaff JE, Nielsen DM, Smith CP, Scholl EH, Bird DM. 2007. Comprehensive transcriptome profiling in tomato reveals a role for glycosyltransferase in Mi-mediated nematode resistance. *Plant Physiology* 144: 1079–1092.
- Shalgi R, Pilpel Y, Oren M. 2010. Repression of transposable-elements – a microRNA anti-cancer defense mechanism? *Trends in Genetics* 26: 253–259.
- Smart G, Jones J. 2011. Suppression of plant defences by nematodes. In: Jones J, Gheysen G, Fenoll C, eds. *Genomics and molecular genetics of plant–nematode interactions*. Dordrecht, the Netherlands: Springer, 273–286.
- Sunkar R, Li Y-F, Jagadeeswaran G. 2012. Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in Plant Science* 17: 196–203.
- Thimm O, Blasing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Kruger P, Selbig J, Muller LA, Rhee SY, Stitt M. 2004. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant Journal* 37: 914–939.
- Weiberg A, Wang M, Bellinger M, Jin H. 2014. Small RNAs: a new paradigm in plant–microbe interactions. *Annual Review of Phytopathology* 52: 495–516.
- Wu G, Park MY, Conway SR, Wang JW, Weigel D, Poethig RS. 2009. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell* 138: 750–759.
- Wu G, Poethig RS. 2006. Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by Mir156 and its target SPL3. *Development* 133: 3539–3547.
- Wu L, Mao L, Qi Y. 2012. Roles of dicer-like and argonaute proteins in TAS-derived small interfering RNA-triggered DNA methylation. *Plant Physiology* 160: 990–999.
- Xu M, Li Y, Zhang Q, Xu T, Qiu L, Fan Y, Wang L. 2014. Novel miRNA and phasiRNA biogenesis networks in soybean roots from two sister lines that are resistant and susceptible to SCN race 4. *PLoS ONE* 9: e110051.
- Yang X, Wang L, Yuan D, Lindsey K, Zhang X. 2013. Small RNA and degradome sequencing reveal complex miRNA regulation during cotton somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* 64: 1521–1536.
- Zhang Z, Yu J, Li D, Zhang Z, Liu F, Zhou X, Wang T, Ling Y, Su Z. 2010. PMRD: plant microRNA database. *Nucleic Acids Research* 38: D806–D813.
- Zhao M, Ding H, Zhu J-K, Zhang F, Li W-X. 2011. Involvement of miR169 in the nitrogen-starvation responses in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 190: 906–915.
- Zhao B, Ge L, Liang R, Li W, Ruan K, Lin H, Jin Y. 2009. Members of miR-169 family are induced by high salinity and transiently inhibit the NF-YA transcription factor. *BMC Molecular Biology* 10: 29–29.
- Zhao W, Li Z, Fan J, Hu C, Yang R, Qi X, Chen H, Zhao F, Wang S. 2015. Identification of jasmonic acid-associated microRNAs and characterization of the regulatory roles of the miR319/TCP4 module under root-knot nematode stress in tomato. *Journal of Experimental Botany* 66: 4653–4667.
- Zhao CZ, Xia H, Frazier TP, Yao YY, Bi YP, Li AQ, Li MJ, Li CS, Zhang BH, Wang XJ. 2010. Deep sequencing identifies novel and conserved microRNAs in peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *BMC Plant Biology* 10: 3.
- Zhou X, Wang G, Zhang W. 2007. UV-B responsive microRNA genes in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Systems Biology* 3: 103–103.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Fig. S1 Expression pattern of *pMIR390a::GUS* and *pTAS3a::GUS* in noninfected plant roots and in roots infected with *M. incognita*.

Fig. S2 Pie charts indicating the number of 24 nt sequences that are exclusive, up- or downregulated in gall and control root libraries.

Fig. S3 Distribution of repeat associated small interfering RNA (rasiRNAs) exclusive of galls and roots among the five Arabidopsis chromosomes.

Table S1 Sequence of primers used for the analysis of miRNA target genes by real time q-PCR

Table S2 Number of reads found in the six libraries generated of known miRNAs found in miRBase for Arabidopsis

Table S3 Putative target genes identified for all the differentially expressed known miRNAs

Table S4 Putative target genes identified for the differentially expressed novel miRNAs

Please note: Wiley Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.



About *New Phytologist*

- *New Phytologist* is an electronic (online-only) journal owned by the New Phytologist Trust, a **not-for-profit organization** dedicated to the promotion of plant science, facilitating projects from symposia to free access for our Tansley reviews.
- Regular papers, Letters, Research reviews, Rapid reports and both Modelling/Theory and Methods papers are encouraged. We are committed to rapid processing, from online submission through to publication 'as ready' via *Early View* – our average time to decision is <27 days. There are **no page or colour charges** and a PDF version will be provided for each article.
- The journal is available online at Wiley Online Library. Visit **www.newphytologist.com** to search the articles and register for table of contents email alerts.
- If you have any questions, do get in touch with Central Office (np-centraloffice@lancaster.ac.uk) or, if it is more convenient, our USA Office (np-usaoffice@lancaster.ac.uk)
- For submission instructions, subscription and all the latest information visit **www.newphytologist.com**

New Phytologist Supporting Information

Article title: Differentially expressed small RNAs in Arabidopsis galls formed by *Meloidogyne javanica*: A functional role for miR390 and its TAS3-derived tasiRNAs

Authors: Javier Cabrera, Marta Barcala, Alejandra García, Ana Rio-Machín, Clémence Medina, Stephanie Jaubert-Possamai, Bruno Favery, Alexis Maizel, Virginia Ruiz-Ferrer, Carmen Fenoll, Carolina Escobar.

Article acceptance date: 25 September 2015

The following Supporting Information is available for this article:

Table S1. Sequence of primers used for the analysis of miRNA target genes by real time q-PCR.

Table S2. Number of reads found in the six libraries generated of known miRNAs found in miRBase for Arabidopsis.

Table S3. Putative target genes identified for all the differentially expressed known *miRNAs*.

Table S4. Putative target genes identified for the differentially expressed novel miRNAs.

Figure S1. Expression pattern of *pMIR390a::GUS* and *pTAS3a::GUS* in non-infected plant roots and in roots infected with *M. incognita*.

Figure S2. Pie charts indicating the number of 24 nt sequences that are exclusive, up- or down-regulated in gall and control root libraries.

Figure S3. Distribution of repeat associated small interfering RNA (rasiRNAs) exclusive of galls and roots among the five Arabidopsis chromosomes.

Figure S1. Expression pattern of *pMIR390a::GUS* and *pTAS3a::GUS* in non-infected plant roots and in roots infected with *M. incognita*. Scale bars: 0.5 mm. Black arrows point to galls in (e) and (f).

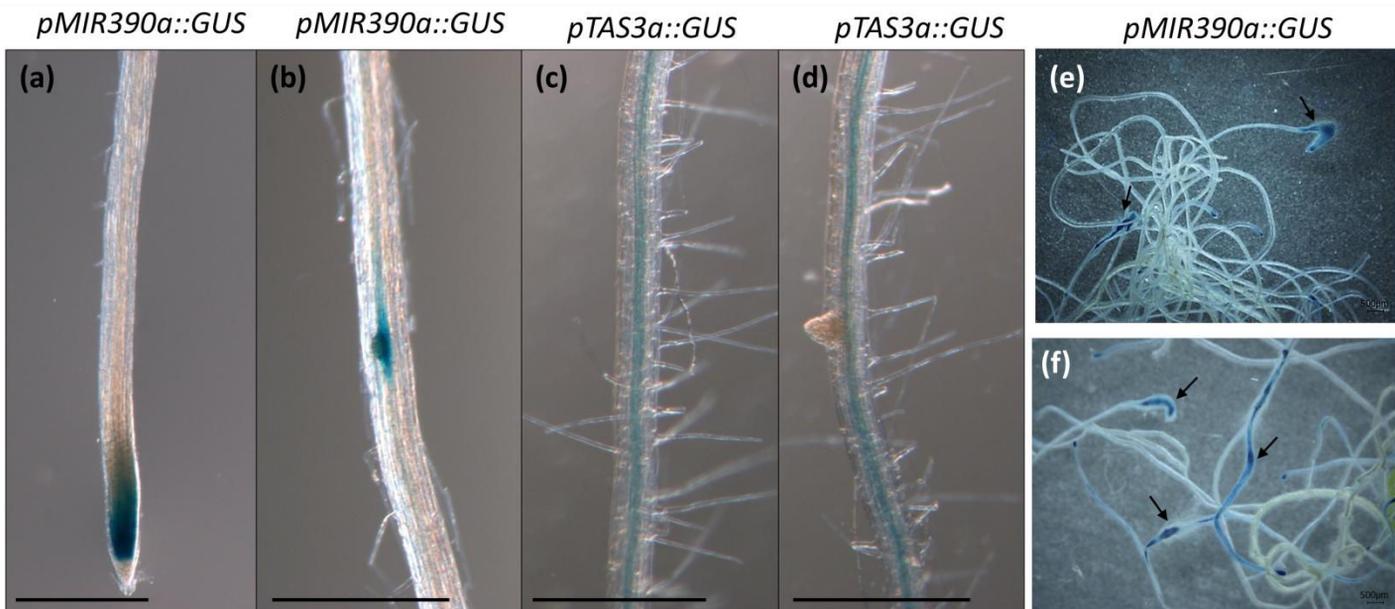


Figure S2. (a) Pie chart indicating the number of 24 nt sequences that are exclusive, up- or down-regulated in gall and control root libraries. (b) Fold change distribution of 24 nt sequences up-regulated in galls. (c) Fold change distribution of 24 nt sequences down-regulated in galls.

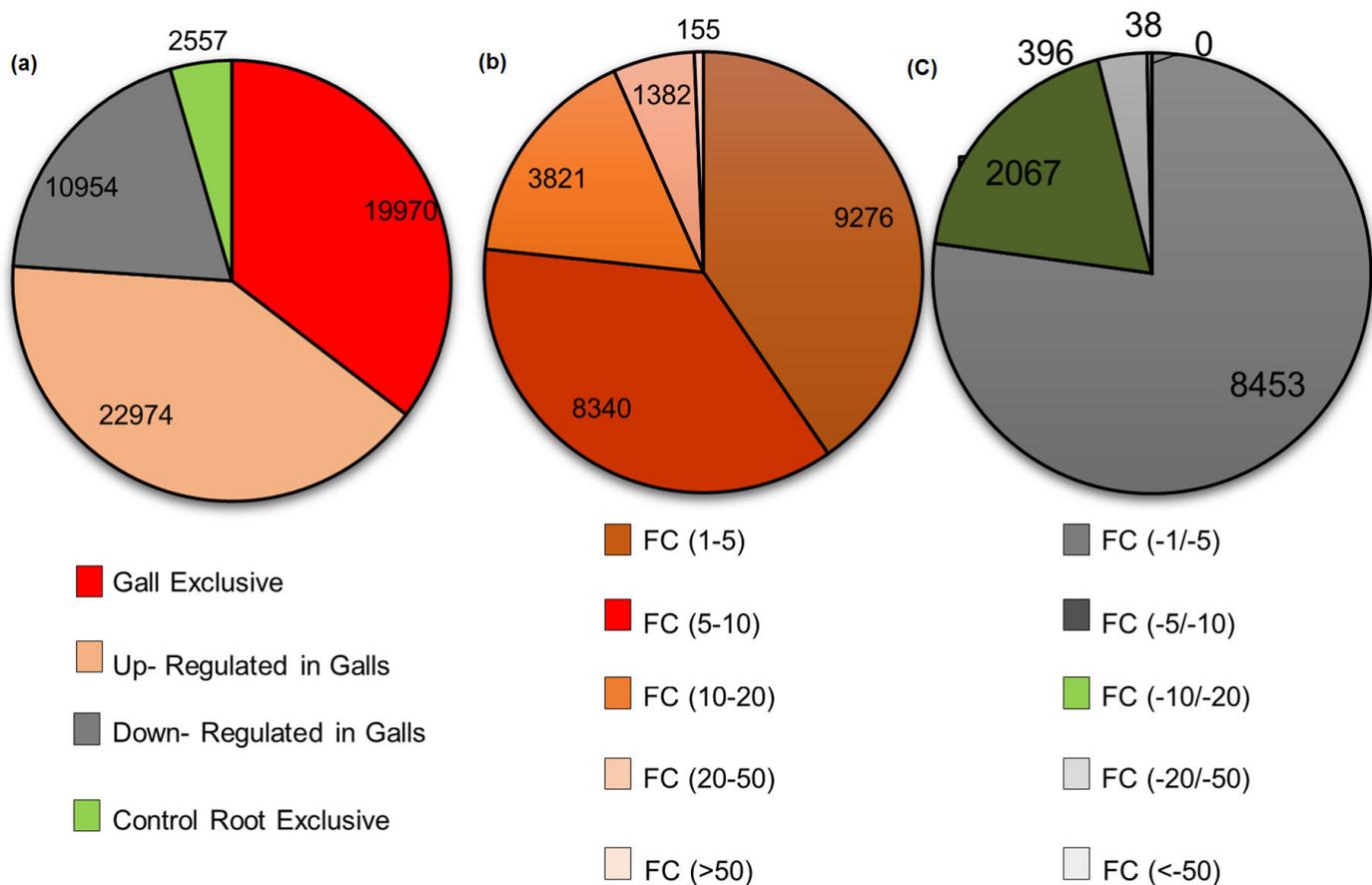
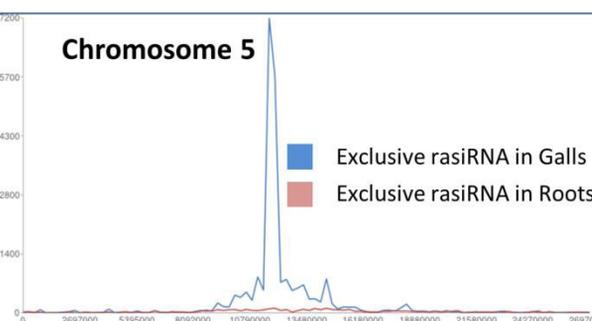
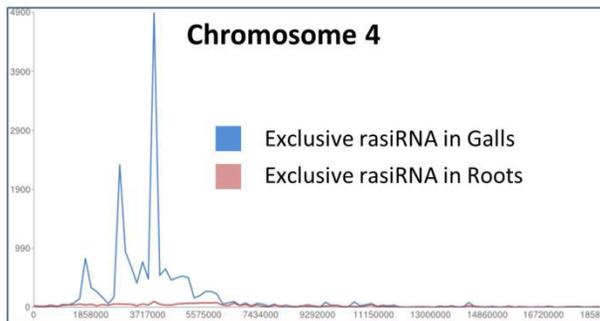
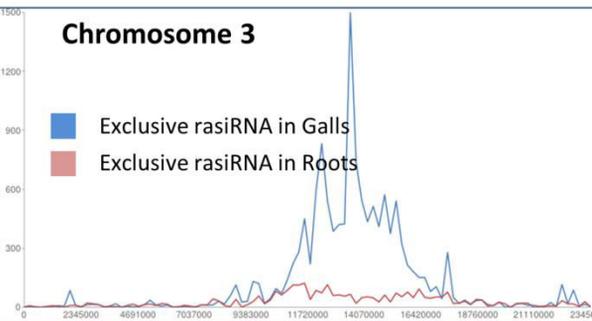
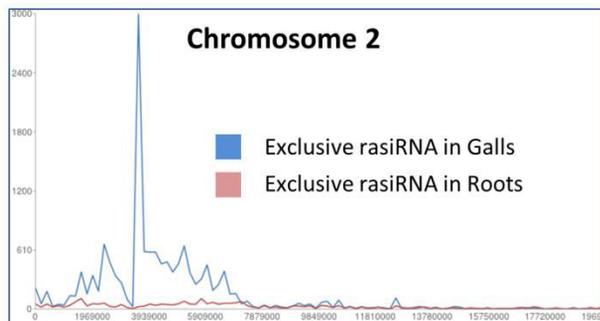
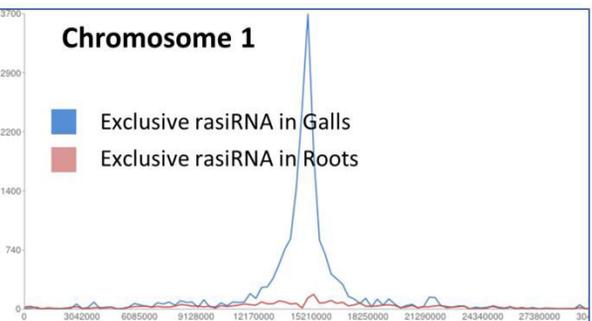


Figure S3. Distribution of repeat associated small interfering RNA (rasiRNAs) exclusive of galls and roots among the five Arabidopsis chromosomes. The X-axis indicates the position in the chromosome and the Y-axis the number of reads.



Sequence reads distribution on Chromosomes

X-axis: Position on chromosome
 Y-axis: Sequence reads

Table S1. Sequence of primers used for the analysis of miRNA target genes by real time q-PCR.

Gene ID	Primer forward	Primer reverse
At1g52150	CCGTCAACATACTCCAAATCC	GTCACCACCGATTACAGC
At2g28550	GCGTGGAGTTAGCTTGAGGA	TCCAGTAAAGGCGATGATCC
At2g34710	TTGGTTTCAGAACCGCAGA	CTGTTTGAAGACGAGCAGCTT
At3g05165	TGCCTTCAGCTACGGATGT	CGCTGAAAATTGTGCCATAG
At3g05690	GCAACTCTGCAACGCACTTA	TGGCACAAGTCTTGACTCTT
At3g61310	GTGGTGCTGTCTCTACTGCAA	GAGAGAGATATGAGCTCGAATAGACC
At1g13440	TGTGGTTGAGTTCGTACTGTTCTGA	CTGCGCATGGAATCAGTGAA

Annexe 2:
Données complémentaires
article siARN

Tableau Annexe: Mutants d'*A. thaliana* affectés dans la voie TGS, PTGS et méthylation de l'ADN.

gène muté	AGI	Mutant	références	TGS	PTGS	méthylation de l'ADN
RDR2	AT4G11130	rdr2-1	SAIL_1277_H08		?	
RDR6	AT3G49500	rdr6-15	SAIL_617			
DCL2/DCL3/DCL4	AT3G03300/AT3G43920 /AT5G20320	dcl2-1/dcl3-1/dcl4-2	NASC : N16391			
AGO1	AT1G48410	ago1-25	EMS : Morel <i>et al.</i> . 2012			
AGO1	AT1G48411	ago1-27	EMS : Morel <i>et al.</i> . 2012			
AGO2	AT1G31280	ago2-1	SALK_003380			
SERRATE	AT2G27100	ser-1	X-rays (N3257)			
AGO4	AT2G27040	ago4-1T	SALK_007523			
DRM1/DRM2	AT5G15380/ AT5G14620	drm1-2/drm2-2	SALK_021316C/SALK_150863C			
DRM1/DRM2/CMT3	AT5G15380/ AT5G14620/AT1G69770	drm1-2/drm2-2/cmt3-11t	SALK_021316C/SALK_150863C/SALK_148381			
NRPD1a	AT1G63020	nrdp1-4	SALK_083051			
NRPE1	AT2G40030	nrpe1-11	SALK_029919			
ROS1	AT2G36490	ros1-4	Lionnel Navarro			
DDM1	AT5G66750	ddm1	Lionnel Navarro			

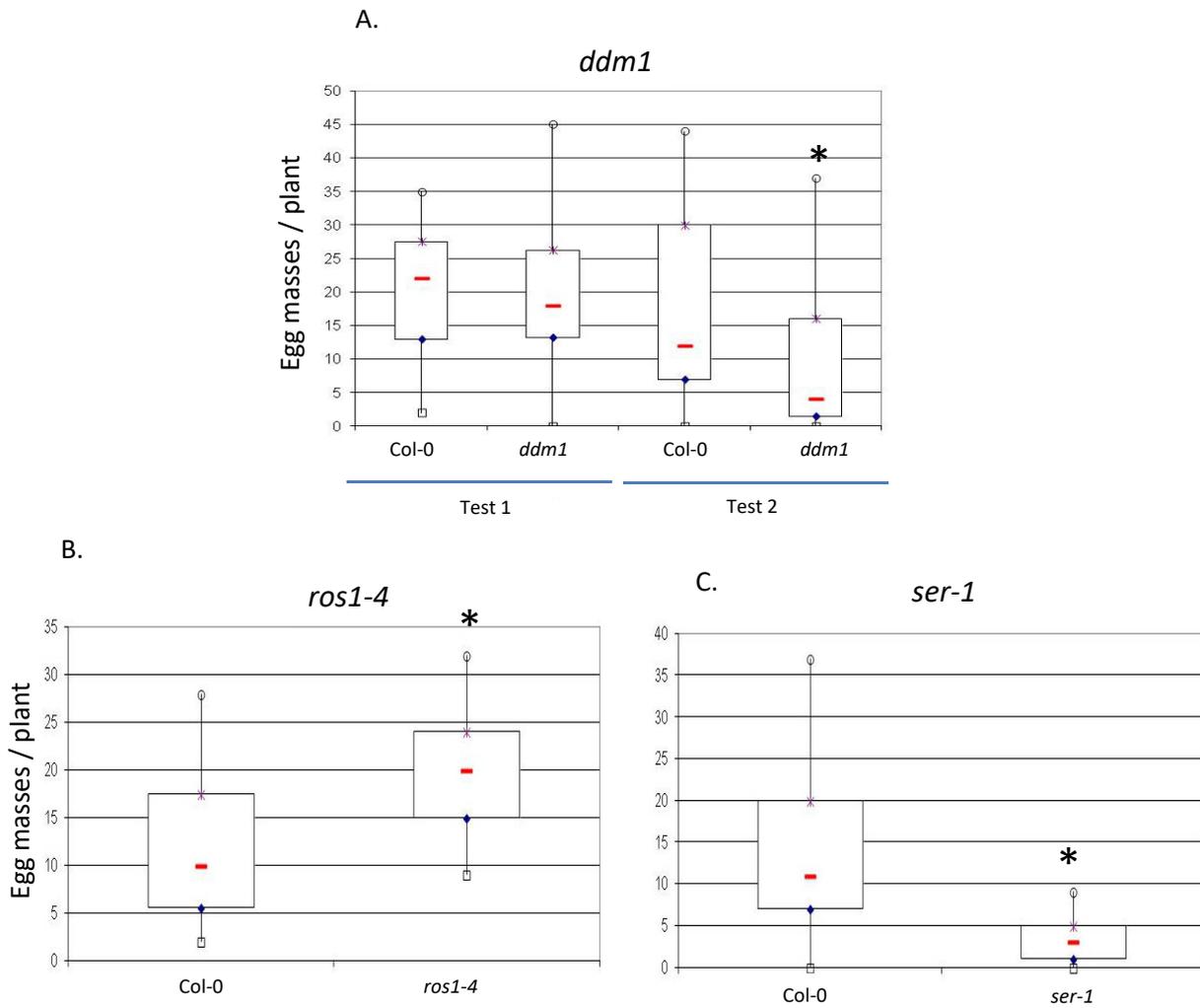


Fig Annexe: Preliminary results of PTGS or DNA methylation mutants

A. *thaliana* DNA methylation mutants: *ddm1* (A), *ros1-4* (B), and PTGS mutant: *ser-1*(C) and Col-0 wild-type plants were infected with *M. incognita* larvae. Egg masses were counted for each plant. Mann-Whitney unidirectional tests were performed for statistical analysis in each experiment.

*: significant differences relative to Col-0; $P < 0.05$.

Annexe 3:
Protocole d'hybridation *in situ* des petits ARN

Hybridation *in situ* des petits ARN

REACTIFS

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • DIG oligonucléotide kit de marquage extrémité 3', 2ème génération (Roche, cat. no. 03353575910) pour étiqueter sondes LNA personnalisées (voir RÉACTIF SETUP). Alternativement, les sondes LNA DIG-marquées peuvent être commandés directement auprès Exiqon | <ul style="list-style-type: none"> • Blocking Reagent (Roche, n° 1 096 176; Conserver à 4 ° C) • Sérum albumine bovine (BSA; ≥98%) (Sigma, n° A7906; Magasin à 4 ° C) |
| <ul style="list-style-type: none"> • DEPC (Sigma, cat. No. 77017), conserver à 4 ° C
ATTENTION DEPC est nuisible et dangereux; porter des gants de protection et en disposer correctement. | <ul style="list-style-type: none"> • Triton X-100 (Sigma, cat. No. T8787) • Anti-DIG-AP, fragments Fab de moutons (Roche, n° 1 093 274; Magasin à 4 ° C) |
| <ul style="list-style-type: none"> • Histo-Clear (Fisher, cat 50-899-90147)
ATTENTION solvant a manipuler sous une hotte | <ul style="list-style-type: none"> • NaCl • Tris • HCl • EDTA • phosphate de sodium • citrate de sodium |
| <ul style="list-style-type: none"> • De l'éthanol (100%) et dilution en série de l'eau • Protéase de Streptomyces griseus (Sigma, n° P5147; conserver à - 20 ° C) • Glycine (Sigma, cat. No. G7403) • Triéthanolamine (Sigma, cat. No. 90279) • Anhydride acétique (Sigma, n° A6404; Conserver à 4 ° C) | <ul style="list-style-type: none"> • eau ultra-purifiée (par exemple, Milli-Q, Millipore) • NBT / BCIP solution stock (Roche, n° 1 681 451; Conserver à 4 ° C) |
| <ul style="list-style-type: none"> • formamide déionisé (Sigma, n° F9037; Conserver à 4 ° C)
! ATTENTION formamide désionisé est toxique et dangereux; porter des gants pour la protection et jetez-la correctement. | <ul style="list-style-type: none"> • Na HPO₂ 4 • NaH₂PO₄ • NaCl • Tris • HCl • EDTA • phosphate de sodium • citrate de sodium • eau ultra-purifiée (par exemple, Milli-Q, Millipore) |
| <ul style="list-style-type: none"> • Le sulfate de dextran (Sigma, n° D8906-5G; Conserver à 4 ° C) • 50 x solution de Denhardt (Sigma, n° D2532; Conserver à - 20 ° C) • ARNt (Roche, n° 109541; Conserver à - 20 ° C) | |

MATÉRIEL

- Incubateur (37 ° C)
- Fours à hybridation
- bloc de chauffage à sec à 85 ° C
- Deux ou trois grandes boîtes en verre plat
- Chambre humide (Pour faire une chambre d'humidité, nous plaçons d u papier humidifié sur le fond d'une boîte et on recouvre avec le film alimentaire)
- Plate-forme à agitation

RÉACTIFS

CRITIQUES

Tous les réactifs doivent être préparés à l'avance, à moins d'explicitement indiquer le contraire. Les solutions sont conservées à température ambiante et peuvent être conservées pendant au moins 4 mois, à moins d'indication contraire.

Les solutions sont traitées DEPC quand c'est possible.

2 à 3 litre d'Eau DEPC sont nécessaire par série d'hybridation.

Les volumes sont indiqués pour maximum 14/16 lames

DEPC traitement

1mL de DEPC pour 1L de liquide, agiter et laisser ON à RT. Puis autoclaver.

PBS 10X

Pour préparer 10 × PBS, mélanger 70 mM NaH₂PO₄, 30 mM NaH₂PO₄ et 242.4 mM NaCl, puis ajuster le pH à 7,0.

TE 10X

Pour préparer la solution TE, mélanger Tris 1 M (pH 8,0) et 500 mM EDTA.

TBS 10X

Pour préparer une tampon TBS 10X, mélanger 1 M Tris-HCl pH 7,5 et NaCl 1,5 M.

Protéase

Diluer le contenu du flacon dans Eau DEPC à une concentration finale de 100 mg/ml et pré digérer la Protéase.

0,2 % glycine (w/v)

En PBS 1X

TEA

CRITIQUE Bien que les autres solutions peuvent être utilisées pour multiples racks, cette solution doit être fraîchement préparés pour chaque rack de .

Pour 250 ml de la solution, préparer 0,1 M triéthanolamine-HCl

(pH 8,0) tampon en mélangeant 245 ml d'H₂O, 3,25 ml de triéthanolamine et 1 ml de HCl. Immédiatement avant utilisation, ajouter 1,25 ml d'anhydride acétique

Sels d'hybridation in situ

Mélanger 3 M de NaCl, 100 mM de Tris-HCl (pH 8,0), du phosphate de sodium 100 mM (pH d'utilisation.

6,8) et EDTA 50 mM; aliquotes de magasins de 1 ml à -20 ° C.

50% (poids / volume) de sulfate de dextran, dissoudre le sulfate de dextran en chauffant le solution à 80 ° C; aliquotes de magasins de 1 ml à - 20 ° C.

ARNt

100/ml mg d'ARNt diluer la poudre d'une fiole d'ARNt dans 1 ml de H₂O RNase-free; aliquotes de magasins comparables de - 20 ° C.

Tampon d'hybridation

pour 10 ml du tampon, mélanger 1,25 ml de in situ sels d'hybridation, 5 ml de formamide déionisé, 2,5 ml de 50% (poids / volume) sulfate de dextran, 250 µl de 50 x solution de Denhardt, 125 µl de 100 mg/ml ARNt et 875 µl de H₂O; stocker à - 20 ° C.

Probe Mix

CRITIQUE Préparez juste avant utilisation. Pour préparer chaque lame, mélanger 10 µl de formamide déionisé, la quantité appropriée de la sonde LNA (déterminée expérimentalement) et RNase-free de H₂O jusqu'à 20 µl.

20 x SSC

Pour préparer 1 litre de 20 x SSC, combiner 3 M de NaCl et 0,3 M citrate de sodium (pH 7,0).

10 × tampon TBS

Pour préparer une × tampon TBS, mélanger 1 M Tris-HCl pH 7,5 et NaCl 1,5 M.

Le tampon de blocage

CRITIQUE préparer fraîchement le jour

Pour préparer le tampon de blocage, mélanger 1% (poids / volume) de blocage réactif dans 1 x tampon TBS. Chauffer le TBS à 70 ° C, ajouter le Blocking Reagent et dissoudre en agitant en permanence tandis que la solution refroidit à la température ambiante.

Tampon de lavage

CRITIQUE Fraîchement préparer le jour d'utilisation.

Mélanger 1% (poids / volume) de BSA et 0,3% (Volume / volume) de Triton X-100 à 1 x tampon TBS.

Solution anti-DIG

CRITIQUE La préparation doit être effectuée immédiatement avant utilisation.

Immédiatement avant utilisation, diluer Anti-

DIG-AP à 0,6 U/ml dans un tampon de lavage.

1 x tampon TN Pour préparer 1 × TN, mélanger 100 mM de Tris-HCl (pH 9,5) et NaCl 100 mM.

Solution de coloration

CRITIQUE La solution doit être préparée immédiatement avant utilisation.

Immédiatement avant utilisation, diluer 20 µl de NBT / BCIP stocks solution dans 1 ml de 1 x tampon TN.

Marquage DIG de l'extrémité 3' de l'oligo LNA

Dans un tube à centrifuger conservé dans la glace, mélanger les composants sous forme de tableau ci-dessous. Incuber le tube à 37 ° C pendant 1 h et ensuite

placez-le sur la glace. Arrêter la réaction en ajoutant 4 µl d'EDTA 0,1 M (pH 8,0).

Diluer la sonde avec 22 µl de formamide déionisé et stocker à - 20 ° C pour plus de 6 mois.

Composant		La concentration finale
5 x tampon de réaction	4 µl	1 ×
MM CoCl ₂ 25	4 µl	5 mM
LNA oligo d'intérêt	100 pmoles	
1 mM DIG-ddUTP	1 µl	50 nM
Terminale recombinante transférase	1 µl	2,5 U
H ₂ O	Jusqu'à 20 µl	

A ce points les sondes ont une concentration de 2,3 µMol nous allons les diluer à 500nM en formamide 50 %. Pour cela on rajoute 156 µl de formamide 50 %.

On aliquote en 10 ou 15µl et on conserve à -20°C.

□ CRITICAL Toutes les étapes sont réalisées à température ambiante sauf indication contraire.

PRÉHYBRIDATION ● 2-3 h

1 | Avant de commencer, mettre en place un bloc de chauffage à sec à 85 ° C et préparer les plats lame de coloration avec les solutions appropriées:

Histo-Clear, la série d'éthanol.

Réchauffer le TE pour le traitement de la protéase à 37 ° C, ajouter la protéase mais seulement au moment de l'utilisation.

2 | Déparaffiner les lames 1 fois dans Histo-Clear pendant 20 minutes, bouger les lames de temps à autres.

3 | Rincer les sections deux fois dans l'éthanol 100% pendant 1 min par rinçage.

4 | Réhydrater la sections en les passant dans une série d'éthanol de 96, 85, 75, 50, 25 (vol / vol) d'éthanol, pendant 30 s par incubation.

5 | Placer les sections dans 1 x PBS pendant 2 min.

6 | Mélanger 94 µl de 100 mg/ml de protéase dans 75 ml de solution TE qui a été préchauffée à 37 ° C; incuber les pour 20 min à 37 ° C.

7 | Neutraliser l'activité de protéase dans 0,2% glycine pendant 2 min.

8 | Rincer les lames deux fois dans 1 x PBS pendant 2 min par rinçage.

S'il y a du bruit de fond, traiter les sections avec TEA (encadré 1) avant de passer à l'étape 9.

Le traitement de TEA sert à acétyler les groupes amino chargés positivement dans le tissu qui peut conduire à la liaison non spécifique de

la sonde. Avec le commutateur de sondes hautement spécifiques oligo LNA, cette étape peut être omise. Cependant, si le niveau de fond coloration se avère problématique, le traitement de la TEA est recommandée. Dans ce cas, comprendre les étapes suivantes:

a. Dans un plat en verre avec un agitateur dans la hotte, préparer fraîchement 250 ml de 0,1 M de tampon triéthanolamine-HCl (pH 8,0)

b. Ajouter 1,25 ml d'anhydride acétique dans le tampon immédiatement avant utilisation et brièvement remuez bien. Réduire la vitesse de l'agitateur et mettre les lames dans le mélange. Continuer à remuer lentement pendant 10 min.

c. Rincer les deux fois dans 1 x PBS pendant 2 min chacun.

9 | Déshydrater les coupes de tissu par passage des lames dans une série d'éthanol de 25, 50, 75, 85, 96, 96 et 100% (Vol / vol) d'éthanol, pendant 30 s par incubation.

□ PAUSE POINT peuvent être stocké dans un récipient étanche avec une quantité minimale d'éthanol à 100% au fond pour plusieurs heures à 4 ° C.

HYBRIDATION • 16-20 h (une nuit)

10 | Sécher complètement à l'air les lames.

11 | Chauffer le mélange de la sonde (20 µl pour chaque lame) pendant 2-3 min à 85 ° C, refroidir immédiatement sur la glace, centrifuger brièvement et le garder sur la glace jusqu'à utilisation.

12 | Ajouter 80 µl de tampon d'hybridation à chaque sonde de telle sorte que le volume total de solution d'hybridation est de 100 µl par lame. Pour éviter les bulles, bien mélanger et poser délicatement sur les lamelles.

ÉTAPE CRITIQUE La concentration de la sonde LNA nécessaire dans la solution d'hybridation doit être déterminée de manière empirique en testant une série de dilution de la sonde. Comme point de départ, nous testons toute nouvelle sonde de LNA à 20 nM et 1 nM. Selon les résultats obtenus, il faudra peut être testé concentrations de sondes supplémentaires.

13 | Pipetter le mélange d'hybridation sur le bord de la lame et progressivement abaisser une lamelle. Il faut éviter les bulles

14 | Poser les lames dans une chambre humide. Veiller à ce que les ne se touchent pas les uns les autres, car cela pourrait conduire à des mélange de solutions d'hybridation. Scellez la boîte hermétiquement avec un film alimentaire.

15 | Incuber les pendant une nuit à 16 à 20 h à la température d'hybridation appropriée, typiquement entre 42 et 57 ° C.

ÉTAPE CRITIQUE La température optimale d'hybridation doit aussi être déterminée expérimentalement pour chaque sonde LNA.

Post-hybridation • TIMING 2,5 h

16 | A la fin du premier jour, réchauffer 1 litre de 0,2 x SSC à la température d'hybridation pour une utilisation dans les étapes 18 et 19.

17 | Préparer un volume minimal de tampon de blocage (~ 75 à 100 ml pour 25) et 500 ml de tampon de lavage.

18 | Transférer les lames dans un rack. Laissez les lamelles glissent hors des lames en maintenant chaque lame verticalement.

19 | Laver les lames deux fois dans 0,2 x SCC pendant 1/2 heure chacun à la même température que celle utilisée dans l'étape d'hybridation.

20 | Rincer les dans 1 x PBS à la température ambiante pendant 5 min.

PAUSE POINT peuvent être stockées dans 1 × PBS pendant une nuit à 4 ° C.

DÉTECTION • 1 nuit à 5 d

21 | Rincer les dans 1 x TBS pendant 5 min.

22 | Mettre les lames sur le fond d'un récipient en plastique plat. Appliquer le tampon de blocage directement sur les lames, ce qui assure que la solution couvre uniformément toutes les lames, et incuber les lames sur une plate-forme à agitation lente pendant 45 min.

23 | Placer les lames dans un récipient en plastique propre. Laver les lames avec le tampon de lavage une fois sur une plate-forme à agitation lente pendant 45 min.

- 24 | Jeter le tampon de lavage et appliquer la solution anti-DIG directement sur les lames, s'assurer que la solution couvre uniformément toutes les sections, et incuber les 2-3 h à température ambiante (en chambre humide).
- PAUSE POINT peuvent être stockées dans une solution anti-DIG nuit à 4°C.
- 25 | Laver les lames 4 fois dans du tampon de lavage sur une plate-forme à agitation lente pendant 15 minutes par lavage.
- 26 | Rincer les dans 1 x TBS pendant 2 min.
- 27 | Équilibrer les sections deux fois en 1 × TN pendant 2 min par lavage pour élever le pH dans les sections à 9,5 pour alcaline optimale activité de la phosphatase.
- 28 | Incuber les dans une solution fraîchement préparée solution de coloration NBT / BCIP. Pour ce faire, mettre 200µl de solution de coloration entre lame et lamelle.
- 29 | Remplacer la solution de coloration à deux fois par jour pendant 1-5 jours.
- 30 | Observer le développement du signal sous un microscope.
- 31 | Lorsque le signal est clair, égoutter les lames et arrêter le développement en transférant les lames dans du TN.
- 32 | Égoutter les lames sur du papier et placez quelques gouttes de glycérol 40 %.

Annexe 4:

CV

CV Clémence MEDINA



Date de naissance: 25/12/1989

Nationalité: Française

Tel: +33 6 87 39 58 78

1728 Route de Cannes 06560 VALBONNE

clemence.medina89@gmail.com

LinkedIn: veuillez cliquer [ici](#).

Compétences personnelles

- **Gestion de projet:** réalisation et animation d'un projet de recherche en **génomique**, mise en place de phases de tests et de validations statistiques.
- Apprentissage et mise au point des techniques inhérentes au projet (bio-informatique, biologie moléculaire, biotechnologie).
- Organisation de l'activité en laboratoire (évaluation des besoins matériels et techniques).
- Bonne communication et intégration au sein d'une équipe. Encadrement de stagiaires.
- Développement d'un réseau de collaborations scientifiques dans un contexte national et international.
- Aptitude à restituer un contenu scientifique à un public varié. Organisation d'évènement scientifiques.

Compétences professionnelles

Analyses informatiques et bio-informatiques:

- Outil d'analyse de séquences (Shortstack, Bowtie, htseqcount, Bedtools, Blast, GBrowse).
- Outils statistiques R (EdgeR et Deseq).
- Environnement Unix (lignes de commande).
- Outil de bureautique: Word, Excel, Powerpoint.

Biologie moléculaire:

- Extraction ADN/ARN et petits ARN.
- Génotypage.
- Northern Blot (ARN et petits ARN), qRT-PCR et stem loop qPCR.
- Clonage Gateway et transgénèse.

Biologie cellulaire:

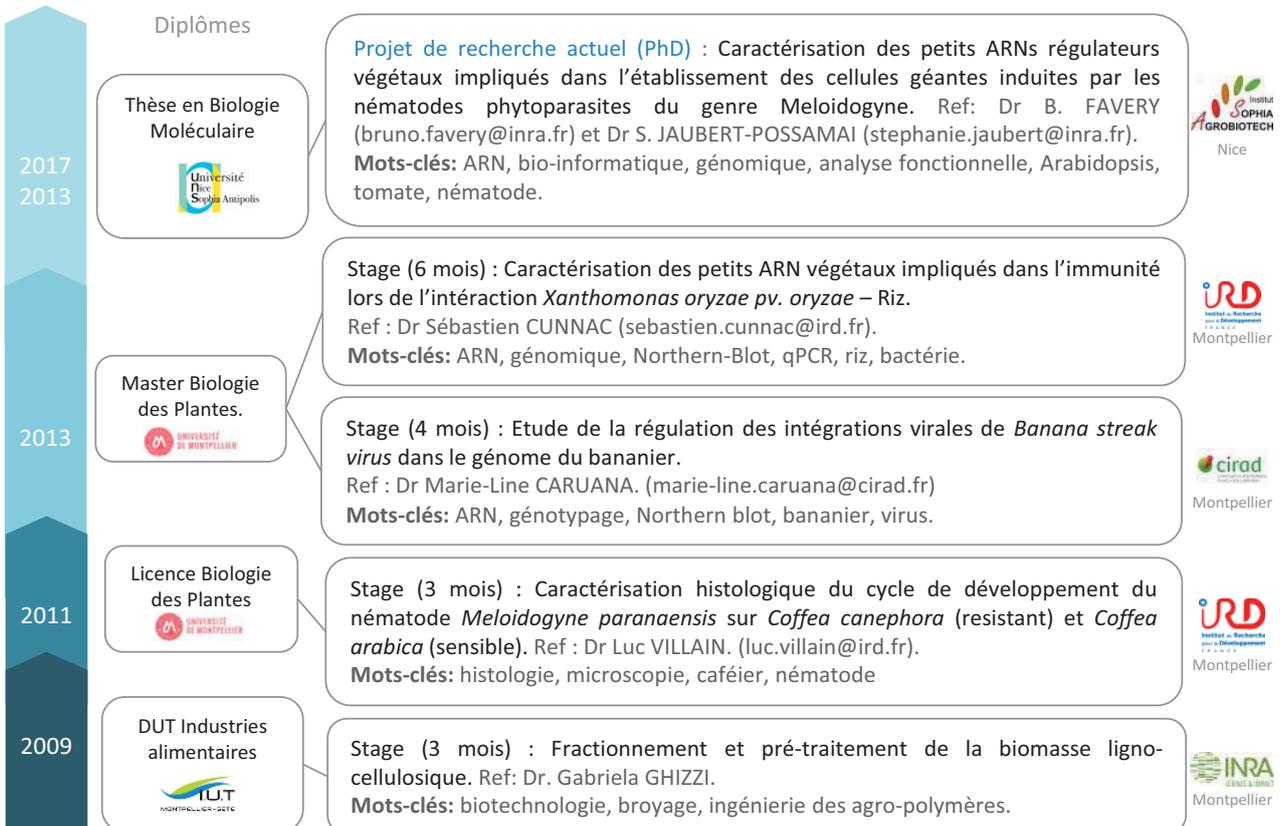
- Microscopie optique et confocale.

Travail en milieu confiné:

- Production de plantes.
- Manipulation de bio-agresseurs.

Formation & Expériences

Diplômes



Communication

■ Diffusion scientifique:

- Enseignement: Niveau Licence: Encadrement de travaux pratiques et évaluation du travail en Microbiologie, Biologie Moléculaire et Botanique (Université de Nice – Sophia Antipolis, 224h).
- Projet **MEDITES (investissement d'avenir)**: Diffusion de l'information scientifique au niveau collège. Sensibilisation à la démarche scientifique à travers le diagnostic de pathogène de plantes (2 jours).
- Fête de la Science: Animation du stand INRA présentant les différents pathogènes de plantes étudiés à l'Institut Sophia Agrobiotech (2 jours).

■ Congrès:

- Membre du comité d'organisation des journées de l'Ecole Doctorale de Nice (JEDN) 2014/2015.
- Présentation de travaux scientifiques: Congrès nationaux et internationaux. (Posters et présentations orales).
 - "European society of nematologist" - Braga, Portugal (2016) – Présentation orale
 - "Labex Signalife Congress " - Nice, France (2015) – Présentation poster.
 - "Keystone Symposia - RNA Silencing in plants" - Keystone ,Colorado (2015) – Présentation Poster.
 - "Effectome Congress" - Montpellier, France (2014) – Présentation poster.
- Prix Poster au congrès du Laboratoire d'Excellence Signalife, 2015.

■ Langues:

- Français (natif), Anglais (scientifique).

■ Article et rapports:

- Valorisation du travail par la publication d'articles scientifiques dans des revues internationales à comité de lecture:
 - Cabrera, J., Barcala, M., Garcia, A., Rio-mach, A., **Medina, C.**, Jaubert, S., Favery, B., Maizel, A., Ruiz-Ferrer, V., Fenoll, C., Escobar, C. (2015). Differentially expressed small RNAs in Arabidopsis galls formed by *Meloidogyne javanica* : a functional role for miR390 and its TAS3-derived tasiRNAs. *New Phytologist*. 209(4):1625-40.
 - **Medina, C.**, Da Rocha, M., Magliano, M., Raptopoulo, A., Revel, B., Marteu, N., Magnone, V., Cabrera, J., Barcala, M., Pereira da Silva, A., Escobar, C., Abad, P., Favery, B., Jaubert-Possamai, S. A role for Arabidopsis miR159 in the development of galls induced by *M. Incognita*. Soumis.
 - **Medina, C.**, Da Rocha, M., Magliano, M., Raptopoulo, A., Revel, B., Marteu, N., Magnone, V., Cabrera, J., Barcala, M., Pereira da Silva, A., Escobar, C., Abad, P., Favery, B., Jaubert-Possamai, S (2016 unpublished). Genome-Wide Profiling and Analysis of Arabidopsis siRNAs during the development of galls induced by *M. Incognita*. En cours d'écriture.
- Rédaction de rapports annuels d'avancement du projet pour l'INRA et la région PACA.

En savoir plus sur mon projet principal (projet de thèse):

- Génération de matériel biologique: infection de plantes (Arabidopsis et tomate) avec nématodes.
- Extraction ARN et petits ARN sur échantillons végétaux.
- Préparation de banques.
- Traitement des données de séquençage à haut débit SOLiD (transcriptome de petits ARNs).
- Création d'un pipeline informatique répondant à une problématique. Collaboration avec la plateforme de bio-informatique interne au laboratoire.
- Analyse fonctionnelle sur Arabidopsis (clonage, transgénèse, test de résistance).
- Analyse de l'expression de gènes rapporteurs sur tissus frais et fixés (microscopie optique et confocale).
- Analyse de l'expression génique: qPCR.
- Mis en forme des résultats obtenus *in vivo* et *in silico*.

Résumé :

Les nématodes à galles du genre *Meloidogyne* sont des parasites obligatoires des plantes capables d'infecter un large panel de plantes d'intérêt agronomique. Ces parasites ont la capacité d'induire la différenciation de cinq à sept cellules racinaires en cellules géantes, hypertrophiées, métaboliquement actives et multinucléées. Ces cellules géantes constituent le site nourricier indispensable au nématode, et sur lequel il va s'alimenter jusqu'à sa reproduction. Le développement de ces cellules entraîne une déformation racinaire appelée « galle » qui va perturber l'absorption de nutriments de la plante et l'affaiblir. Des études transcriptomiques ont montré qu'une vaste reprogrammation transcriptionnelle a lieu lors de la formation de la galle. Cette thèse vise à caractériser le rôle des petits ARN, des ARN non codants, au cours de la formation des galles induites par *M. incognita*. Les petits ARN non codants sont des régulateurs clés de l'expression génique et comprennent deux grandes familles : les microARN (miARN) et les petits ARN interférents (siARN). Pour cela, les petits ARN de racines de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* saines et infectées par le nématode à galle *M. incognita* ont été caractérisés par séquençage haut débit à 7 et 14 jours après infection, deux stades importants du développement des cellules géantes. Cette étude a permis d'identifier 24 miARN d'*Arabidopsis* différemment exprimés dans les galles en comparaison aux racines non infectées. L'analyse fonctionnelle de ces miARN a permis de valider le profil d'expression dans les galles de cinq miARN et de démontrer le rôle de miR159 dans la réponse de la plante à *M. incognita*. De plus, une approche pangénomique a été réalisée afin d'identifier les gènes susceptibles d'être régulés par les siARN lors de l'interaction. En conclusion, ce travail a contribué à démontrer d'une part l'implication des miARN dans l'interaction plante - nématode à galles et a permis l'identification des gènes potentiellement régulés par les siARN lors de l'interaction et impliqués dans la formation des cellules géantes induites par les nématodes à galles.

Abstract :

Root-Knot-Nematodes are obligate plant parasites able to infect a large panel of cultivated plants. These parasites have the ability to induce redifferentiation of five to seven root cells into specialized giant cells, hypertrophied, multinucleated and metabolically overactive. These giant cells form the feeding site upon which nematodes feed continuously until reproduction. Giant cells development leads to a root deformation, named gall, which disturbs plant nutrients absorption causing its weakening. Transcriptomic studies showed that a huge transcriptional reprogramming occurs during gall development. This project aims to characterize the role of small RNAs, non-coding RNAs, during gall development induced by *M. incognita*. Small non-coding RNAs are key regulators of gene expression and include two major families: microRNAs (miRNAs) and small interfering RNAs (siRNAs). Thus, small RNAs from roots of the model plant *Arabidopsis thaliana* healthy or infected by *M. incognita* were characterized by Next Generation Sequencing at 7 and 14 days after infection, two important stages of gall development. This study led to the identification of 24 plant microRNAs differentially expressed in galls compared to uninfected roots. Functional analysis of these miRNAs validated the expression pattern in galls of five miRNAs and demonstrated the role of miR159 in the plant response to *M. incognita*. In addition, a genome-wide approach was used to identify genes that could be regulated by siRNAs during the interaction. In conclusion, this work contributed to demonstrate, on one hand, the involvement of microRNAs in the plant - RKN interaction and allowed the identification of genes potentially regulated by small interfering and involved in the formation of giant cells induced by root-knot nematodes.